



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

TESIS

ESTABLECIMIENTO DE PROTOCOLOS PARA LA EMBRIOGÉNESIS  
SOMÁTICA Y ANÁLISIS DE VARIACIÓN SOMACLONAL DE  
PLANTAS REGENERADAS *in vitro* EN DOS ESPECIES DE AGAVE

PRESENTA

Alberto Isaac Reyes Silva

PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

TUTOR

Dr. Eugenio Martín Pérez Molphe Balch

INTEGRANTES DEL COMITÉ TUTORAL

Dr. Gilberto Alejandro Ocampo Acosta

Dr. Héctor Gordon Nuñez Palenius

Aguascalientes, Ags., 11 de noviembre del 2022



CARTA DE VOTO APROBATORIO  
INDIVIDUAL

**M. EN C. JORGE MARTÍN ALFÉREZ CHÁVEZ**  
**DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS**  
**P R E S E N T E:**

Por medio del presente como **tutor** designado del estudiante **Alberto Isaac Reyes Silva** con ID **16627** quien realizó la tesis titulada: **ESTABLECIMIENTO DE PROTOCOLOS PARA LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA Y ANÁLISIS DE VARIACIÓN SOMACLONAL DE PLANTAS REGENERADAS *in vitro* EN DOS ESPECIES DE AGAVE**, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, doy mi consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que él pueda proceder a imprimirla así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

**A T E N T A M E N T E**  
**“Se Lumen Proferre”**  
Aguascalientes, Ags., a 10 de noviembre de 2022

**Dr. Eugenio Martín Pérez Molphe Balch**  
Tutor de tesis

c.c.p.- Interesado  
c.c.p.- Secretaría Técnica del Programa de Posgrado

Elaborado por: Depto. Apoyo al Posgrado.  
Revisado por: Depto. Control Escolar/Depto. Gestión de Calidad.  
Aprobado por: Depto. Control Escolar/ Depto. Apoyo al Posgrado.

Código: DO-SEE-FO-07  
Actualización: 01  
Emisión: 17/05/19



M. EN C. JORGE MARTÍN ALFÉREZ CHÁVEZ  
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

Por medio del presente, como asesor designado dentro del Comité Tutorial del estudiante **Alberto Isaac Reyes Silva** con ID **16627** quien realizó la tesis titulada: **ESTABLECIMIENTO DE PROTOCOLOS PARA LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA Y ANÁLISIS DE VARIACIÓN SOMACLONAL DE PLANTAS REGENERADAS *in vitro* EN DOS ESPECIES DE AGAVE**, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, doy mi consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que él pueda proceder a imprimirla así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
"Se Lumen Proferre"  
Aguascalientes, Ags., a 10 de noviembre de 2022

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Gilberto Ocampo Acosta', written over a faint circular stamp.

**Dr. Gilberto Alejandro Ocampo Acosta**  
Asesor de tesis

c.c.p.- M. en C. Alberto Isaac Pérez Silva. Estudiante del Doctorado en Ciencias Biológicas.  
c.c.p.- Dra. Alma Lilián Guerrero Barrera. Secretaria Técnica del Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas.





Universidad  
de Guanajuato

CAMPUS IRAPUATO - SALAMANCA

CARTA DE VOTO APROBATORIO  
INDIVIDUAL

M. EN C. JORGE MARTÍN ALFÉREZ CHÁVEZ  
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

PRESENTE

Por medio del presente como **ASESOR** designado del estudiante **ALBERTO ISAAC REYES SILVA** con ID **16627** quien realizó el trabajo de tesis titulado: **ESTABLECIMIENTO DE PROTOCOLOS PARA LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA Y ANÁLISIS DE VARIACIÓN SOMACLONAL DE PLANTAS REGENERADAS IN VITRO EN DOS ESPECIES DE AGAVES**, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia doy mi consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que él pueda proceder a imprimirla así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE  
"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 9 de noviembre de 2022

*Dr. Héctor Gordon Nuñez Palenius*  
Asesor de tesis

c.c.p.- Interesado  
c.c.p.- Secretaría Técnica del Programa de Posgrado



lunes, 7 de noviembre de 2022

**Asunto: PRUEBA DE GALERA**

Estimado autor

**Eugenio Pérez-Molphe-Balch**

Universidad Autónoma de Aguascalientes

eperezmb@gmail.com

Me es grato informarle que su contribución con clave **R2021093**

**REGENERACIÓN in vitro DE Agave wocomahi GENTRY (ASPARAGACEAE)**

Está ahora en la versión formateada y ha sido programada para ser publicada en nuestra Revista. Con el fin de que este programa se realice conforme lo previsto, le solicitamos en un plazo no mayor de *1 día hábil*, revise cuidadosamente esta versión, sin hacer cambios mayores ni adicionar información.

Favor de usar color rojo para indicar las correcciones a los errores tipográficos que encuentre, y con azul los cambios que, en su caso tenga a bien hacer en el texto.

**Agradeciendo su pronta atención a esta solicitud, le envío un cordial saludo.**

**ATENTAMENTE**

**Ing. Sist. Rodrigo R. de la Cruz Díaz**

**Asistente del director de la RFM**

Ccp: Dra. Micaela de la O Olán, tesorera de la SOMEFI.

Ccp: Dr. Amalio Santacruz Varela, director de la RFM.

## AGRADECIMIENTOS

*A la Universidad Autónoma de Aguascalientes por el apoyo y facilidades que siempre me ha brindado para incrementar mi formación profesional.*

*Al Programa del Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Aguascalientes por su apoyo y confianza al permitirme desarrollar mis estudios de doctorado.*

*Al Dr. Eugenio Martín Perez Molphe Balch por trasmitirme sus conocimientos, por la confianza, por el apoyo, la orientación y su invaluable amistad que me ha brindado durante gran parte de mi formación profesional así como para desarrollo de mi tesis de doctorado.*

*Al Dr. Hector Gordon Nuñez Palenius por compartirme sus conocimientos, por el apoyo y la orientación durante el desarrollo de mi tesis; así como por su amistad y confianza que siempre me ha brindado.*

*Al Dr. Gilberto Alejandro Ocampo Acosta por compartirme sus conocimientos, por el apoyo y la orientación durante el desarrollo de mi tesis; así como por su amistad y confianza que siempre me ha brindado.*

*A la Ing. Martha Evelia Pérez Reyes por su gran ayuda e invaluable amistad que siempre me ha brindado.*

*A mis compañeras de la Unidad de Biotecnología Vegetal de la UAA por su gran amistad y confianza, por compartirme sus conocimientos, por su apoyo y orientación que siempre me ha brindado.*

*A la Biól. Araceli Adabache Ortíz, por su gran apoyo técnico y amistad.*

*A mi familia... Yesika, Raquel y Gael, por la motivación que me inspiran y por toda la paciencia que me tuvieron.*

*A mi mamá María Teresa de Jesus Silva Diaz por su poderosa fé y confianza incondicional, y a mi papá Salomón Reyes Sierra por compartirme su experiencia.*

*A mis hermanos Salomón, Jorge y Sebastián por su apoyo.*

*A mis amigos y amigas que siempre me alentaron a seguir adelante.*

DEDICATORIA

*Con infinito cariño para mi hija Raquel*



## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE CUADROS.....	4
ÍNDICE DE FIGURAS.....	5
RESUMEN.....	12
ABSTRACT.....	13
DESCRIPCIÓN DEL DESARROLLO DE LA INVESTIGACIÓN.....	14
INTRODUCCIÓN.....	15
ANTECEDENTES.....	17
Origen e historia de los agaves.....	17
Descripción del género <i>Agave</i> .....	26
<i>Agave parryi</i> Engelman .....	29
<i>Agave parryi</i> Engelman var. <i>huachucensis</i> (Baker) Little ex Benson .....	32
<i>Agave wocomahi</i> Gentry .....	34
La biotecnología vegetal.....	37
Cultivo de tejidos <i>in vitro</i> .....	38
Tejido calloso.....	41
Inducción del tejido calloso .....	43
Mantenimiento del tejido calloso.....	44
Usos del tejido calloso .....	46
Generalidades sobre la embriogénesis somática.....	47
Generalidades sobre la variación genética y las formas de detectarla en cultivos de tejidos vegetales.....	51
Cultivo de tejidos vegetales y uso de marcadores moleculares en especies de agaves.....	57
JUSTIFICACIÓN.....	64
HIPÓTESIS.....	65
OBJETIVO GENERAL.....	65
Objetivos específicos .....	65

METODOLOGÍA .....	66
Material vegetal.....	66
Multiplicación de material vegetal.....	66
Inducción de tejido calloso.....	66
Desarrollo de embriones somáticos .....	68
Evidencia microscópica .....	69
Adaptación de plántulas a condiciones <i>ex vitro</i> .....	69
Evaluación de variación somaclonal .....	70
RESULTADOS.....	74
Multiplicación <i>in vitro</i> por medio de meristemos basales.....	74
Inducción de tejido calloso <i>in vitro</i> .....	75
Desarrollo de embriones somáticos .....	110
Adaptación de embriones somáticos de <i>Agave wocomahi</i> y <i>Agave parryi</i> var. <i>huachucensis</i> a condiciones <i>ex vitro</i> . .....	125
Evaluación de variación somaclonal .....	126
DISCUSIÓN .....	132
CONCLUSIÓN.....	145
REFERENCIAS.....	147
ANEXOS .....	170
ANEXO A.....	171
ANEXO B.....	172
ANEXO C.....	173
ANEXO D.....	174
ANEXO E.....	175
ANEXO F.....	176
ANEXO G.....	177
ANEXO H.....	178

ANEXO I.....	179
ANEXO J.....	180
ANEXO K.....	181
ANEXO L.....	182
ANEXO M.....	183
ANEXO N.....	184
ANEXO Ñ.....	185
ANEXO O.....	186



## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Referencias de artículos científicos correspondientes al área de cultivos de tejidos vegetales y la especie de agave utilizado. ....	58
Cuadro 2. Referencias de artículos científicos correspondientes a la aplicación de marcadores moleculares en especies de agaves. ....	61
Cuadro 3. Generación de brotes <i>in vitro</i> en cinco especies de <i>Agave</i> , en respuesta de 1.0 mg/L de benciladenina. ....	74
Cuadro 4. Efecto en la inducción de tejido calloso utilizando distintas concentraciones de AIA, ANA, 2,4-D, PIC, solas o en combinación con BA, en explantes de tallo, hoja y raíz de <i>Agave americana</i> var. <i>comiteco</i> . ....	77
Cuadro 5. Efecto en la inducción de tejido calloso utilizando distintas concentraciones de AIA, ANA, 2,4-D, PIC, solas o en combinación con BA, en explantes de tallo, hoja y raíz de <i>Agave salmiana</i> var. <i>xamini</i> . ....	82
Cuadro 6. Efecto en la inducción de tejido calloso utilizando distintas concentraciones de AIA, ANA, 2,4-D, PIC, solas o en combinación con BA, en explantes de tallo, hoja y raíz de <i>Agave horrida</i> var. <i>perotensis</i> . ....	86
Cuadro 7. Efecto en la inducción de tejido calloso utilizando distintas concentraciones de AIA, ANA, 2,4-D, PIC, solas o en combinación con BA, en explantes de tallo, hoja y raíz de <i>Agave wocomahi</i> . ....	93
Cuadro 8. Efecto en la inducción de tejido calloso utilizando distintas concentraciones de AIA, ANA, 2,4-D, PIC, solas o en combinación con BA, en explantes de tallo, hoja y raíz de <i>Agave parryi</i> var. <i>huachucensis</i> . ....	100
Cuadro 9. Resumen de tratamientos con mejor respuesta para la inducción de callo en especies de agaves utilizando diferentes reguladores de crecimiento (RCV). ....	105
Cuadro 10. Embriones somáticos obtenidos mediante el uso de diferentes reguladores de crecimiento vegetal (RCV) en cinco especies de agaves durante la etapa de inducción de tejido calloso. ....	110
Cuadro 11. Desarrollo de embriones somáticos en medio de cultivo sin reguladores de crecimiento vegetal (RCV) a partir de tejido calloso embriogénico obtenido de distintos tratamientos con RCV y procedente de dos tipos de explantes de <i>Agave parryi</i> var. <i>huachucensis</i> . ....	115
Cuadro 12. Desarrollo de embriones somáticos en medio de cultivo sin reguladores de crecimiento vegetal (RCV) a partir de tejido calloso embriogénico obtenido de distintos tratamientos con RCV y procedente de dos tipos de explantes de <i>Agave wocomahi</i> . ....	121
Cuadro 13. Comparación de resultados en la extracción de ADN de <i>Agave wocomahi</i> y <i>A. parryi</i> var. <i>huachucensis</i> a partir de distintas muestras de tejido de hoja. ....	127
Cuadro 14. Análisis de polimorfismos a partir de fragmentos de ADN amplificados mediante el uso de ISSR´s en embriones somáticos de <i>Agave parryi</i> var. <i>huachucensis</i> y <i>A. wocomahi</i> . ....	128
Cuadro 15. Análisis de similitud en fragmentos de ADN obtenidos a partir de embriones somáticos de <i>Agave parryi</i> var. <i>huachucensis</i> y <i>A. wocomahi</i> mediante el uso del índice de Jaccard. ....	130

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Relaciones filogenéticas en Asparagales. .... 19

Figura 2. Distribución de *Agave parryi* (Hodgson *et al.*, 2020)..... 31

Figura 3. Plantas de *Agave parryi* var. *huachucensis*. Foto de Charles Hedgcock (Sánchez-Escalante *et al.*, 2018). .... 33

Figura 4. Planta juvenil de *Agave wocomahi* ..... 35

Figura 5. Distribución geográfica de *Agave wocomahi*. Distribución basada en: IPNI, 2022 revisado el 4 de noviembre del 2022; [www.naturalista.mx/taxa/281068-Agave-wocomahi](http://www.naturalista.mx/taxa/281068-Agave-wocomahi), revisado el 4 de noviembre del 2022; Villaseñor 2016; Klopper *et al.*, 2010 y Gentry 1972..... 36

Figura 6. Generación de brotes *in vitro* en cinco especies de *Agave*, en respuesta a 1.0 mg/L de benciladenina. De izquierda a derecha: *A. wocomahi*, *A. americana* var. *comiteco*, *A. salmiana* var. *xamini*, *A. horrida* var. *perotensis* y *A. parryi* var. *huachucensis*..... 75

Figura 7. Análisis de medias ANOM mediante proporciones en la inducción de tejido calloso de explante de tallo en *Agave americana* var. *comiteco*, sometidos a diferentes concentraciones de (BA) benciladenina; (2,4-D) ácido 2,4-diclorofenoxiacético; (PIC) Ácido 4-amino-3,5,6-tricloro-2-piridincarboxílico; (AIA) ácido indolacético y (ANA) ácido naftalenacético. La gráfica muestra la proporción para cada tratamiento; la línea central indica la proporción general de todas las muestras y; las líneas rojas indican los límites de decisión con base a un nivel de significancia de 0.05. La proporción ubicada más allá de un límite de decisión especifica que la diferencia entre la proporción del grupo y la población general es estadísticamente significativa. .... 78

Figura 8. Análisis de medias ANOM mediante proporciones en la inducción de tejido calloso de explante de hoja en *Agave americana* var. *comiteco*, sometidos a diferentes concentraciones de (BA) benciladenina; (2,4-D) ácido 2,4-diclorofenoxiacético; (PIC) Ácido 4-amino-3,5,6-tricloro-2-piridincarboxílico; (AIA) ácido indolacético y (ANA) ácido naftalenacético. La gráfica muestra la proporción para cada tratamiento; la línea central indica la proporción general de todas las muestras y; las líneas rojas indican los límites de decisión con base a un nivel de significancia de 0.05. La proporción ubicada más allá de un límite de decisión especifica que la diferencia entre la proporción del grupo y la población general es estadísticamente significativa. .... 79

Figura 9. Análisis de medias ANOM mediante proporciones en la inducción de tejido calloso de explante de raíz en *Agave americana* var. *comiteco*, sometidos a diferentes concentraciones de (BA) benciladenina; (2,4-D) ácido 2,4-diclorofenoxiacético; (PIC) Ácido 4-amino-3,5,6-tricloro-2-piridincarboxílico; (AIA) ácido indolacético y (ANA) ácido naftalenacético. La gráfica muestra la proporción para cada tratamiento; la línea central indica la proporción general de todas las muestras y; las líneas rojas indican los límites de decisión con base a un nivel de significancia de 0.05. La proporción ubicada más allá de un límite de decisión especifica que la diferencia entre la proporción del grupo y la población general es estadísticamente significativa. .... 80

Figura 10. Respuestas morfogénicas en distintos explantes de *Agave americana* var *comiteco* expuestas a diferentes reguladores de crecimiento vegetal. Inducción directa de brotes basales en explante de tallo mediante el uso de 1.5 mg/L de benciladenina (BA) (A), 3.0 mg/L de BA (B) y 3.0 mg/L de BA en combinación con 1.5 mg/L de AIA (C); inducción directa de brotes adventicios en explante de hoja mediante el uso de 3.0 mg/L de BA en combinación de 4.0 mg/L de ácido indolacético (AIA) (D) y 1.5 mg/L de AIA (E); embriogénesis directa mediante el uso de 1.5 mg/L de AIA en explante de hoja (F); inducción indirecta de raíces mediante el uso de 1.5 mg/L de ácido naftalenacético en explante de tallo (G y H), hoja (I y J) y raíz (K). .... 81

Figura 11. Análisis de medias ANOM mediante proporciones en la inducción de tejido calloso de explante de tallo en *Agave salmiana* var. *xamini*, sometidos a diferentes concentraciones de (BA) benciladenina; (2,4-D) ácido 2,4-diclorofenoxiacético; (PIC) Ácido 4-amino-3,5,6-tricloro-2-piridincarboxílico; (AIA) ácido indolacético y (ANA) ácido naftalenacético. La gráfica muestra la proporción para cada tratamiento; la línea central indica la proporción general de todas las muestras y; las líneas rojas indican los límites de decisión con base a un nivel de significancia de 0.05. La proporción ubicada más allá de un límite de decisión especifica que la diferencia entre la proporción del grupo y la población general es estadísticamente significativa..... 83

Figura 12. Análisis de medias ANOM mediante proporciones en la inducción de tejido calloso de explante de hoja en *Agave salmiana* var. *xamini*, sometidos a diferentes concentraciones de (BA) benciladenina; (2,4-D) ácido 2,4-diclorofenoxiacético; (PIC) Ácido 4-amino-3,5,6-tricloro-2-piridincarboxílico; (AIA) ácido indolacético y (ANA) ácido naftalenacético. La gráfica muestra la proporción para cada tratamiento; la línea central indica la proporción general de todas las muestras y; las líneas rojas indican los límites de decisión con base a un nivel de significancia de 0.05. La proporción ubicada más allá de un límite de decisión especifica que la diferencia entre la proporción del grupo y la población general es estadísticamente significativa..... 84

Figura 13. Análisis de medias ANOM mediante proporciones en la inducción de tejido calloso de explante de raíz en *Agave salmiana* var. *xamini*, sometidos a diferentes concentraciones de (BA) benciladenina; (2,4-D) ácido 2,4-diclorofenoxiacético; (PIC) Ácido 4-amino-3,5,6-tricloro-2-piridincarboxílico; (AIA) ácido indolacético y (ANA) ácido naftalenacético. La gráfica muestra la proporción para cada tratamiento; la línea central indica la proporción general de todas las muestras y; las líneas rojas indican los límites de decisión con base a un nivel de significancia de 0.05. La proporción ubicada más allá de un límite de decisión especifica que la diferencia entre la proporción del grupo y la población general es estadísticamente significativa..... 85

Figura 14. Análisis de medias ANOM mediante proporciones en la inducción de tejido calloso de explante de tallo en *Agave horrida* var. *perotensis*, sometidos a diferentes concentraciones de (BA) benciladenina; (2,4-D) ácido 2,4-diclorofenoxiacético; (PIC) Ácido 4-amino-3,5,6-tricloro-2-piridincarboxílico; (AIA) ácido indolacético y (ANA) ácido naftalenacético. La gráfica muestra la proporción para cada tratamiento; la línea central indica la proporción general de todas las muestras y; las líneas rojas indican los límites de decisión con base a un nivel de significancia de 0.05. La proporción ubicada más allá de un límite de decisión especifica que la diferencia entre la proporción del grupo y la población general es estadísticamente significativa..... 87

Figura 15. Análisis de medias ANOM mediante proporciones en la inducción de tejido calloso de explante de hoja en *Agave horrida* var. *perotensis*, sometidos a diferentes concentraciones de (BA) benciladenina; (2,4-D) ácido 2,4-diclorofenoxiacético; (PIC) Ácido 4-amino-3,5,6-tricloro-2-piridincarboxílico; (AIA) ácido indolacético y (ANA) ácido naftalenacético. La gráfica muestra la proporción para cada tratamiento; la línea central indica la proporción general de todas las muestras y; las líneas rojas indican los límites de decisión con base a un nivel de significancia de 0.05. La proporción ubicada más allá de un límite de decisión especifica que la diferencia entre la proporción del grupo y la población general es estadísticamente significativa..... 88

Figura 16. Análisis de medias ANOM mediante proporciones en la inducción de tejido calloso de explante de raíz en *Agave horrida* var. *perotensis*, sometidos a diferentes concentraciones de (BA) benciladenina; (2,4-D) ácido 2,4-diclorofenoxiacético; (PIC) Ácido 4-amino-3,5,6-tricloro-2-piridincarboxílico; (AIA) ácido indolacético y (ANA) ácido naftalenacético. La gráfica muestra la proporción para cada tratamiento; la línea central indica la proporción general de todas las muestras y; las líneas rojas indican los límites de decisión con base a un nivel de significancia de 0.05. La

proporción ubicada más allá de un límite de decisión específica que la diferencia entre la proporción del grupo y la población general es estadísticamente significativa..... 89

Figura 17. Diferentes respuestas morfológicas en distintos explantes de *Agave horrida* var *perotensis* expuestas a distintos reguladores de crecimiento vegetal. Inducción directa de brotes basales en explante de tallo mediante el uso de 1.5 mg/L de benciladenina (BA) (A); inducción directa de brotes adventicios en explante de hoja mediante el uso de 3.0 mg/L de BA (B); inducción indirecta de brotes en explante de tallo mediante el uso de 3.0 mg/L de BA (C y D); inducción indirecta de raíces mediante el uso de 1.5 mg/L de ácido naftalenacético en explante de tallo (E), hoja (F) y raíz (G). 90

Figura 18. Tipos de tejido calloso (TC) a partir de diferentes explantes de *Agave wocomahi*. A) TC tipo compacto en explante de raíz; B) TC tipo nodular en explante de hoja; C) TC friable en explante de tallo; D) TC con brotes en explante de tallo; E) TC con raíz en explante de tallo; F) TC embriogénico en explante de tallo..... 91

Figura 19. Análisis de medias ANOM mediante proporciones en la inducción de tejido calloso de explante de tallo en *Agave wocomahi*, sometidos a diferentes concentraciones de (BA) benciladenina; (2,4-D) ácido 2,4-diclorofenoxiacético; (PIC) Ácido 4-amino-3,5,6-tricloro-2-piridincarboxílico; (AIA) ácido indolacético y (ANA) ácido naftalenacético. La gráfica muestra la proporción para cada tratamiento; la línea central indica la proporción general de todas las muestras y; las líneas rojas indican los límites de decisión con base a un nivel de significancia de 0.05. La proporción ubicada más allá de un límite de decisión específica que la diferencia entre la proporción del grupo y la población general es estadísticamente significativa..... 94

Figura 20. Análisis de medias ANOM mediante proporciones en la inducción de tejido calloso de explante de hoja en *Agave wocomahi*, sometidos a diferentes concentraciones de (BA) benciladenina; (2,4-D) ácido 2,4-diclorofenoxiacético; (PIC) Ácido 4-amino-3,5,6-tricloro-2-piridincarboxílico; (AIA) ácido indolacético y (ANA) ácido naftalenacético. La gráfica muestra la proporción para cada tratamiento; la línea central indica la proporción general de todas las muestras y; las líneas rojas indican los límites de decisión con base a un nivel de significancia de 0.05. La proporción ubicada más allá de un límite de decisión específica que la diferencia entre la proporción del grupo y la población general es estadísticamente significativa..... 95

Figura 21. Análisis de medias ANOM mediante proporciones en la inducción de tejido calloso de explante de raíz en *Agave wocomahi*, sometidos a diferentes concentraciones de (BA) benciladenina; (2,4-D) ácido 2,4-diclorofenoxiacético; (PIC) Ácido 4-amino-3,5,6-tricloro-2-piridincarboxílico; (AIA) ácido indolacético y (ANA) ácido naftalenacético. La gráfica muestra la proporción para cada tratamiento; la línea central indica la proporción general de todas las muestras y; las líneas rojas indican los límites de decisión con base a un nivel de significancia de 0.05. La proporción ubicada más allá de un límite de decisión específica que la diferencia entre la proporción del grupo y la población general es estadísticamente significativa..... 96

Figura 22. Respuestas morfológicas en distintos explantes de *Agave wocomahi* expuestas a distintos reguladores de crecimiento vegetal. Inducción directa de brotes basales en explante de tallo mediante el uso de 3.0 mg/L de (BA) benciladenina (A); inducción directa de brotes adventicios mediante el uso de 3.0 mg/L de BA en explante de hoja (B); inducción directa de brotes adventicios mediante el uso de 1.5 mg/L de (AIA) ácido indolacético en combinación de 1.5 mg/L de BA en explante de raíz (C); inducción directa de raíces mediante el uso de 4.0 mg/L de AIA en explante de hoja (D); embriogénesis somática directa obtenida mediante el uso de 4.0 mg/L de AIA en combinación de 1.5 mg/L de BA en explante de hoja (E); embriogénesis somática indirecta obtenida mediante el uso de 1.5 mg/L de AIA en combinación de 3.0 mg/L de BA en explante de tallo (F) e inducción indirecta de brotes a partir de explante de tallo mediante el uso de 1.5 mg/L de AIA (G)..... 97

Figura 23. Tipos de tejido calloso (TC) a partir de diferentes explantes de *Agave parryi* var. *huachucensis*. TC de tipo compacto en explante de tallo (A); TC con raíz en explante de hoja (B); TC de tipo nodular en explante de hoja (C); TC de tipo friable en explante de hoja (D); TC con brotes en explante de tallo (E) y; TC embriogénico en explante de hoja (F). ..... 98

Figura 24. Análisis de medias ANOM mediante proporciones en la inducción de tejido calloso de explante de tallo en *Agave parryi* var. *huachucensis*, sometidos a diferentes concentraciones de (BA) benciladenina; (2,4-D) ácido 2,4-diclorofenoxiacético; (PIC) Ácido 4-amino-3,5,6-tricloro-2-piridincarboxílico; (AIA) ácido indolacético y (ANA) ácido naftalenacético. La gráfica muestra la proporción para cada tratamiento; la línea central indica la proporción general de todas las muestras y; las líneas rojas indican los límites de decisión con base a un nivel de significancia de 0.05. La proporción ubicada más allá de un límite de decisión especifica que la diferencia entre la proporción del grupo y la población general es estadísticamente significativa. .... 101

Figura 25. Análisis de medias ANOM mediante proporciones en la inducción de tejido calloso de explante de hoja en *Agave parryi* var. *huachucensis*, sometidos a diferentes concentraciones de (BA) benciladenina; (2,4-D) ácido 2,4-diclorofenoxiacético; (PIC) Ácido 4-amino-3,5,6-tricloro-2-piridincarboxílico; (AIA) ácido indolacético y (ANA) ácido naftalenacético. La gráfica muestra la proporción para cada tratamiento; la línea central indica la proporción general de todas las muestras y; las líneas rojas indican los límites de decisión con base a un nivel de significancia de 0.05. La proporción ubicada más allá de un límite de decisión especifica que la diferencia entre la proporción del grupo y la población general es estadísticamente significativa. .... 102

Figura 26. Análisis de medias ANOM mediante proporciones en la inducción de tejido calloso de explante de raíz en *Agave parryi* var. *huachucensis*, sometidos a diferentes concentraciones de (BA) benciladenina; (2,4-D) ácido 2,4-diclorofenoxiacético; (PIC) Ácido 4-amino-3,5,6-tricloro-2-piridincarboxílico; (AIA) ácido indolacético y (ANA) ácido naftalenacético. La gráfica muestra la proporción para cada tratamiento; la línea central indica la proporción general de todas las muestras y; las líneas rojas indican los límites de decisión con base a un nivel de significancia de 0.05. La proporción ubicada más allá de un límite de decisión especifica que la diferencia entre la proporción del grupo y la población general es estadísticamente significativa. .... 103

Figura 27. Respuestas morfogénicas en diferentes explantes de *Agave parryi* var. *huachucensis* expuestos a distintos reguladores de crecimiento vegetal. Inducción directa de brotes basales mediante el uso de 1.5 mg/L de (BA) benciladenina en explante de tallo (A); inducción directa de brotes adventicios mediante el uso de 1.5 mg/L de BA en explante de hoja (B); inducción indirecta de brotes mediante el uso de 1.5 mg/L de (AIA) ácido indolacético en combinación con 3.0 mg/L de BA a partir de explante de hoja (C); inducción indirecta de brotes mediante el uso de 1.5 mg/L de AIA en combinación con 3.0 mg/L de BA a partir de explante de tallo (D); inducción indirecta de raíces mediante el uso de 4.0 mg/L de AIA en explante de tallo (E), hoja (F) y raíz (G); embriogénesis somática inducida indirectamente mediante el uso de 3.0 mg/L de BA (H); inducción de embriogénesis somática mediante el uso de 1.5 mg/L de AIA en combinación con 3.0 mg/L de BA en explante de tallo (I); y embriogénesis somática indirecta mediante el uso de 1.5 mg/L de AIA en combinación de 1.5 mg/L de BA en explante de tallo (J). .... 104

Figura 28. Análisis de medias ANOM mediante proporciones en la inducción de tejido calloso de explante de tallo en *Agave wocomahi*, sometidos a diferentes concentraciones de (AIA) ácido indolacético y (BA) benciladenina. La gráfica muestra la proporción para cada tratamiento; la línea central indica la proporción general de todas las muestras y; las líneas rojas indican los límites de decisión con base a un nivel de significancia de 0.05. La proporción ubicada más allá de un límite de decisión especifica que la diferencia entre la proporción del grupo y la población general es estadísticamente significativa. .... 106

Figura 29. Análisis de medias ANOM mediante proporciones en la inducción generación de tejido calloso de explante de hoja en *Agave wocomahi*, sometidos a diferentes concentraciones de (AIA) ácido indolacético y (BA) benciladenina. La gráfica muestra la proporción para cada tratamiento; la línea central indica la proporción general de todas las muestras y; las líneas rojas indican los límites de decisión con base a un nivel de significancia de 0.05. La proporción ubicada más allá de un límite de decisión específica que la diferencia entre la proporción del grupo y la población general es estadísticamente significativa..... 107

Figura 30. Análisis de medias ANOM mediante proporciones en la inducción de tejido calloso de explante de raíz en *Agave wocomahi*, sometidos a diferentes concentraciones de (AIA) ácido indolacético y (BA) benciladenina. La gráfica muestra la proporción para cada tratamiento; la línea central indica la proporción general de todas las muestras y; las líneas rojas indican los límites de decisión con base a un nivel de significancia de 0.05. La proporción ubicada más allá de un límite de decisión específica que la diferencia entre la proporción del grupo y la población general es estadísticamente significativa..... 107

Figura 31. Análisis de medias ANOM mediante proporciones en generación de tejido calloso de explante de tallo en *Agave parryi* var. *huachucensis*, sometidos a diferentes concentraciones de (AIA) ácido indolacético y (BA) benciladenina. La gráfica muestra la proporción para cada tratamiento; la línea central indica la proporción general de todas las muestras y; las líneas rojas indican los límites de decisión con base a un nivel de significancia de 0.05. La proporción ubicada más allá de un límite de decisión específica que la diferencia entre la proporción del grupo y la población general es estadísticamente significativa..... 108

Figura 32. Análisis de medias ANOM mediante proporciones en generación de tejido calloso de explantes de hoja en *Agave parryi* var. *huachucensis*, sometidos a diferentes concentraciones de (AIA) ácido indolacético y (BA) benciladenina. La gráfica muestra la proporción para cada tratamiento; la línea central indica la proporción general de todas las muestras y; las líneas rojas indican los límites de decisión con base a un nivel de significancia de 0.05. La proporción ubicada más allá de un límite de decisión específica que la diferencia entre la proporción del grupo y la población general es estadísticamente significativa..... 109

Figura 33. Análisis de medias ANOM mediante proporciones en la inducción de tejido calloso de explantes de raíz en *Agave parryi* var. *huachucensis*, sometidos a diferentes concentraciones de (AIA) ácido indolacético y (BA) benciladenina. La gráfica muestra la proporción para cada tratamiento; la línea central indica la proporción general de todas las muestras y; las líneas rojas indican los límites de decisión con base a un nivel de significancia de 0.05. La proporción ubicada más allá de un límite de decisión específica que la diferencia entre la proporción del grupo y la población general es estadísticamente significativa..... 109

Figura 34. Desarrollo de embriones somáticos de *Agave americana* var. *comiteco* obtenidos mediante el uso de 4.0 mg/L ácido indolacético en combinación con 3.0 mg/L de benciladenina en explante de tallo. Aparición de embriones somáticos (A y B) y desarrollo de embriones somáticos (C y D)... 111

Figura 35. Embriones somáticos de *Agave salmiana* var. *xamini* obtenidos mediante el uso de 4.0 mg/L de ácido naftalenacético en combinación con 1.5 mg/L de benciladenina en explante de tallo y visualizados en un estereoscopio óptico. .... 112

Figura 36. Embriones somáticos de *Agave salmiana* var. *xamini* obtenidos mediante el uso de 4.0 mg/L de ácido naftalenacético en combinación con 1.5 mg/L de benciladenina en explante de tallo y visualizados en un microscopio electrónico de barrido. .... 112

Figura 37. Desarrollo de embriones somáticos de *Agave horrida* var. *perotensis*. Desarrollo de embriones somáticos mediante el uso de 4.0 mg/L de (AIA) ácido indolacético en combinación con

1.5 mg/L de (BA) benciladenina en explante de tallo (A y B); desarrollo de embriones somáticos mediante el uso de 1.5 mg/L de AIA en combinación con 3.0 mg/L de BA en explante de tallo (C y D); desarrollo de embriones somáticos mediante el uso de 4.0 mg/L de AIA en combinación con 3.0 mg/L de BA en explante de tallo (E y F); desarrollo de un embrión somático mediante el uso de 1.5 mg/L de (ANA) ácido naftalenacético (G) y desarrollo de embriones somáticos mediante el uso de 1.5 mg/L de ANA en combinación con 1.5 mg/L de BA en explante de tallo (H). ..... 113

Figura 38. Embriones somáticos en etapa globular de *Agave parryi* var. *huachucensis* inducidos mediante el uso de 4.0 mg/L ácido 2,4-diclorofenoxiacético en combinación con 3.0 mg/L de benciladenina en explante de tallo y visualizado en un estereoscopio óptico. .... 116

Figura 39. Embriones somáticos de *Agave parryi* var. *huachucensis* inducidos mediante el uso de 4.0 mg/L de ácido 2,4-diclorofenoxiacético en combinación con 3.0 mg/L de benciladenina en explante de tallo y visualizados en un microscopio electrónico de barrido. .... 116

Figura 40. Embriones somáticos de *Agave parryi* var. *huachucensis* obtenidos mediante el uso de 4.0 mg/L ácido 4-amino tricloro piricarboxílico en combinación con 3.0 mg/L de benciladenina en explante de hoja y visualizado en un estereoscopio óptico. .... 117

Figura 41. Embriones somáticos de *Agave parryi* var. *huachucensis* obtenidos mediante el uso de 4.0 mg/L de ácido 4-amino tricloro piricarboxílico en combinación con 3.0 mg/L de benciladenina de explante de hoja y visualizados en un microscopio electrónico de barrido. .... 117

Figura 42. Embriones somáticos de *Agave parryi* var. *huachucensis* inducidos mediante el uso de 1.5 mg/L de ácido naftalenacético en combinación con 3.0 mg/L de benciladenina en explante de tallo y visualizado en un estereoscopio óptico. .... 118

Figura 43. Embrión somático de *Agave parryi* var. *huachucensis* inducido mediante el uso de 1.5 mg/L de ácido naftalenacético en combinación con 3.0 mg/L de benciladenina en explante de tallo y visualizado en un microscopio electrónico de barrido. .... 118

Figura 44. Embriones somáticos de *Agave parryi* var. *huachucensis* inducidos mediante el uso de 4.0 mg/L de ácido naftalenacético en explante de tallo y visualizados en un microscopio electrónico de barrido. .... 119

Figura 45. Embriones somáticos de *Agave parryi* var. *huachucensis* inducidos mediante el uso de 4.0 mg/L de ácido naftalenacético en explante de tallo y visualizado en un estereoscopio. .... 119

Figura 46. Embriones somáticos de *Agave parryi* var. *huachucensis* inducidos mediante el uso de 1.5 mg/L de benciladenina en explante de tallo. Visualización en un estereoscopio óptico (A) y en un microscopio electrónico de barrido (B). .... 120

Figura 47. Embriogénesis somática en *Agave wocomahi*, a partir de explante de tallo. Tratamiento con 1.5 mg/L de ácido 2,4-diclorofenoxiacético en combinación con 1.5 mg/L de (BA) benciladenina (A); tratamiento con 1.5 mg/L de (AIA) ácido indolacético en combinación con 1.5 mg/L de BA (B); tratamiento con 1.5 mg/L de AIA en combinación con 3.0 mg/L de BA (C); tratamiento con 3.0 mg/L de BA (D). .... 122

Figura 48. Embriones somáticos de *Agave wocomahi* obtenidos mediante el uso de 4.0 mg/L de 2,4-D en combinación con 1.5 mg/L de benciladenina en explante de hoja y visualizados en un estereoscopio óptico. .... 123

Figura 49. Embriones somáticos de *Agave wocomahi* obtenidos mediante el uso de 4.0 mg/L de ácido 2,4-diclorofenoxiacético en combinación con 1.5 mg/L de benciladenina en explante de hoja y visualizados en un microscopio electrónico de barrido. .... 123

Figura 50. Embriones somáticos de *Agave wocomahi* obtenidos mediante el uso de 1.5 mg/L de ácido indolacético en combinación con 3.0 mg/L de benciladenina en explante de hoja y visualizados en un microscopio electrónico de barrido..... 124

Figura 51. Embriones somáticos a partir de explantes de *Agave wocomahi*. Embriogénesis somática indirecta inducida con 1.5 mg/L de (AIA) ácido indolacético en combinación con 1.5 mg/L de (BA) benciladenina en explante de hoja (A); etapas de la embriogénesis somática (de izquierda a derecha), callo embriogénico, embrión globular, embrión coleoptilar, embrión escutelar y embrión maduro (B); embriogénesis somática indirecta inducida con 1.5 mg/L de AIA en combinación con 3.0 mg/L de BA en explante de tallo (C y D); y embriones somáticos obtenido a partir de tejido calloso inducido con 3.0 mg/L de BA en explante de tallo (E)..... 124

Figura 52. Embriones somáticos previo a la adaptación a condiciones *ex vitro*. *Agave wocomahi* (A) y *Agave parryi* var. *huachucensis* (B)..... 125

Figura 53. Plántulas provenientes de embriones somáticos de *Agave wocomahi* establecidos bajo condiciones *ex vitro*. ..... 125

Figura 54. Plántulas provenientes de embriones somáticos de *Agave parryi* var. *huachucensis* establecidos bajo condiciones *ex vitro*. ..... 126

Figura 55. Dendrograma de similitud genética en muestras de embriones somáticos de *Agave parryi* var. *huachucensis* y *A. wocomahi* generado mediante el uso del algoritmo de agrupación de UPGMA. *Control*: Muestra de plántula bajo condiciones *in vitro* correspondiente a la línea clonal A; *ES-T1*: Embrión somático (ES) obtenido mediante el uso de 4.0 mg/L de ácido indolacético (AIA) en combinación con 3.0 mg/L de benciladenina (BA) en explante de tallo y establecido bajo condiciones *ex vitro*; *ES-H1*: ES obtenido mediante el uso de 1.5 mg/L de AIA en combinación con 1.5 mg/L de BA en explante de hoja y procedente de condiciones *in vitro*; *ES-T2*: ES obtenido mediante el uso de 1.5 mg/L de ácido 2,4-diclorofenoxiacético en combinación con 3.0 mg/L de BA en explante de tallo y establecido bajo condiciones *in vitro*; *ES-T3*: ES obtenido mediante el uso de 1.5 mg/L de ácido 4-amino-3,5,6-tricloro-2-piridincarboxílico en combinación con 1.5 mg/L de BA en explante de tallo y establecido bajo condiciones *in vitro*; *ES-T4*: ES obtenido mediante el uso de 1.5 mg/L de BA en explante de tallo y establecido bajo condiciones *ex vitro*; *ES-R1*: ES obtenido mediante el uso de 1.5 mg/L de AIA en combinación con 1.5 mg/L de BA en explante de raíz y establecido bajo condiciones *in vitro*; *ES-H2*: ES obtenido mediante el uso de 4.0 mg/L de AIA en combinación con 3.0 mg/L de BA en explante de hoja y establecido bajo condiciones *in vitro*; y *ES-T5*: ES obtenido mediante el uso de 1.5 mg/L de AIA en combinación con 3.0 mg/L de BA en explante de tallo y establecido bajo condiciones *in vitro*. ..... 131

## RESUMEN

*Agave parryi* var. *huachucensis* y *A. wocomahi* comparten una distribución dentro de los desiertos de Sonora y Chihuahua, donde proveen diversos beneficios ecológicos que mantienen una dependencia vital con diferentes especies silvestres, por lo que es de suma importancia su protección y conservación. El cultivo de tejidos vegetales proporciona alternativas para el aprovechamiento sostenible de estas plantas, sin poner en riesgo la continuidad de las poblaciones silvestres. En el presente trabajo se utilizó el medio basal Murashige and Skoog, 1962 (MS), adicionado con 30 g/L de sacarosa y 8 g/L de agar para evaluar el efecto de los reguladores de crecimiento vegetal (RCV), ácido naftalenacético, ácido indolacético (AIA), picloram (PIC) y ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), solos o en combinación con benciladenina (BA), en la inducción de embriogénesis somática y otras respuestas morfogénicas *in vitro*, en explantes de hoja, tallo y raíz. Posteriormente, se evaluó el desarrollo de embriones somáticos (ES) en medio sin RCV o bajo el efecto de 1.0 g/L de carbón activado. La mayor eficiencia de embriogénesis somática en *A. parryi*, fue lograda en callo generado de explantes de tallo sometidos a 1.5 mg/L de BA y transferido a medio MS sin RCV, donde se obtuvo 13.9 plantas por fragmento de callo; y en *A. wocomahi* en callo generado de explantes de tallo sometidos a 1.5 mg/L de AIA con 3.0 mg/L de BA y transferido a medio basal MS con carbón activado, donde se obtuvo 16.4 plantas por fragmento de callo. Además, variación somaclonal fue detectada mediante análisis por ISSRs en 5 diferentes ES de *A. parryi* y de *A. wocomahi*, con un índice de Jaccard de 0.89-0.98 y 0.76-0.93, respectivamente. Estos resultados amplían las estrategias orientadas a la protección, conservación y/o aprovechamiento sostenible en ambas especies de agaves.

Palabras clave: Embriogénesis somática, organogénesis, tejido calloso, variación somaclonal.

## ABSTRACT

*Agave parryi* var. *huachucensis* and *A. wocomahi* share the same Sonora and Chihuahua deserts distribution, where they provide diverse ecological benefits, keeping pivotal dependence with different wild species; thus, their protection and conservation are very important. Plant tissue culture offers alternatives to agave exploitation without placing in risk the wild species populations permanence. In this study, Murashige and Skoog (MS) medium with 30 g/L saccharose and 8 g/L agar was used as basal culture to assess the effect of several plant growth regulators (PGR) on somatic embryogenesis and others *in vitro* morphological responses in stem, leaf and root explants. These PGR were 1-naphthaleneacetic acid (NAA), indolacetic acid (IAA), picloram (PIC) and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), alone or with 6-benzylaminopurine (BA) combinations. Later somatic embryos (SE) development on medium without PGR or with 1.0 g/L active charcoal was evaluated. The best somatic embryogenesis efficiency in *Agave parryi* was obtained from callus tissue induction with 1.5 mg/L BA on stem explants and transferred on MS medium without PGR, where 13.9 plants were got for each callus tissue explant; in *A. wocomahi*, it was obtained from callus tissue induction with 1.5mg/L IAA combined to 3.0mg/L BA on stem explant and transferred on MS medium with active charcoal, where 16.4 plants resulted for each callus tissue explant. Moreover, somaclonal variation was detected by means of inter simple sequence repeat (ISSR) analysis, in 5 different SE of *A. parryi* and of *A. wocomahi*, with a Jaccard index of (0.89-0.98) and (0.76-0.93), respectively. Our results can be used to protection, conservation and/or sustainable use of both agaves species.

Key words: Callus tissue, organogenesis, somatic embryogenesis, somatic variation.

## DESCRIPCIÓN DEL DESARROLLO DE LA INVESTIGACIÓN

La presente investigación inició con la propagación *in vitro* de *Agave americana* var. *comiteco*, *A. salmiana* var. *xamini*, *A. horrida* var. *perotensis*, *A. wocomahi* y *A. parryi* var. *huachucensis*, con el objetivo de disponer de material vegetal *in vitro* para el desarrollo del trabajo de investigación.

Posteriormente se realizaron escrutinios en explante de tallo, hoja y raíz de cada una de las cinco especies de agaves mencionadas anteriormente, con el fin de conocer el efecto de cinco diferentes reguladores de crecimiento vegetal en la respuesta de inducción, tipo, presencia, color y oxidación de tejido calloso, así como otras respuestas morfogénicas *in vitro*.

Tomando en consideración los resultados de los escrutinios, principalmente el porcentaje de inducción de tejido calloso, el tipo de tejido calloso, así como las diferentes respuestas morfogénicas, se seleccionó al *Agave wocomahi* y *A. parryi* var. *huachucensis* para evaluar el efecto del medio basal MS sin reguladores de crecimiento vegetal o medio basal MS con carbón activado, en el desarrollo de embriones somáticos en explantes de tejido calloso.

Finalmente, se realizaron análisis mediante el uso de marcadores moleculares de tipo ISSR para determinar la presencia de variación somaclonal en *Agave wocomahi* y *A. parryi* var. *huachucensis*.

## INTRODUCCIÓN

El género *Agave* incluye a un grupo de plantas con una enorme importancia biológica, cultural y económica en México. Con su característica forma en roseta, los también llamados “magueyes” embellecen prácticamente todos los paisajes del territorio del país, teniendo su mayor presencia en los ecosistemas áridos y semiáridos. Estas áreas naturales han sido de relevante importancia, ya que a lo largo del tiempo han presentado diversas condiciones geológicas y ambientales, las cuales han derivado en circunstancias donde especies biológicas, entre ellas los agaves, tuvieron su muy reciente origen evolutivo y diversificación, permitiendo con ello, colocar a México como el centro de origen y con el mayor reservorio de especies endémicas de agaves. La enorme presencia de estas especies en nuestro país, ha derivado en una amplia y compleja interacción ecológica con diferentes seres vivos entre estos, los humanos. Desde el asentamiento de las primeras culturas en nuestro territorio, la interacción entre los agaves y sus pobladores ha repercutido en un gran número de usos y costumbres en diversos ámbitos como la alimentación, materiales de construcción, fibras textiles, medicina tradicional, cosmetología, artes y hasta en la cosmogonía, lo cual, ha derivado no solo en la diversificación de especies, sino también en el posicionamiento de esta relación planta-hombre como una interacción única en todo el mundo.

A lo largo de la historia, los usos y costumbres del maguey han permanecido presentes en la cultura mexicana, no obstante, bajo diferentes circunstancias (principalmente culturales), han sufrido presiones negativas que han puesto en riesgo la riqueza y el conocimiento que se ha logrado obtener de estas particulares plantas. Recientemente, su uso y valorización se han incrementado debido entre otras cosas, a su amplio espectro de aprovechamiento y a su alta adaptabilidad a condiciones ambientales extremas y baja disponibilidad de agua. Esto ha repercutido para algunas especies de agaves de interés comercial, en la adopción de estrategias agronómicas que buscan, no solo incrementar la producción sino también el mejoramiento en las cualidades de los agaves. Por otro lado, debido a la sobreexplotación y a la pérdida de sus ecosistemas naturales, algunas especies de agaves presentan algún grado de vulnerabilidad que amenaza su persistencia de manera silvestre lo cual se agrava debido a las características inherentes de este grupo de plantas, particularmente sus largos ciclos de vida y monocarpia presente en algunas especies. En este sentido, el uso de herramientas de la biotecnología vegetal como el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, así como técnicas de biología molecular, nos permite contribuir de manera efectiva al aprovechamiento, la protección y conservación de especies de agaves.

Una técnica que forma parte del cultivo *in vitro* de tejidos vegetales es la embriogénesis somática indirecta, cuya principal característica es la obtención de embriones derivados de células somáticas que han pasado por una etapa conocida como callogénesis o tejido “calloso”, el cual, posteriormente es diferenciado en embriones somáticos y desarrollados en una planta completa. Esta peculiar técnica se caracteriza por un incremento en la división celular aumentando con ello la tasa de alteración genética conocida como variación somaclonal. Si bien, en muchas ocasiones no es deseable este tipo de variación, en otras es una excelente alternativa, principalmente si el objetivo es orientado al mejoramiento vegetal, ya que los cambios obtenidos en las plantas regeneradas a partir de esta técnica pueden ser transmitidos a las generaciones siguientes. Una manera que permite verificar parcialmente la presencia de variación somaclonal es mediante la implementación de técnicas moleculares, tales como el uso de marcadores moleculares.

Los agaves son un recurso fitogenético invaluable para México y el mundo, ya que además de su riqueza y función biológica, representan una alternativa para el desarrollo sostenible desde el punto de vista ecológico y social. La implementación de protocolos biotecnológicos, como el desarrollo de embriogénesis somática puede generar estrategias eficientes enfocadas a la protección y conservación, así como alternativas para el rescate y la reinversión del aprovechamiento de este valioso recurso vegetal.

El presente trabajo describe en una primera etapa, la inducción de tejido calloso y diferentes respuestas morfogénicas en cinco diferentes especies de agaves; posteriormente, tomando en cuenta la mayor eficiencia de inducción de callo por explante, se eligieron *Agave parryi* var. *huachucensis* y *A. wocomahi* para el desarrollo de protocolos para la obtención de embriones somáticos, así como un análisis mediante el uso de marcadores moleculares, con el fin de verificar la presencia de variación somaclonal en embriones somáticos generados a partir de ambas especies.

## ANTECEDENTES

### Origen e historia de los agaves

Los agaves, mejor conocidos por su nombre vernáculo como magueyes, han sido plantas características de los paisajes áridos y semiáridos de México, en donde sobresalen por su gran variedad de tamaños y formas que han adoptado como resultado de un largo proceso evolutivo (Cervantes-Ramírez, 2002). Se estima que los agaves se originaron hace entre 7.9 y 10.2 millones de años, durante la época del Mioceno en los desiertos de norte América. Esto coincide con un incremento en las condiciones secas en el centro de México, no obstante se estima que hace 3 - 2.5 millones de años fue cuando aparecieron el mayor número de especies de agaves, esto aparentemente asociado a la evolución de caracteres reproductivos y a síndromes de polinización resultado de presiones impuestas por los polinizadores (Jiménez-Barron *et al.*, 2020; Good-Avila *et al.*, 2006; Rocha *et al.*, 2006).

Como resultado del tipo de agave, época y región donde habitan o habitaron diferentes culturas y grupos humanos, estas plantas son conocidas por una gran variedad de nombres. Entre la cultura mexicana se distinguen los siguientes: los mexicas las conocieron con el nombre genérico de *metl* (náhuatl), los mayas como *ki*, los otomíes como *uada*, los zapotecos como *doba*, los mixtecos como *yabi* y los purépechas como *akamba*. Cabe señalar, que dependiendo la región, puede existir una gran diversidad de agaves, por lo que existen nombres locales para cada especie, no solo en el territorio mexicano, sino en otras regiones de América, como es el caso de *pita*, *cabuya*, *fique*, *mezcal* y *maguey*. La palabra “maguey” fue traída a México por los españoles y parece ser de origen antillano, derivada de las palabras *meguey* o *magheih*, el cual, es uno de los vocablos más comunes en la actualidad, para referirse a las especies de agaves. No obstante, con el objetivo de clasificar botánicamente estas especies de plantas, fue hasta 1753 que el botánico sueco Carlos Linneo lo designa con el nombre genérico de *agave* palabra derivada del griego *agavos*, cuya palabra denota algo admirable o noble, por el carácter señorial de muchas especies, pero también por los feroces dientes del margen de la hoja presentes en muchas especies (Thiede, 2020; Nava-Cruz *et al.*, 2015; García y Serrano, 2014; Cervantes-Ramírez, 2002). De acuerdo con la mitología griega, el nombre de Agave proviene del antiguo griego *Agaue* quien fue la hija de Cadmo, el rey fundador de la antigua ciudad griega de Tebas y de su esposa la diosa Harmonía (Starr, 2012).

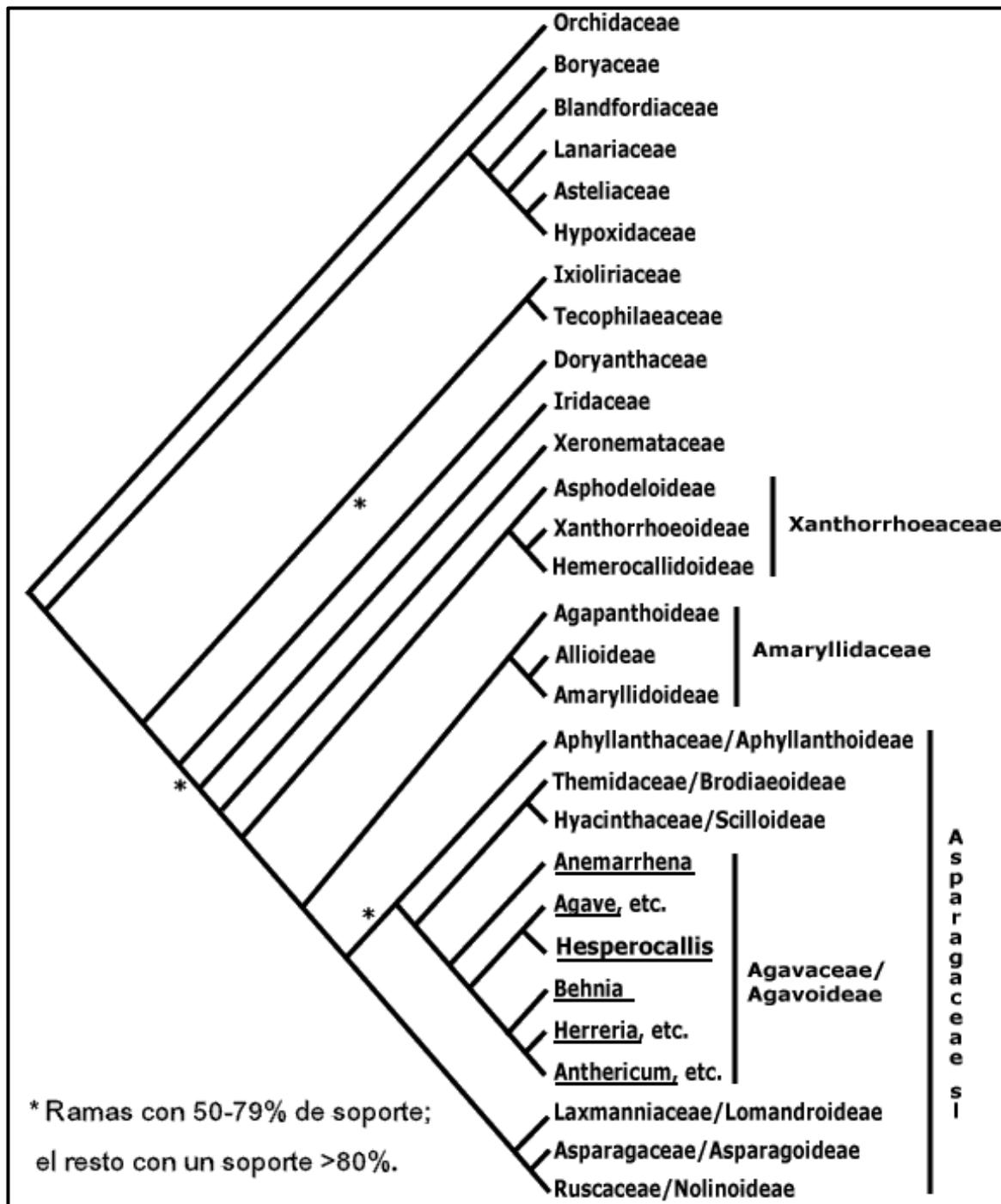
La exportación de agaves a Europa durante el siglo XIX, como novedades ornamentales, fue particularmente numerosa, por lo cual, muchos de los nombres específicos fueron publicados en listas o breves descripciones de plantas de jardín, hecho poco usual en la sistemática botánica (Cervantes-Ramírez, 2002).

Los agaves se clasifican dentro del género *Agave* el cual, fue mencionado por vez primera en 1753 por Carlos Linneo dentro de su obra *Species Plantarum*, donde lo ubica dentro de la clase VI, Hexandria Monogynia, y reconoce cuatro especies (García-Mendoza *et al.*, 2019; Starr, 2012). Estas plantas se han caracterizado por su difícil determinación taxonómica, prueba de esto, son las múltiples ocasiones en que el género ha sido colocado en distintas familias; Amaryllidaceae, Liliaceae, Asparagaceae y Agavaceae. En esta última familia se clasificó junto con los géneros *Bravoa*, *Furcraea*, *Hesperaloe*, *Hesperoyucca*, *Manfreda*, *Polianthes*, *Prochnyanthes*, *Pseudobravoa* y *Yucca* (García-Mendoza *et al.*, 2019; Starr, 2012); los cuales, además de ser nativos de América, compartían la característica de poseer cinco cromosomas largos y veinticinco cortos, con algunas excepciones derivadas de especies poliploides, las cuales poseen la copia de dos o más conjuntos de cromosomas haploides (Rocha *et al.*, 2006; Starr, 2012).

La familia Agavaceae fue propuesta desde 1841 por el botánico austriaco Stephan Endlicher, posteriormente, Dahlgren en 1985 generó una propuesta que ha sido ampliamente aceptada, pues ha sido basada en análisis morfológicos y moleculares; en ella, se considera que la familia Agavaceae incluye 8 géneros con 295 especies, todas nativas de América; cabe señalar, que todos los géneros se encuentran presentes en el territorio mexicano (Eguiarte *et al.*, 2000).

Una clasificación más reciente, propuesta por el APG IV (por sus siglas en inglés Angiosperm Phylogeny Group), coloca a los agaves dentro de la familia Asparagaceae, subfamilia Agavoideae en el género *Agave* (Figura 1). De acuerdo con este equipo de trabajo, esta familia es difícil de caracterizar morfológicamente; algunas de las subfamilias tienen varias apomorfías distintivas y fáciles de reconocer, mientras que otras son difíciles de observar. Algunas apomorfías como el endospermo helobial, de pared gruesa y la ausencia de hueso en fruto pueden ser encontradas en este nivel. Por otro lado, las homoisoflavanonas encontradas en Scilloideae son poco comunes en las plantas con flores, aunque también se encuentran en *Camassia* (Agavoideae) y *Ophiopogon* (Nolinoideae). Las flores de todo el grupo son, en su mayoría, un tipo de "lirio" poco distinguido y con frecuencia son bastante pequeñas. Especialmente la subfamilia Agavoideae y Nolinoideae son

muy heterogéneas, por lo que varias familias se han segregado de ellas en el pasado (www.mobot.org, revisado el 23 de diciembre del 2021; APG IV, 2016; APG III, 2009).



**Figura 1. Relaciones filogenéticas en Asparagales.**

(Modificado de Stevens, 2001 revisado el 30 de noviembre del 2021; APG IV 2016; APG III, 2009).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Dentro de la subfamilia Agavoidea se encuentran cinco grupos, entre los cuales está presente el Agaveae. En general esta subfamilia se describe como un grupo caracterizado por hierbas, trepadoras, arbustos o árboles arborescentes. Pueden ser plantas pequeñas a muy grandes, rizomatosas; endospermo helobial, de pared gruesa y hemicelulósica; con tallos cuyo crecimiento secundario puede ser anómalo; comúnmente reproduciéndose por yemas vegetativas laterales. Sus hojas son alternas, espiraladas, en rosetas en la base o en los ápices de las ramas, simples, usualmente suculentas; láminas enteras a espinoso-aserradas, usualmente con una punta espinosa en el ápice, venación paralela, presencia de vaina basal envainadora. Las inflorescencias son determinadas, terminales o axilares, usualmente panículas, o espigas, grandes y multifloras. Las flores son actinomorfas o apenas zigomorfas, bisexuales o unisexuales (plantas dioicas), con 6 tépalos, por lo común gruesos y carnosos, frecuentemente blancos o amarillentos (sin manchas); con el androceo de 6 estambres, filamentos libres, en ocasiones adnados a la base de los tépalos; con gineceo gamocarpelar, ovario súpero o ínfero, con 3 carpelos y 3 lóculos; estilo corto o largo y estigma capitado, 3-lobado o 3-ramificado; placentación axilar y óvulos anátropos. Los frutos son cápsulas septicidas o frutos baciformes cuyas semillas pueden ser pocas a numerosas, negras, aplanadas. Debido a su alta diversidad genética, los agaves pueden encontrarse en casi todos los ambientes naturales, particularmente en regiones áridas, confiriéndoles una presencia cosmopolita; no obstante, su distribución natural es exclusiva del continente americano, la cual, se extiende en una amplia franja desde California a Florida en el sur de los Estados Unidos hasta el sur de América, con una gran presencia en Arizona, las Antillas y México (Stevens, 2001, revisado 30 de noviembre 2022; García-Mendoza, 2011; Klopper *et al.*, 2010; Colunga-García Marín *et al.*, 2007; Bogler *et al.*, 2006; Good-Avila *et al.*, 2006; Rocha *et al.*, 2006).

La diversidad del género *Agave* en México es aún muy confusa, ya que dependiendo del autor se puede mencionar un rango de especies de entre 116 y 310, las cuales se categorizan en el subgénero *Littaea* con un aproximado de 53 especies distribuidas en ocho grupos y el subgénero *Agave* con un aproximado de 113 especies distribuidas en 12 grupos. No obstante, todos los autores concuerdan que en el territorio mexicano se encuentra el centro de origen del género, ya que se estima del 75 al 80% de riqueza de especies con respecto al total mundial, destacando la presencia del 55% en especies endémicas (Jiménez-Barron *et al.*, 2020; García-Mendoza *et al.*, 2019; Colunga-García Marín *et al.*, 2007; Golubov *et al.*, 2007; Gil-Vega *et al.*, 2007; Rocha *et al.*, 2006; Bogler *et al.*, 2006; Castillo *et al.*, 2006; Good-Avila *et al.*, 2006; Illsey Granich *et al.*, 2005; Eguiarte *et al.*, 2000; Gentry, 1982). Cabe señalar que las especies categorizadas en el subgénero *Littaea* presentan una distribución más

restrictiva, principalmente en territorio mexicano y que la mayor diversidad de especies de agaves se encuentra en las regiones de la Sierra Madre Occidental, en el cañón “Barranca de Meztitlán” dentro del valle de Tehuacán-Cuicatlán y en el desierto Chihuahuense (Rocha *et al.*, 2006).

La diversidad de especies de agaves es el resultado de procesos continuos de selección biológica, así también como humana iniciada hace unos 10,000 años por la población nativa (Paker *et al.*, 2010). El aprovechamiento de los agaves se remonta a la época prehispánica (10,000 a 8,000 años a.C.) en Mesoamérica y áreas semiáridas de Norteamérica, tal como lo atestiguan los restos de hojas mascadas y fibras encontradas en Coahuila y el valle de Tehuacán, además de vestigios de distintos artefactos, tales como asadores, cuchillos y complejos de piedras apiladas, asociados con su cultivo y procesamiento del agave, esto sugiere, que esta planta fue cultivada y comercializada, y que constituyó antes que el maíz, la principal fuente de carbohidratos para la población prehispánica (Paker *et al.*, 2010; Klopper *et al.*, 2010; Colunga-García *et al.*, 2007).

Por otro lado, la riqueza pictórica y cerámica prehispánica relacionada con los agaves, ilustra las múltiples experiencias que tenían nuestros antepasados utilizando como eje central y de manera integral a los agaves. Dichas expresiones del arte indican, entre otros aspectos, que los agaves formaban parte importante del mundo de las culturas de México (Colunga-García *et al.*, 2007). Por ejemplo, se tienen conocimiento que en la cultura mexicana, el uso del agave tuvo su mayor auge al final del período postclásico (1300-1519 d.C.), principalmente para el aprovechamiento de sus fibras (García-Mendoza y Galván, 2001). Lo anterior y otras evidencias más, indican que los agaves fueron de suma importancia para los pueblos indígenas desde el punto de vista económico, social y ecológico (Castillo *et al.*, 2006).

Las múltiples cualidades del agave han sido la base sobre la cual, los grupos humanos nativos de México han construido una profunda interrelación ancestral con estas plantas. Se ha documentado hasta 74 especies y 28 taxa infraespecíficos con diversos usos (Colunga-García *et al.*, 2007; Castillo *et al.*, 2006). De esta interrelación ha resultado una alta diversidad de germoplasma y de sistemas de manejo agrícola, producto de la selección y el cuidado de variedades que no habrían prosperado sin la intervención del hombre, así como una gran variedad de productos culturales, tangibles e intangibles, que hoy distinguen a los grupos culturales nativos y mestizos que conforman nuestro país (Colunga-García *et al.*, 2007).

Además de la producción de carbohidratos para convertirlas en alcohol, los agaves también pueden producir muchos otros satisfactores humanos, entre estos destacan la elaboración de productos alimenticios y bebidas no alcohólicas y fermentadas, su utilización como plantas medicinales y de ornato, así como en cercos vivos. También destaca el uso de algunos agaves en la elaboración de biocombustibles, de forraje y abono, y de materiales para la construcción y herramientas como cepillos y armas. Las fibras de algunos agaves son utilizadas como materia prima para la costura de cestas de cacería o pesca, canastos, cuerdas, redes, bolsas, vestimenta, decoraciones, sandalias y papel (Hodgson *et al.*, 2018; Narváez-Suárez *et al.*, 2016; Nava-Cruz *et al.*, 2015; Miguel-Luna *et al.*, 2014; García y Serrano, 2014; Klopper *et al.*, 2010; Colunga-García *et al.*, 2007; Rocha *et al.*, 2006; Castillo *et al.*, 2006).

En la actualidad, en gran parte por el avance biotecnológico, las especies del género *Agave* son de considerable importancia económica ya que disponen las bases de algunas industrias (Narváez-Suárez *et al.*, 2016; Good-Avila *et al.*, 2006), como el de las bebidas alcohólicas (SAGARPA, 2017; Escalante *et al.*, 2016), endulcorantes (Jimenez-Sánchez *et al.*, 2020) nutracéutica (Leal-Díaz *et al.*, 2016), farmacéutica (Ferraiuolo *et al.*, 2018), biocombustibles (Jones *et al.*, 2020; Flores-Gómez *et al.*, 2018) y fibras naturales (Ramawat and Ahuja, 2016; Nava-Cruz *et al.*, 2015).

Un ejemplo es la industria del aguamiel, en forma de pulque, ya que además de comercializarse envasado (Narváez-Suárez *et al.*, 2016), es también utilizado por la industria panificadora (Castillo *et al.*, 2006). Otro ejemplo, es el uso como jarabe, el cual está cobrando gran relevancia en la industria alimenticia por sus características nutricionales y nutracéuticas, esto en parte, basado en los azúcares que se acumulan en las piñas, los cuales son extraídos mediante hidrólisis ácida y que son ricos en inulinas, mejor llamadas agavinas (Mancilla-Margalli and López, 2006), las cuales poseen características altamente apreciadas para diabéticos o para combatir la obesidad (Pérez-López and Simpson, 2020; Colunga-García *et al.*, 2007; García-Mendoza y Galván, 2001).

La industria automotriz, de los muebles, así como la de la construcción, han iniciado la utilización de materiales compuestos en parte con fibras de agave, para la elaboración de frenos, puertas, plafones y morteros reforzados (Gunjal and Chougule, 2022; Colunga-García *et al.*, 2007). También son utilizados para dividir parcelas agrícolas y en traspatio como cercos vivos (Castillo *et al.*, 2006). También, las pencas del maguey se emplean como forraje en períodos muy secos (Reyes-Castro *et al.*, 2022; Castillo *et al.*, 2006), así como las inflorescencias (Golubov *et al.*, 2007). En la

gastronomía, sus hojas se utilizan en la elaboración de barbacoa y mixiotes (Nava-Cruz *et al.*, 2015; Castillo *et al.*, 2006); además sus hojas secas son aprovechadas como combustible (Castillo *et al.*, 2006).

Los agaves son plantas de importancia económica, no solo para México, sino también para otros países de Latinoamérica y el resto del mundo, tales como en Kenia y Tanzania, Estados Unidos de América y Australia (Nava-Cruz *et al.*, 2015). Estas plantas han conseguido una reputación mundial como uno de los cultivos del futuro, esto es debido a sus características peculiares, que le permiten que se adapte a ecosistemas áridos, semiáridos y templados; además es una planta que demanda baja precipitación y se adapta a entornos de extrema sequía, suelos con bajos niveles de nutrimentos, laderas de cerros y bajas temperaturas (Castillo *et al.*, 2006). Las características de las raíces y hojas de los agaves han permitido utilizarlos en multitud de sistemas agrícolas para captar humedad atmosférica y lluvia, así como para mantener el suelo en terrenos con alta pendiente. Está ampliamente documentado que los agaves en México fueron y son utilizados por los agricultores tradicionales en multitud de sistemas agrícolas, principalmente localizados en laderas, para la formación de obras como terrazas y bordos, ayudando al control de los escurrimientos de agua y al control de la pérdida de suelo (Colunga-García *et al.*, 2007). Se han establecido prácticas agronómicas específicas para cada tipo de producto final y producción de biomasa. Sorprendentemente, algunas especies de agaves producen una gran cantidad de biomasa en zonas semiáridas con ciclos de vida de 5 a 6 años (Nava-Cruz *et al.*, 2015).

De acuerdo con cifras del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), la superficie sembrada de agave en el país en el año 2020 fue de aproximadamente 130 mil hectáreas, de las cuales casi 26 mil fueron cosechadas y se obtuvo una producción de 1.9 millones de toneladas, con un valor de producción por encima de los 33 millones de pesos (<https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>, revisado el 7 de enero del 2022).

Inherente a sus características biológicas como su alta productividad de biomasa en áreas limitantes, especialmente de agua, los agaves cumplen una insustituible función en los ecosistemas que habitan, ya que mantienen relaciones biológicas y ecológicas complejas entre ellos y con otras especies de plantas y animales, proveyendo múltiples servicios ambientales, tales como el mantenimiento del suelo y de las poblaciones de polinizadores importantes (Colunga-García *et al.*, 2007), los cuales incluyen abejas, pájaros, polillas y murciélagos como *Leptonycteris curasoae*, *L.*

*nivalis* y *Choeronycteris mexicana*, estos últimos en peligro de desaparecer (Gómez-Ruíz *et al.*, 2019). Se sugiere que estos mamíferos han tenido una gran implicación en la especiación del género *Agave* (Good-Avila *et al.*, 2006).

El género *Agave* es uno, dentro de las angiospermas, que no presentan especies en la lista roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN); no obstante, de acuerdo al Convenio Internacional para el Comercio de Especies en Peligro (CITES), únicamente se encuentran dos especies en el Apéndice I (*Agave arizonica* Gentry & J.H.Weber y *A. parviflora* Torr., esta última distribuida en Estados Unidos de América y México) y una especie en apéndice II (*Agave victoriae reginae* T. Moore; especie endémica de México). Esto implica que a escala mundial en términos legales, únicamente se protege al 1.5 % de los agaves mexicanos, lo cual, los coloca como poco protegidos dentro del sistema legal internacional, a pesar de que la gran mayoría son silvestres, algunos de ellos se encuentran en peligro de desaparecer y que representan un recurso real y potencial muy valioso (Golubov *et al.*, 2007).

Por otro lado, en México se encuentran un total de 18 especies protegidas dentro de la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010 (Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo), de las cuales, 13 son endémicas; tres especies se encuentran en categoría de peligro de extinción, 6 amenazadas y el resto en protección especial (NOM-059-SEMARNAT-2010, [http://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5420810&fecha=21/12/2015](http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5420810&fecha=21/12/2015); revisado el 8 de enero del 2022).

En general, el grado de conservación *in situ* de los agaves no es favorable en la actualidad, debido a la baja proporción de superficie decretada como protegida, así como por la pobre protección que se les proporciona tanto a escala nacional como internacional. Aunque los taxónomos contribuyen al conocimiento sobre los patrones de distribución geográfica de las especies y la detección de centros de endemismo como elementos valiosos para la planeación y establecimiento de áreas naturales protegidas, se carece de información cuantitativa sobre los procesos ecológicos (biología reproductiva, dinámica poblacional y las interacciones bióticas) y antropogénicos que afectan a estas especies, lo que determina de manera fundamental su grado de conservación y que debe ser considerada como elemento de juicio en la planeación de la conservación de la biodiversidad, fundamentalmente de plantas endémicas. Entre los principales problemas antropogénicos que afectan

la conservación natural de los agaves figuran: la destrucción y la modificación de los hábitats causados por la expansión agrícola, forestal y ganadera, el sobrepastoreo, la expansión de áreas rurales y urbanas y la apertura de vías de comunicación; el uso no sustentable de alguna especie; la colecta excesiva ocasionada principalmente por los coleccionistas y como parte del comercio con fines ornamentales (Golubov *et al.*, 2007).

Por su parte, los jardines botánicos y centros de investigación tienen un papel preponderante en la conservación *ex situ* de germoplasma, especialmente para especies con problemas de conservación. En el género *Agave*, la conservación de semillas, dada su variabilidad genética y la prolongada latencia de algunas de las especies y las técnicas de cultivo de tejidos vegetales, presentan un gran potencial para la conservación. El cultivo *in vitro* de tejidos vegetales en la conservación y uso de los recursos ha tenido un efecto importante en los últimos años, esto debido en parte, a que permite disponer de una potente herramienta en la obtención y permanencia de plantas libres de patógenos, sistemas de propagación masiva en el momento que se requiera, rescate de embriones, clonación y mantenimiento de líneas de investigación para mejorar su conservación, a través de mantener plantas y tejidos en medios específicos a bajas temperaturas para reducir su desarrollo, mantenimiento y regeneración del estado juvenil, entre otras más. El cultivo *in vitro* de tejidos vegetales puede ser de importancia fundamental cuando la población silvestre se ha reducido a unos cuantos individuos, ya que permite la conservación *in vitro* de especies silvestres, así como de variedades agrícolas. En adición, esta tecnología puede tener ventajas sobre las colecciones de plantas vivas bajo condiciones de viveros o jardines botánicos, ya que permite un control estricto de las condiciones de cultivo y crecimiento. Por otro lado, en las especies de alto valor comercial, el desarrollo de programas de uso sustentable en comunidades marginadas puede ser fuente de empleo a través de la transferencia de tecnología de los sistemas de germinación, micropropagación y desarrollo de plantas en viveros hasta tallas comerciales. Estos programas permiten de manera indirecta la conservación *in situ* de aquellas especies con alto valor comercial, a través de abastecer el mercado demandante (Golubov *et al.*, 2007).

Los sistemas agrícolas que incluyen múltiples especies, en los cuales los agaves son incorporados, son los sistemas más estables que se conocen en cuanto a control del suelo y el manejo eficiente del agua y la humedad disponible, también favorecen la biodiversidad que es benéfica para los cultivos y el medio ambiente en general, proporcionan bonos de carbono, permiten la recarga de acuíferos y la práctica de agricultura sustentable aún en terrenos con alta pendiente mediante la

construcción de terrazas (Narváez-Suárez *et al.*, 2016). Por lo tanto, los agaves forman parte importante de la agrobiodiversidad de los sistemas tradicionales en los que se mantienen muchos de los cultivos básicos para la alimentación del pueblo de México, y en la mayoría de los casos, se encuentran integrados a ellos como un medio para conservar el suelo de la erosión. La conservación de la diversidad de los agaves implica también la conservación del suelo y la diversidad de los cultivos básicos como el maíz, los frijoles, las calabazas, los jitomates y los chiles (Colunga-García *et al.*, 2007).

### **Descripción del género *Agave***

Los agaves poseen un rango variable de formas, colores y texturas, lo cual puede cambiar conforme la edad del agave. Sus hojas, también conocidas como pencas, se caracterizan por tener una gran variedad de tamaños y espesores ya que pueden encontrarse delgadas hasta gruesas, por lo común suculentas, aunque también pueden ser fibrosas; además, poseen una cutícula gruesa con presencia de estomas, los cuales se encuentran hundidos. En algunos agaves, se presentan impresiones epidérmicas únicas, las cuales contrastan con la amplia variedad de colores de sus hojas que van, en su mayoría, desde verdes claros hasta oscuros, así como singulares tonalidades de azules y rojos. Dependiendo de la especie, las hojas pueden presentar dientes laterales en sus bordes en su mayoría pronunciadamente curvos, pero también de formas regulares e irregulares, y cabe señalar que algunos agaves pueden carecer de los dientes en sus márgenes, los cuales son remplazados por fibras marginales. También cada hoja puede presentar una espina terminal la cual puede ser larga y ondulada o robusta, o en algunos tipos de agaves estar ausente. En general, las hojas se distribuyen a manera de espiral que forma una densa roseta, la cual, en muchas especies pueden presentar una perfecta simetría; además, la dimensión de la roseta determina el tamaño del agave, el cual varía desde 7.5 cm de alto y 10 cm de ancho, hasta 3 m de alto y 3.5 m de ancho. Los tallos suelen ser gruesos muy cortos y simples, usualmente indistinguibles, rara vez son elongados y ramificados. La raíz es fibrosa y fuerte, y se desarrolla en forma radial y poco profunda. Estas plantas generan inflorescencias generalmente de gran tamaño, las cuales conforme se van elevando, revelan su característico escapo con presencia de brácteas, cuya forma puede ser espigada con flores en pares o paniculada con flores en umbelas racimosas sobre pedúnculos; ambas formas pueden lucir increíbles tonos rojizos, naranjas y amarillos. En general, las flores presentan un perianto tubular a profundamente funeliforme; con seis tépalos erectos o ligeramente curvos similares o dimórficos, imbricados en la prefloración. Cada flor presenta seis estambres que maduran antes que el pistilo y que sobresalen del cáliz o la corola,

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

cuyos filamentos son largos insertados en el tubo o en la base de los tépalos y que terminan en versátiles anteras. También poseen un pistilo elongado, de forma filiforme y tubular; con un estigma trilobular, papiloso y glandular, con un ovario ínfero, succulento, de paredes gruesas con muchas axilas y de forma trilocular. Cada lóculo del ovario contiene óvulos en dos hileras. En caso de fecundación, cada flor puede generar un fruto en forma de cápsula locular que contiene semillas aplanadas y negras, que abre espontáneamente llegada a su maduración (Thiede, 2020; Starr, 2012; Gil-Vega *et al.*, 2007; Bogler *et al.*, 2006; Stevens, 2001 [www.mobot.org](http://www.mobot.org), revisado el 6 de enero del 2022; Granados, 1993; Gentry, 1982).

Los agaves son plantas perennes, pueden crecer en solitario o agrupados y viven por periodos entre 8 a 25 años dependiendo de cada especie. Hasta que alcanzan la madurez sexual están constantemente produciendo nuevas hojas para sustituir a las hojas viejas. El género *Agave* produce una de las más grandes inflorescencias conocidas en todas las plantas; en algunas especies se generan varias inflorescencias durante su ciclo de vida (policarpismo), aunque gran parte de los agaves son predominantemente monocárpicos, lo cual quiere decir que se reproduce solo una vez después de pasados muchos años y luego muere, esto comienza a evidenciarse una vez que se eleva la inflorescencia, cuando la clorofila verde de las hojas se descompone, al mismo tiempo de que sus semillas maduran, marcando el final del ciclo de vida del agave (Aragón, 2014; Good-Avila *et al.*, 2006); no obstante, recientemente se ha propuesto que este género se encuentra mayoritariamente compuesto de especies de plantas clónicas perennes, esto debido a que los agaves comúnmente muestran un tamaño grande y una jerarquía fisiológica entre las ramas más grandes (rosetas), las cuales florecen una sola vez y mueren y, las ramas pequeñas que pueden crecer, florecer y morir mucho después, si las condiciones ambientales les permite. El cariotipo de las especies del género *Agave* es bimodal  $n=30$  cromosomas (5 largos y 25 cortos) y su tipo de herencia es poligénica (Stevens, 2001, [www.mobot.org](http://www.mobot.org), revisado el 6 de enero del 2022; Thiede, 2020; [www.mobot.org](http://www.mobot.org), revisado el 6 de enero del 2022; Lev-Yadun, 2017; Starr, 2012; Bogler *et al.*, 2006; Gentry, 1982).

En general, los agaves entran en el grupo de los organismos clasificados como de ciclo de vida complejo, esto es, que no puede determinarse la edad de los individuos y porque pueden reclutar a la población a partir de distintos tipos de vástagos, así como plántulas vía germinación de semillas. Algunos agaves poseen una alta plasticidad para propagarse de acuerdo con las condiciones ecológicas predominantes, ya que pueden presentar diversas estrategias de reproducción asexual. Una de estas estrategias es a través de la producción de brotes a partir de la parte basal del tallo; también

de forma más frecuente, mediante la generación de brotes subterráneos llamados rizomas que se forman en la base de la roseta junto a las raíces. Las hojas de estos brotes están modificadas, formando una pequeña bráctea que protege a la yema axilar. El rizoma eventualmente crece a la superficie, el número de individuos formados por este método es muy variable. Ambas estrategias muestran altos porcentajes de sobrevivencia y establecimiento (aproximadamente del 99 %), siendo la causa del patrón agregado de las colonias o manchones que caracteriza a la mayoría de las especies de agaves. Otro sistema de propagación es mediante la generación de vástagos foliares axilares, no obstante, es muy raro observar este tipo de estrategia. Finalmente, otro mecanismo de propagación vegetativa es la formación de bulbos (también llamados bulbilos), pequeñas estructuras que se forman en la inflorescencia cuando está unida a la planta o después de que los frutos han caído; este sistema de propagación posee una capacidad de establecimiento aproximadamente del 2 % (Golubov *et al.*, 2007; Robert *et al.*; 1987).

Por otro lado, la mayoría de los agaves presentan una capacidad de propagación sexual en general baja, del 5 % aproximadamente, esto se debe en parte a la baja fecundidad derivada por problemas presentes en su biología de la polinización. A esto se suman otras condiciones ecológicas que determinan la sobrevivencia de las semillas y plántulas, derivadas de factores bióticos como la dependencia de especies de plantas que permitan amortiguar la radiación solar (nodricismo) y la depredación (principalmente la herbivoría); así como factores abióticos como los patrones de precipitación y temperatura, lo cual suelen ser muy azarosos (Golubov *et al.*, 2007).

Los agaves producen una gran cantidad de néctar y polen con el fin de asegurar su polinización, para lo cual son visitados por una enorme cantidad de polinizadores. Durante el día destacan la presencia de las abejas, abejorros, colibríes y aves percheras; y por la noche, diferentes especies de polillas y diversos murciélagos, principalmente de los géneros *Leptonycteris* y *Choeronycteris* quienes aseguran una reproducción de tipo alógama en algunas especies de agaves, esto ha generado un vínculo único entre ambos organismos lo cual ha resultado en una relación de coevolución y mutualismo (Golubov *et al.*, 2007; Rocha *et al.*, 2006; Bogler *et al.*, 2006; Eguiarte *et al.*, 2000 Arizaga *et al.*, 2000).

Por sus características fisiológicas, los agaves son de las plantas que presentan mayor eficiencia en el uso del agua y en la captación de CO<sub>2</sub> atmosférico, lo cual les confiere la capacidad de adaptarse a condiciones de aridez. Una de las principales características que presentan la mayoría de las especies

de este grupo de plantas es la succulencia, lo cual, se evidencia cuando las plantas exhiben un pronunciado almacenaje de agua en uno o más órganos. Los altos grados de succulencia se asocian con mayor frecuencia a otras características que juntas confieren la supervivencia en ambientes limitados de agua. Este “síndrome de succulencia” usualmente incluye características que limitan la pérdida de agua al ambiente, como un metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM siglas del nombre en inglés) vía fotosintética alternativa que permite a la planta captar CO<sub>2</sub> atmosférico en la noche cuando la pérdida de agua se minimiza; así como una epidermis típica de plantas adaptadas a condiciones de aridez, con cutícula gruesa, revestimiento ceroso y una baja densidad estomática con presencia de estomas complejos. En promedio la cutícula mide entre 3 a 15 µm de espesor donde la cutina es el principal componente, la cual permite aislar e impermeabilizar la superficie foliar, particularmente esta característica vuelve impenetrable la cutícula a gases como el CO<sub>2</sub> y al vapor de agua; otras de sus funciones consisten en minimizar la incidencia de rayos UV, proteger de la entrada, así como la retención de contaminantes y proteger contra patógenos y herbívoros. Otras características que confieren capacidad de adaptarse en ambientes áridos son aquellas que permiten maximizar la captación de agua, como son sus amplias rosetas que canalizan y dirigen el agua a la base de la planta, así como un sistema extenso de raíces someras y ramificadas que permite la asimilación rápida de agua en precipitaciones impredecibles; (Zhang *et al.*, 2020; Ogburn and Edwards, 2012; Arakaki *et al.*, 2011; Colunga-García *et al.*, 2007; Good-Avila *et al.*, 2006; Nobel, 2003; Granados, 1993; Wattendorff and Holloway, 1982).

### ***Agave parryi* Engelman**

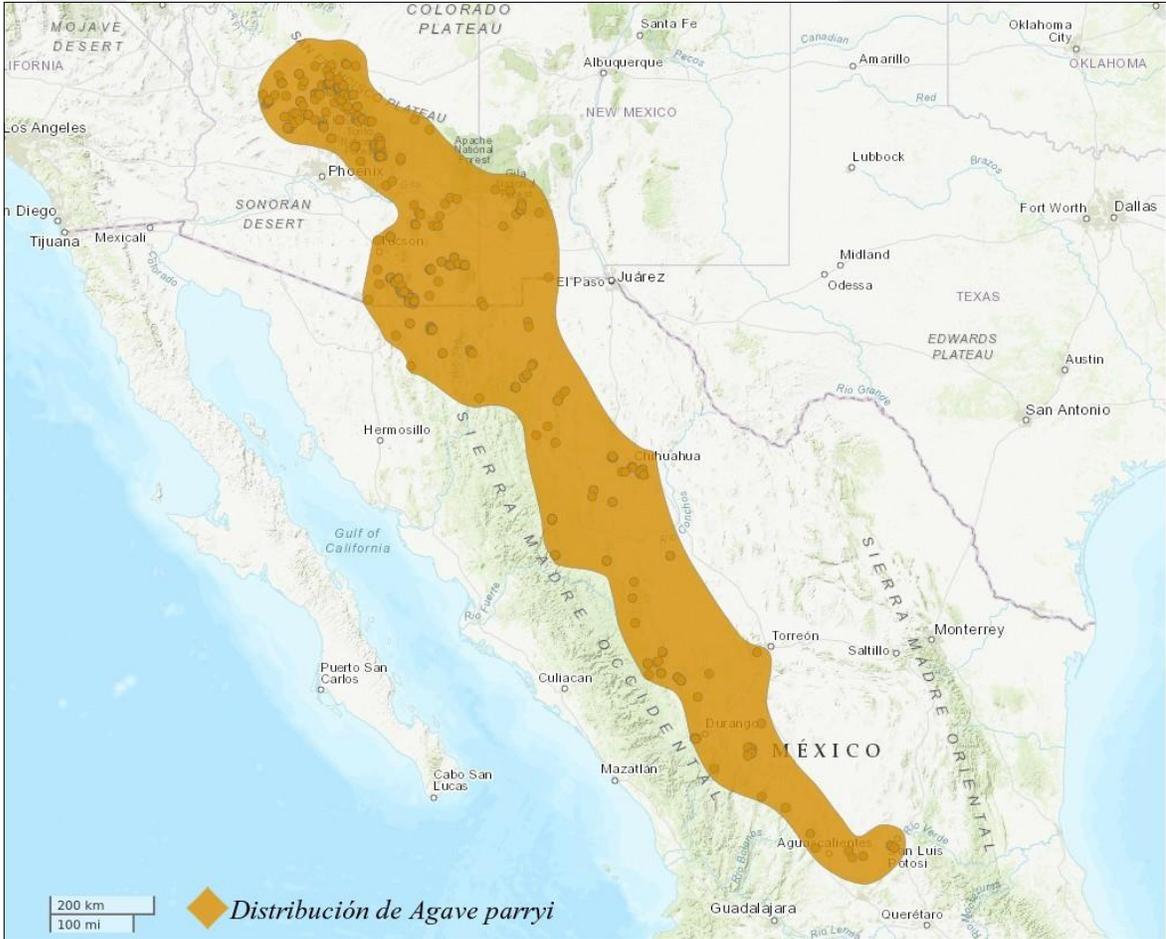
El botánico alemán George Engelman nombró esta especie de agave en honor a su colega inglés Charles Parry. Esta planta se caracteriza por presentar una roseta multifoliada espesa, compacta, con forma globosa, de tamaño mediano de entre 30 a 60 cm de alto por 60 a 90 cm de ancho, con una espectacular densidad de entre 100 a 160 hojas grises glaucas a verde claro en plantas maduras. Las hojas se presentan imbricadas, de forma lineal a ovalada con una brusca terminación en punta aguda; su espesor es grueso y rígido con un largo de 25 a 60 cm por 5 a 12 cm de ancho, con el haz plano y envés redondeado, notablemente más redondeado a la base de la hoja y plano hacia el ápice. Además, las hojas presentan un margen recto provisto con pequeños dientes decurrentes esparcidos cada 1 o 2 cm, de tamaño pequeño de 3 a 7 mm de largo en color marrón oscuro a grisáceo y con una espina terminal café oscura a negra de 1.5 a 3 cm casi plana cerca de la punta (Starr, 2012; Vázquez-García *et al.*, 2007).

La inflorescencia de este agave es de tipo paniculada, de 4 hasta 6 m de altura, con brácteas largas y reflejas sobre el pedúnculo, los cuales son laterales en la mitad superior y pueden ser de 20 hasta 40. Presenta botones florales en color rosado a rojo que al abrirse muestran un intenso tono amarillo dorado y cuyo tamaño puede ser de 6 a 7.5 cm de largo. El ovario de la flor puede medir de 3 a 4.5 cm de largo con un cuello de 6 a 9 mm; con un tubo de 8 a 12 mm de profundidad por 1.5 a 1.8 mm de ancho, carnosos, engrosados y angulosos, profundamente acanalados. Los tépalos presentan una longitud de 1.8 a 2.4 cm con una anchura de 4 a 6 mm, son gruesos, lineares, ascendentes o erectos, con sus bordes encorvados hacia la cara superior, con sus ápices encapuchados y pilosos. Sus filamentos son anchos con una longitud de 4 a 5.5 cm, los cuales se encuentran insertos cerca del orificio del tubo, de 7 a 11 mm arriba de la base; con sus anteras excéntricas de 2 a 2.4 mm de largo en color amarillo. El pistilo rara vez supera la longitud de los estambres y presenta un estigma capitado y trilobado. En caso de fecundación, cada flor puede generar un fruto en forma de cápsula locular de 3 a 5 cm de largo por 1.5 a 2 cm de ancho, ligeramente estipitada que abre espontáneamente llegada a su maduración para liberar las semillas de 7 a 8 mm de largo por 5 a 6 mm de ancho, aplanadas y negras. Esta especie es reportada como tetraploide  $2n=120$  (Hodgson *et al.*, 2018; Starr, 2012; Parker *et al.*, 2010; Vázquez-García *et al.*, 2007).

Es un agave de crecimiento moderadamente lento, considerado monocárpico perenne, que produce hijuelos, lo cual se refleja en agrupaciones densas y peculiarmente atractivas. Es una especie altamente tolerante al invierno con temperaturas hasta los  $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; durante el verano presenta un veloz secado marrón una vez que genera su inflorescencia en los meses de julio a noviembre (Hodgson *et al.*, 2018; Starr, 2012; Parker *et al.*, 2010; Vázquez-García *et al.*, 2007).

El *Agave parryi* se distribuye en ecosistemas con bosque de roble y pino, roble y enebros o en matorral xerófilo, en un rango de altitud entre 1396-1954 m.s.n.m.; desde el sudeste de Arizona, Texas y Nuevo México en Estados Unidos de América (EUA), al noreste de Sonora al límite con Chihuahua, así como en Coahuila, Nuevo León, Tamaulipas, Durango, Zacatecas, San Luis Potosí, Aguascalientes, Jalisco, Guanajuato, Querétaro hasta Hidalgo en México (Figura 2) (Hodgson *et al.*, 2020; Villaseñor, 2016; Starr, 2012; Parker *et al.*, 2010; Vázquez-García *et al.*, 2007). Esta especie ha desempeñado un papel etnobotánico importante dentro de los distintos grupos nativos de esas regiones, disponiendo de múltiples usos alimenticios, medicinales, fibras y otros materiales; debido a esto, este agave ha logrado posicionar un gran legado histórico y cultural que aún sigue vigente.

Evidencia de esto, es que esta planta ha sido colectada por diversos grupos étnicos entre ellos los Apaches por lo menos hace 600 años atrás; así también, se conoce que los pobladores precolombianos del sudeste de Arizona conocidos como Hohokam practicaron el cultivo del agave en gran escala, ya que se ha encontrado una gran superficie campos agrícolas con pilas de piedra alineadas, grandes hornos de tierra para la cocción de agaves, herramienta de piedra para cosechar y aprovechar esta planta como cuchillos, martillos, cucharas y diferentes restos de agave carbonizado; lo cual sugiere que el uso del agave era destinado para la elaboración de alimentos, bebidas, fibras y suministros artesanales (Nabhan *et al.*, 2019; Hodgson *et al.*, 2018; Paker *et al.*, 2014; Paker *et al.*, 2010; Vázquez-García *et al.*, 2007; Minnis and Plog, 1976; Gentry, 1972).



**Figura 2. Distribución de *Agave parryi* (Hodgson *et al.*, 2020).**

Por otro lado, *Agave parryi* es una especie de suma importancia para el sostenimiento de ecosistemas áridos y semiáridos, participando como pilar biológico de distintas especies nativas de zonas áridas, tales como es el caso de los murciélagos nectívoros *Leptonycteris nivalis* y

*Choeronycteris mexicana*, ambos en peligro de desaparecer (Gómez-Ruíz *et al.*, 2019; Lindsay *et al.*, 2012). Desafortunadamente, además de que *Agave parryi* está dentro de la lista roja de la UICN (Hodgson *et al.*, 2020) y que la destrucción de su hábitat silvestre sigue en aumento, futuros escenarios climáticos no son alentadores, ya que estudios indican la desaparición de hasta el 75 % de sitios de interacción entre los agaves y murciélagos polinizadores, teniendo efectos negativos en la reproducción sexual y variabilidad genética en los agaves, incrementando la vulnerabilidad a desaparecer en ambas especies (Gómez-Ruíz *et al.*, 2019).

*Agave parryi* muestra una considerable variabilidad, posiblemente como resultado a su amplia distribución. Esto ha derivado en el reconocimiento de dos subespecies *Agave parryi* ssp. *Neomexicana* y *Agave parryi* ssp. *Parryi*; esta última dividida en cuatro variedades; *couesii*, *huachucensis*, *parryi* y *truncata*. La distinción entre las variedades es algo ambigua, por ejemplo, la variedad *couesii* presenta flores y hojas pequeñas en comparación con la inflorescencia ampliamente paniculada con largas flores y hojas robustas de la variedad *huachucensis*, o respecto a la variedad *truncata*, la cual se distingue por sus hojas pequeñas con agudo a truncado ápice. En tanto la subespecie *neomexicana* posee hojas que tienden a ser sinuosas, con inflorescencia corta y ramificaciones pequeñas. Si bien las variedades son muy débilmente diferenciadas, al parecer hay una separación geográfica entre ellas lo cual sustenta la separación entre variedades (Starr, 2012).

### ***Agave parryi* Engelman var. *huachucensis* (Baker) Little ex Benson**

También conocido como agave huachuca, agave alcachofa, agave Hohokam, mescal de la mancha; es la variedad que desarrolla las rosetas más grandes de 45-60 cm de alto por 75-90 cm de diámetro, las cuales se consideran de las más uniformemente simétricas (Figura 3). El color de sus hojas varía de verde amarillento a gris verdoso azulado con forma ovalada lanceolada de 30-60 cm de largo con 10-20 cm de ancho; en su mayoría dientes pequeños y rectos sobre su margen. En comparación con otras variedades, las hojas son rígidas, gruesas, casi planas y su porción media es más ancha, la cual se estrecha bruscamente hasta su letal espina negra terminal de 2.5 cm de largo. Una vez llegada su madurez, comúnmente durante el mes de mayo, comienza la formación de una inflorescencia de panícula ancha de hasta 4.5 m de longitud con 23 cm de circunferencia y con 20 o más ramas cada una cargada de atractivas flores amarillas a doradas y brillantes. Estas últimas tienen un tamaño aproximado de 70 mm, se caracterizan por su corto y grueso tallo floral, con un ovario de 27.6 mm de longitud, un cuello de 6.6 mm y un tubo de 7.4 mm de profundidad. Los lóbulos de los

tépalos internos miden 18.7 mm y el externo 20 mm de longitud; su filamento en color amarillo mide 47.9 mm y la antera 19.4 mm de longitud, esta última presenta un color amarillo verdoso al igual que el estigma (Roll *et al.*, 2021; Nabhan *et al.*, 2019; Sánchez-Escalante *et al.*, 2018; Starr, 2012).

Una característica destacable en esta variedad de agave es su capacidad de resistencia a temperaturas gélidas de hasta -12 °C sin sufrir daños aparentes; además, es una especie considerada típicamente clonal con una reproducción principalmente vegetativa vía rizoma, lo cual, resulta en la formación de densos grupos de individuos que pueden ser de hasta cientos de plantas distribuidas en superficies de tan solo 50 m de diámetro, esto supone una baja diversidad genética dentro de sus poblaciones. Por otro lado, aún no se ha documentado el número de cromosomas presentes en esta variedad, aunque se sugiere que pueda ser tetraploide  $2n=120$ , al igual que la variedad *couesii* (Roll *et al.*, 2021; Starr, 2012).



**Figura 3.** Plantas de *Agave parryi* var. *huachucensis*. Foto de Charles Hedgcock (Sánchez-Escalante *et al.*, 2018).

Este peculiar agave se distribuye en las montañas con bosque de roble y pino y en afloramientos de piedra caliza sobre montículos y crestas; y forma parte de la flora representativa de las denominadas “Islas del cielo” ubicadas entre el Borde de Mogollon en Arizona central, E.U.A. y la Sierra Madre Occidental en el este de Sonora, México. Esta región atesora el Monumento Nacional Chiricahua, y las montañas Huachuca al sudeste de Arizona, sitio donde este agave fue colectado por vez primera; así como las sierras La Elenita-La Mariquita y la Sierra La Púrica esta última dentro del Área de Protección de Flora y Fauna “Bavispe” donde también se ha reportado su distribución (Nabhan *et al.*, 2019; Carnahan *et al.*, 2018; Sánchez-Escalante *et al.*, 2018; Van Devender *et al.*, 2018).

La utilización de este agave como alimento ha sido asociada con varios grupos étnicos de las áreas de Arizona, Nuevo México, Texas, en E.U.A. y Sonora y Chihuahua en México; entre estos destacan la cultura Uto-Nahua, especialmente los O’odham (Piman) y los Apaches Chiricahua, así como grupos de la prehistoria Jocomo y Hohokam con quienes se sugiere, tuvo una enorme importancia para su subsistencia (Nabhan *et al.*, 2019).

### ***Agave wocomahi* Gentry**

Conocido comúnmente como mescal verde, mescal cenizo Ojocomo (Tarahumara), lechuguilla verde (Rio Mayo) o wocomahi (Figura 4). Este agave se distingue por sus hojas verdes oscuras, aunque pueden presentarse gris verdosas o verdes glaucas, con textura suave y lisa y consistencia carnosa, gruesa y rígida, de 30 a 90 cm de largo, por 9 a 25 cm de ancho; con forma lanceolada, rara vez ovaladas y algo estrechadas hacia la base. Los márgenes de las pencas son rectos a ondulados con presencia de dientes espaciados de color marrón oscuro, de tamaño grande de 1 a 2 cm de largo, curvados irregularmente a menudo con flexión hacia abajo y con dientes intersticiales más pequeños que aparecen irregularmente. Su típica forma en roseta puede presentar dimensiones de 1.2 a 2 m de diámetro y 0.8 a 1.3 m de altura. Una vez que llega a su maduración, desarrolla una inflorescencia delgada con forma paniculada de entre 3 a 7 m de altura, con presencia de brácteas de 15-20 cm de largo adpresas en la parte media y con 8-15 panículas laterales en la tercera parte superior. Sus flores en color amarillo miden 65-85 mm de largo, cuyo ovario es verde claro en forma cilíndrica de 34 a 40 mm de largo; con tubo amarillo claro, ranurado en forma de embudo. Los tépalos amarillos son de 15 a 23 mm de largo por 5 mm de ancho, visiblemente erectos, lineales, con capucha en la punta con

frecuencia en color rojo. Los filamentos son de 60 a 65 mm de largo, con anteras amarillas y grandes de 26 a 34 mm de largo y su pistilo con una gran cabeza estigmática. Presenta frutos a manera de cápsulas loculicidas, oblongas de 50 a 60 mm de largo y 15 mm o más de diámetro; con semillas de 7 mm de largo y 4.5 a 5 mm de ancho, en negro brillante a su madurez (“*Agave wocomahi*” Texto disponible bajo una licencia de atribución de Creative Commons CC-BY-SA [www.llifile.com](http://www.llifile.com) 14 de noviembre de 2005, /Encyclopedia/SUCCULENTS/Family/Agavaceae/18149/Agave\_wocomahi, revisado el 10 de enero del 2022; Starr, 2012; Klopper *et al.*, 2010; Gentry, 1972).



**Figura 4. Planta juvenil de *Agave wocomahi***

La mayoría de las partes de este agave contienen bajas cantidades de saponinas y son relativamente dulces por lo que es utilizada en la elaboración de productos alimenticios y bebidas (Klopper *et al.*, 2010); derivado de esto, la piña y las flores son consumidas por los grupos Warihio, Tarahumaras y en comunidades montañosas de Sinaloa (García y Serrano, 2014; Gentry 1972). Además, esta especie también es utilizada como herramienta de pesca (Figueredo *et al.*, 2018), para la producción de Mezcal (García y Serrano, 2014; Bahre and Bradbury, 1980) y las fibras de las hojas, comúnmente llamada ixtle, se utilizan para la elaboración de almohadillas de cuerda, cordones, cuerda y sandalias (García y Serrano, 2014; Gentry, 1972).

La distribución de este agave es reportada en sitios como Guajaray, Mesa el Campanero y Sierra de Yecora, en el sureste de Sonora, adyacente a Tutuaca Área de Protección de Flora y Fauna, al Parque Nacional Cascada de Basaseachi, la Sierra Charuco, Sierra Guicorichi y Rio Mayo adyacente a Huicorichi, Sierra Charuco, Sierra Guicorichi y Rio Mayo en Chihuahua. También se ha reportado en Surotato en Sinaloa hasta al sur de Durango, así como en Zacatecas y norte de Jalisco (IPNI, 2022 revisado el 4 de noviembre del 2022; [www.naturalista.mx/taxa/281068-Agave-wocomahi](http://www.naturalista.mx/taxa/281068-Agave-wocomahi), revisado el 4 de noviembre del 2022; Villaseñor 2016 y Klopper *et al.*, 2010; Gentry 1972). Se caracteriza por crecer en áreas abiertas asociadas a bosque de encino y encino-pino, en laderas de montañas rocosas de piedra caliza y a una altura de entre los 1400 a 2500 msnm (Figura 5), dentro de un clima templado-cálido, aunque puede resistir condiciones extremas de hasta -3°C, así como altas temperaturas ([www.naturalista.mx/taxa/281068-Agave-wocomahi](http://www.naturalista.mx/taxa/281068-Agave-wocomahi), revisado el 4 de noviembre del 2022; “*Agave wocomahi*” Texto disponible bajo una licencia de atribución de Creative Commons CC-BY-SA [www.lifl.com](http://www.lifl.com) 14 de noviembre de 2005, /Encyclopedia/SUCCULENTS/Family/Agavaceae/18149/Agave\_wocomahi, revisado el 10 de enero del 2022; Klopper *et al.*, 2010; Gentry 1972).



**Figura 5. Distribución geográfica de *Agave wocomahi*.** Distribución basada en: IPNI, 2022 revisado el 4 de noviembre del 2022; [www.naturalista.mx/taxa/281068-Agave-wocomahi](http://www.naturalista.mx/taxa/281068-Agave-wocomahi), revisado el 4 de noviembre del 2022; Villaseñor 2016; Klopper *et al.*, 2010 y Gentry 1972.

Desafortunadamente, se ha observado escasa frecuencia de esta especie en el estado de Durango y sus alrededores, sugiriendo dificultades en su conservación al menos para esta región (González-Elizondo *et al.*, 2009); esto puede agravarse con la destrucción de su hábitat, a su sobreexplotación y a su largo ciclo de vida el cual puede durar de 10 hasta los 15 años; donde su biología reproductiva depende exclusivamente de la generación de semillas mediante fertilización cruzada, debido a que es una especie autoestéril, sumado a que a diferencia de otras especies de agaves, *Agave wocomahi* no produce hijuelos como estrategia de propagación (Starr, 2012; Gentry, 1972).

### **La biotecnología vegetal**

En la actualidad, la implicación de la biotecnología es determinante en nuestra vida cotidiana, ya que dispone de una amplia gama de bienes comúnmente dirigidos a la solución de problemas tanto del ser humano como de su entorno. Independientemente del campo de aplicación, ya sea el médico, energético, agrícola, ambiental, entre otros más; la biotecnología se caracteriza por el conjunto de técnicas que utilizan a los seres vivos o sus propiedades para la producción de bienes (Chavre, 2020); de esto deriva, que cuando se implica el manejo biotecnológico de plantas o derivados de estas, se asocia con la rama de la biotecnología vegetal.

La biotecnología vegetal proporciona diversas herramientas para un mejor conocimiento de las características genéticas de las plantas, así como para producir en masa organismos vegetales mejorados y para conservar dichos recursos genéticos. En este contexto, las aplicaciones biotecnológicas se basan en dos grandes campos de actividad, frecuentemente interconectados. Por una parte, las técnicas y metodologías propias de la biología molecular han dado origen al campo de los marcadores, especialmente de ADN, al de la genómica y al de la transformación genética. Por otra parte, la tecnología del cultivo *in vitro* de células, tejidos y órganos, ha permitido el desarrollo de técnicas de conservación de material vegetal, así como de la posibilidad de regenerar plantas completas expresando las propiedades de totipotencia celular. Actualmente, la biotecnología vegetal es una de las disciplinas científicas que ofrece una alternativa real para la resolución de un gran número de problemas relacionados con el aprovechamiento de las plantas por parte del hombre. Una de las bases de esta disciplina es el cultivo de tejidos vegetales (Pérez-Molphe *et al.*, 1999).

## **Cultivo de tejidos *in vitro***

Se le llama cultivo de tejidos vegetales (CTV) al conjunto de técnicas que permiten el establecimiento, mantenimiento y desarrollo de cualquier parte de una planta, desde una célula, tejido u órgano hasta un organismo completo, bajo condiciones axénicas y de nutrición y ambiente controladas (Oseni *et al.*, 2018; George *et al.*, 2008; Pérez-Molphe *et al.*, 1999). El CTV es una herramienta invaluable para la resolución de problemas básicos y aplicados en la biología vegetal, ya que por una parte ofrece una serie de sistemas modelo ideales para la investigación fisiológica, bioquímica, genética y estructural, y por otro lado tiene una aplicación práctica en la multiplicación clonal, preservación o conservación y manipulación *in vitro* de cualquier material vegetal (Fehér, 2019; Pérez-Molphe *et al.*, 1999).

Las aplicaciones del tejido de cultivo vegetales pueden abarcar áreas como el comportamiento celular, modificación vegetal, bancos de germoplasma y plántulas libres de patógenos, formación de productos y propagación clonal; dentro de esta última se encuentra la micropropagación, la cual se define como el cultivo aséptico de células, tejidos, órganos y sus componentes bajo condiciones fisicoquímicas definidas *in vitro* (Gupta *et al.*, 2020; Oseni *et al.*, 2018).

El CTV es una herramienta que se basa en tres principios básicos, que en cuya comprensión y manipulación depende el éxito o fracaso de cualquier trabajo en este campo. Los principios básicos son los siguientes:

*Elección del explante.* Se le llama explante al órgano, tejido o segmento de tejido vegetal que va a ser utilizado para iniciar el cultivo. Este puede ser una semilla, un embrión aislado, un segmento de hoja, de tallo, de cotiledón, de raíz o de órganos reproductores entre otros. El tipo de explante que se elija será determinante para la obtención de la respuesta deseada, ya que cada uno de ellos responderá de manera diferente al cultivo. Entre más joven sea un tejido, más fácil será su adaptación y respuesta al cultivo *in vitro* (Pérez-Molphe *et al.*, 1999). Se debe considerar el tipo de cultivo que se desea establecer, el propósito del cultivo y el tipo de especie vegetal con el que se trabajará (George *et al.*, 2008).

*Elección del medio y condiciones de cultivo.* El medio de cultivo, junto con el tipo de explante, determina la respuesta que se obtendrá del mismo, por lo cual su elección y formulación

son los aspectos fundamentales para el éxito del CTV. El medio de cultivo de tejidos vegetales es un suplemento nutritivo de compuestos orgánicos e inorgánicos usados para el cultivo de tejidos vegetales. El medio se compone de tres componentes básicos: elementos esenciales (iones normales), suplementos orgánicos y una fuente de carbono (Gupta *et al.*, 2020). Los componentes esenciales son aquellos que satisfacen los requerimientos nutricionales básicos del tejido cultivado, incluyen a los nutrientes minerales y algunas vitaminas. Existen compuestos opcionales, como las fitohormonas o reguladores del crecimiento vegetal (RCV) que determinan en gran medida el tipo de respuesta que se obtendrá, y por lo tanto influyen en el éxito o fracaso de los cultivos *in vitro*. Además de la formulación del medio, es importante considerar las condiciones físicas del cultivo (luz, fotoperiodo, temperatura, atmósfera, agua disponible y el pH), ya que estas contribuyen también a la respuesta del explante, particularmente el pH afecta el crecimiento de la planta y la actividad de los RCV (Oseni *et al.*, 2018; Pérez-Molphe *et al.*, 1999).

*Condiciones asépticas.* Para que el cultivo de un tejido vegetal prospere, debe excluirse del mismo a cualquier microorganismo contaminante. Es por ello que tanto el material vegetal, como el medio de cultivo deben esterilizarse para evitar cualquier tipo de contaminación (Pérez-Molphe *et al.*, 1999).

El crecimiento y desarrollo de cualquier tejido vegetal es un proceso sumamente complejo en el cual intervienen un gran número de factores externos e internos; entre los factores internos que controlan el desarrollo de los diferentes tejidos de una planta destacan los llamados RCV, los cuales son compuestos orgánicos sintetizados por la propia planta, que en muy pequeñas cantidades juegan un papel crucial en muchos procesos involucrados en el crecimiento o en los patrones de desarrollo de los tejidos vegetales (Zažímalová *et al.*, 2007; Pérez-Molphe *et al.*, 1999).

En la composición del medio de cultivo, los RCV tienen profundos efectos en la respuesta del explante inicial; ya que juegan un rol esencial en determinar la vía de desarrollo de células y tejidos vegetales en un medio de cultivo, y el tipo y concentración de RCV utilizadas dependen principalmente de planta, su tejido u órgano cultivado y así como el objetivo del experimento (Oseni *et al.*, 2018).

Las auxinas y citocininas son los RCV más ampliamente utilizados en el CTV y su cantidad determina el tipo de cultivo establecido o regenerado. Las altas concentraciones de auxinas

generalmente favorecen la generación de raíces, mientras que la alta concentración de citocininas promueve la división celular y la generación de brotes. Un equilibrio entre auxinas y citocininas permite el desarrollo de una masa de células conocidas como callo (Oseni *et al.*, 2018).

Las auxinas son importantes RCV esenciales para muchos aspectos del crecimiento y desarrollo de las plantas (Kasahara, 2016); son moléculas simples que funcionan como señales móviles entre células, tejidos y órganos, implicadas espacial y temporalmente en la coordinación de la morfogénesis en plantas como respuesta a su entorno ambiental. Muchos procesos del desarrollo en plantas parecen ser dependientes de la distribución asimétrica local de las moléculas de auxinas. Esto incluye el desarrollo embriogénico, formación del eje basal y apical, desarrollo de raíz, formación de órganos, morfogénesis floral y en los cambios de dirección de crecimiento de la raíz y tallo (gravitropismo y fototropismo respectivamente); en otras palabras, las auxinas están fundamentalmente involucradas en la “forma de la planta” (Cancino-García *et al.*, 2020; Zažímalová *et al.*, 2007).

Las auxinas, así como otros compuestos reguladores del crecimiento de plantas, pueden ser transportados pasivamente en tejidos vasculares, y en tales casos, la dirección de este movimiento es determinado por el flujo de masas. En contraste a esto, también existe un flujo activo de auxinas (célula a célula), en el cambium vascular y células parenquimatosas del xilema, las cuales trabajan en paralelo con el movimiento de auxinas a través de tejidos vasculares pero el cual es estrictamente direccional. Este movimiento direccional de auxinas célula a célula es conocido como transporte de auxinas polar y ha sido propuesto en los efectos fisiológicos de las auxinas (Zažímalová *et al.*, 2007).

El ácido indolacético (AIA) es la auxina más estudiada. Estudios genéticos y bioquímicos demuestran que el AIA es principalmente sintetizado del L-triptófano vía indol-3-piruvato, así también se produce a partir del L-triptófano vía indol-3-acetaldoxima. Por otro lado, existe una vía biosintética independiente del L-triptófano (Kasahara, 2016). En la década de 1930, el AIA fue identificado como la primera auxina y fue demostrada su presencia en plantas; desde entonces algunos estudios han demostrado que las auxinas son moléculas de señalización que regulan la división celular, elongación y diferenciación vegetal, dependiendo de sus concentraciones (Kasahara, 2016; Zažímalová *et al.*, 2007). Actualmente, se conoce que el AIA es esencial para prácticamente cualquier aspecto del crecimiento y desarrollo de las plantas, incluyendo embriogénesis y tropismos (Kasahara, 2016).

Las citocininas son una clase de reguladores de crecimiento vegetal que tienen diversos efectos en las funciones fisiológicas de las plantas. Tienen diversas estructuras moleculares derivadas de la adenina, caracterizadas por poseer cadenas isoprenoides o aromáticas laterales unidas en la posición N<sup>6</sup> del anillo de adenina (Liu *et al.*, 2020; Romanov *et al.*, 2018; Kakimoto, 2003). Son sintetizadas por la isopentenil transferasa o la tRNA isopentenil transferasa y las enzimas LONELY GUY, mientras que la conjugación de las citocininas es llevada a cabo principalmente por la enzima citocinina oxidasa (Cortleven *et al.*, 2019; Wybouw and De Rybel, 2019). Las citocininas juegan un rol importante como moléculas de señalización en la comunicación a larga distancia entre órganos en la regulación del crecimiento en respuesta al nitrógeno (Sakakibara, 2021). En la raíz influyen en la diferenciación de células del xilema y mantienen la simetría bilateral, además de que promueven la división celular durante el desarrollo vascular. En las hojas controlan la senescencia y la división celular en la epidermis, así como el número de estomas. También se encuentran implicadas en etapas del desarrollo floral y del gametofito femenino. Las citocininas son vitales para el desarrollo del meristemo apical en los brotes, siendo capaces de inducir la formación de brotes en tejido calloso y se ha documentado la capacidad de transdiferenciar primordios de raíces laterales a meristemas apicales de brotes (Wybouw and De Rybel, 2019). Además, participan en la defensa contra el estrés ocasionado por fitopatógenos, herbívoros, temperatura, sequía y salinidad (Cortleven *et al.*, 2019).

### **Tejido calloso**

Se le denomina tejido calloso a una masa amorfa de células vegetales poco diferenciadas, que se multiplican rápidamente y de manera desorganizada. En condiciones silvestres este tejido aparece como un mecanismo de cicatrización cuando se presentan heridas o bien en tumores “agallas” inducidos por algunos organismos fitopatógenos como la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* (Pérez-Molphe *et al.*, 1999). El tejido calloso es el resultado de la reprogramación celular o tisular debido a condiciones que anulan las restricciones de diferenciación celular o tisular. El tejido calloso de diversos orígenes puede expresar una amplia variedad de genes que los distinguen, especialmente en las primeras fases de su desarrollo. A pesar del hecho de que los tejidos callosos pueden ser formados de diferentes vías iniciales, tejidos callosos establecidos muestran ser caracterizados por una red de factores de transcripción que facilitan el cambio de destino y regeneración celular. Basado en esto, el tejido calloso es un tejido transitorio, similar al blastema de animales, pero que puede ser mantenido por largo tiempo bajo condiciones controladas (Fehér, 2019). La aparición natural de tejido calloso

se da como consecuencia de un cambio en los niveles endógenos de reguladores de crecimiento, básicamente auxinas y citocininas, las cuales actúan en el metabolismo de las células ya que inducen el cambio de un estado quiescente a uno de activa división. En este proceso la diferenciación celular da lugar a nuevo tejido el cual es compuesto de células tipo meristemáticas y no especializadas (George *et al*, 2008). Cabe señalar que en plantas la “desdiferenciación” es fuertemente asociada con la formación de callo, aunque el término callo es ampliamente considerado como la proliferación de una masa de células desdiferenciadas, en el sentido estricto, la desdiferenciación es la reversión de la diferenciación, por lo tanto, las células diferenciadas no son formadas a partir de callo. Además, evidencias en explantes de *Arabidopsis* muestran la formación de tejido calloso a partir de células meristemáticas del periciclo por lo que no es requisito prescindir de la desdiferenciación a partir de células somáticas diferenciadas. De esta manera, la formación de callo puede ser considerada como un tipo de transdiferenciación, no obstante, esto sigue en discusión ya que un estado de “célula desdiferenciada” no existe (Fehér, 2019). Durante la formación de callo nuevos meristemas son formados en el tejido, los cuales dan lugar a células que muestran características similares a las del parénquima, aunque los estudios citológicos demuestran que es un tejido heterogéneo en cuanto a su composición celular, donde comúnmente se aprecian vasos y traqueidas (xilema), células que contienen cloroplastos y, aunque muy difícilmente de distinguir, tubos cribosos del floema. En el tejido calloso es más probable encontrar traqueidas que cualquier otro tipo de célula diferenciada (George *et al*, 2008). Se sabe, que a partir de un explante vegetal, la tasa de formación de tejido calloso y la sucesiva proliferación *in vitro* depende en gran medida del tamaño inicial de la población celular, esto es, la formación y proliferación de tejido calloso, progresan rápidamente en una alta densidad celular y progresan lentamente en una baja densidad celular. Este fenómeno se debe a la interacción entre células mediada por factores químicos que están involucrados en el crecimiento celular, principalmente reguladores de crecimiento vegetal y péptidos conocidos como factores de crecimiento llamados fitosulfocinas (Matsubayashi and Sakagami, 2006). Las características del tejido calloso cultivado *in vitro* dependen de los reguladores de crecimiento vegetal utilizados, de la especie y órgano de que fue tomado el explante inicial, y de las condiciones físicas de incubación (Pérez-Molphe *et al.*, 1999).

Además de mantener un crecimiento amorfo, el callo también presenta distintas características como su consistencia, textura, color, velocidad de crecimiento y potencial morfogenético, dependiendo de la especie de planta, tipo y edad del explante utilizado (George *et al*, 2008) y también la estrategia de inducción mediante diferentes estímulos fisicoquímicos, como por ejemplo la adición

de reguladores de crecimiento vegetal al medio de cultivo. Una de las propiedades más importantes del tejido calloso es la llamada friabilidad. Ésta puede ser definida como la tendencia de las células a separarse unas de otras, por lo que un tejido calloso friable es aquel que se disgrega fácilmente. Por lo general, las altas concentraciones de auxinas en el medio de cultivo favorecen la friabilidad del tejido, mientras que la presencia de citocininas tiende a producir tejidos de consistencia más dura. La friabilidad es una propiedad deseable cuando se pretende utilizar el tejido calloso para iniciar cultivos de células en suspensión (Pérez-Molphe *et al.*, 1999).

Es importante mencionar, que algunas de las diferencias presentes entre un tejido calloso y otro, puede depender de las variaciones epigenéticas. Esta variabilidad se incrementa cuando el tejido calloso deriva de un explante que se compone por más de un tipo de célula; por ello, para lograr un cultivo de callo más homogéneo es de suma importancia seleccionar un tejido inicial morfológicamente uniforme, o incluso, puede iniciarse un cultivo a partir de células individuales o pequeños agregados, utilizando técnicas que consisten básicamente en el uso de filtros que permiten la separación de grandes agregados celulares (George *et al.*, 2008).

### **Inducción del tejido calloso**

Datos recientes de transcriptomas soportan el punto de vista de que el tejido calloso puede ser formado de diferentes vías, las cuales convergen en la misma red regulatoria de genes que coordina el estrés, las fitohormonas y las respuestas del desarrollo. No obstante, el conjunto de genes expresados en varios tipos de tejidos calloso solo se superpone parcialmente (Fehér, 2019).

Con un medio de cultivo adecuado, casi cualquier tejido vegetal que contenga un alto número de células viables es capaz de producir tejido calloso. Se sabe que sólo unas pocas células del explante inicial son las que dan lugar a este tejido; usualmente éstas son localizadas en la superficie del inóculo o adyacentes a las heridas producidas al tomar el explante. Además, la facilidad para establecer un cultivo de callo depende en gran medida del órgano y la especie del que proviene el explante, por ejemplo, la elección del tejido del cual puede iniciarse el cultivo de callo es mayor en especies dicotiledóneas que en monocotiledóneas. Para la inducción del tejido calloso se requiere un medio de cultivo (como el MS, el B5 o el K) rico en nutrientes, generalmente sólido, en el que se utiliza comúnmente agar como agente solidificante, y además una concentración adecuada de auxinas y citocininas. La inducción de tejido calloso se produce cuando la proporción de auxinas es superior a

la de las citocininas. Se ha observado que son en realidad las primeras las responsables de la aparición de este tipo de tejido, mientras que las citocininas sólo favorecen su proliferación. En ciertas especies la inducción de tejido calloso puede lograrse agregando únicamente auxinas al medio de cultivo (Pérez-Molphe *et al.*, 1999). Aunque en algunos casos, cuando la proporción de citocininas es superior a las auxinas, se han logrado mejores resultados (Yin and Hong, 2010; Prado *et al.*, 2007). Las auxinas más utilizadas para la inducción de tejido calloso son el 2,4-D, el AIA y ANA, mientras que las citocininas que más se utilizan son la cinetina y la BA (Pérez-Molphe *et al.*, 1999). El tejido calloso también puede ser inducido en respuesta a otras hormonas o heridas. Las heridas regulan la biosíntesis y señalización de citocininas, permitiendo la activación de proliferación celular y formación de tejido calloso (Fehér, 2019).

### **Mantenimiento del tejido calloso**

Este tipo de tejido puede obtenerse y mantenerse *in vitro* con relativa facilidad cuando se manejan apropiadamente las concentraciones de los reguladores del crecimiento vegetal (Pérez-Molphe *et al.*, 1999). Al primer tejido calloso formado a partir del explante original, se le denomina “callo primario”, y al subsecuente cultivo se le denomina “callo secundario”. Dada la alta tasa de proliferación que muestra este tipo de tejido se requieren subcultivos cada 3-8 semanas (dependiendo de la especie), para mantenerlo en un estado adecuado. Si los subcultivos no se realizan con la frecuencia apropiada se presenta el agotamiento de los nutrientes y la desecación del medio, así como la acumulación de desechos metabólicos potencialmente tóxicos que pueden causar la necrosis del tejido. Para el subcultivo deben tomarse sólo aquellos fragmentos de aspecto sano que no muestren señales de deshidratación, obscurecimiento o necrosis, y transferirlos a un medio de cultivo fresco. Este medio suele ser el mismo en que se dio la inducción del tejido, aunque en algunos casos puede reducirse la concentración de auxinas y añadir suplementos como el hidrolizado de caseína y extracto de malta, que en algunas especies ayudan a mantener al tejido en crecimiento continuo. En cuanto a la adición de citocininas, hay algunos tejidos que las requieren para mantener la proliferación de los mismos, mientras que para otros, aparentemente no son necesarias. Lo que sucede en realidad es que ciertos tejidos tienen niveles endógenos de citocininas suficientes para mantener su proliferación, por lo que no requieren de una fuente exógena de las mismas (Pérez-Molphe *et al.*, 1999).

Para tener datos más precisos acerca del crecimiento del tejido calloso cultivado *in vitro* y, por lo tanto, para conocer el efecto de los reguladores de crecimiento u otros tratamientos aplicados, debe

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

determinarse la tasa de crecimiento del tejido. El método más sencillo para hacer la determinación es mediante la medición del peso fresco del tejido al momento de la inoculación y luego al final de cada subcultivo. Este método tiene la ventaja de no dañar al tejido; sin embargo, se puede ver influido por el estado de hidratación, por lo que no aporta un dato preciso sobre la ganancia real de biomasa. Alternativamente, se puede utilizar la ganancia en peso seco como medida más precisa de la ganancia en biomasa del tejido, pero la desventaja obvia de este método es la pérdida del tejido al hacer la determinación. Otros métodos para determinar la tasa de proliferación del tejido son la determinación del número de células por unidad de peso, el índice mitótico, la tasa de respiración (Pérez-Molphe *et al.*, 1999), así como la utilización de modelos matemáticos basados en mediciones no destructivas (Ramos-Parra *et al.*, 2010). El tejido calloso puede mantenerse por tiempo indefinido cuando se hacen los subcultivos apropiados. Las condiciones en que se mantiene el tejido calloso favorecen de una manera aún no comprendida del todo, la aparición de cambios genéticos y epigenéticos como lo son las aberraciones cromosómicas, mutaciones y diferentes tipos de ploidías (Pérez-Molphe *et al.*, 1999), las cuales están asociadas con mutaciones puntuales, reordenamientos y recombinación cromosomal, metilación del DNA, acetilación de Histonas, alteración del número de copias de secuencias y elementos transponibles o transposones (Dubrovna and Bavol, 2011; Jain, 2001); que en conjunto causan una gran variabilidad genética en estas células. Se ha visto que la variación somaclonal está influenciada por el genotipo, el nivel de ploidía, el tipo de explante, el medio de cultivo (debido principalmente a la influencia de los reguladores de crecimiento), la edad de la planta donadora, el tipo de planta, el potencial morfogénico, el número de subcultivos y edad del callo (Dubrovna and Bavol, 2011; Jain, 2001). Incluso el sistema de tejido de cultivos por sí mismo, actúa como un sistema mutagénico, ya que el patrón de desarrollo que sigue un explante durante su morfogénesis *in vitro* es un elemento clave que se relaciona con la variación somaclonal; por ejemplo, cuando un tejido altamente diferenciado pasa por una etapa con una alta tasa de división celular, se puede generar mayor variación somaclonal que cuando ocurre un desarrollo directo hacia regeneración a partir de yemas apicales, axilares y embriones (Dubrovna and Bavol, 2011; Sánchez-Chiang y Jiménez, 2009), esto es debido a que las células experimentan reprogramación durante la regeneración de la planta lo cual es diferente a las condiciones naturales. Esta reprogramación o reestructuración de los acontecimientos puede crear un amplio rango de variaciones epigenéticas en las plantas nuevamente regeneradas (Dubrovna and Bavol, 2011; Jain, 2001). Estos cambios generalmente causan una pérdida progresiva de la capacidad morfogénica de los tejidos. Esta capacidad es la que les permitiría regenerar órganos o plantas completas. Esto debe tomarse en cuenta cuando se utiliza el tejido calloso para estudios genéticos o cuando se pretende la regeneración de plantas a partir del mismo.

## Usos del tejido calloso

El tejido calloso tiene varias aplicaciones en el cultivo de tejidos vegetales. Primeramente, por su fácil mantenimiento en condiciones controladas y su rápida proliferación, resulta un modelo apropiado para estudios sobre el metabolismo celular, producción de compuestos secundarios y anticuerpos (Gupta *et al.*, 2020; Efferth, 2019; Ram *et al.*, 2011; Sir-Andrijany *et al.*, 1999; Indrayanto *et al.*, 1993), fitotoxicología (Muscolo *et al.*, 2005), ultraestructura celular (Guha and Rao, 2010), regeneración de órganos (Huang *et al.*, 2012; Sena *et al.*, 2009; Atak and Celik, 2009; Chengalrayan *et al.*, 2005), expresión genética (Duncan *et al.*, 2003) y caracterización molecular (Li *et al.*, 2007; Nishimura *et al.*, 2005). También es muy útil para el estudio de los mecanismos celulares de respuesta a diferentes tipos de estrés como déficit hídrico (Hassan *et al.*, 2004; Shibli and Al-Juboory, 2002), salinidad (Chen *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2006), temperaturas extremas (Benderradji *et al.*, 2012; Song *et al.*, 2008) y ataque de patógenos (Han *et al.*, 2006), entre otros. Otra aplicación consiste en la conservación a largo plazo de germoplasma mediante la criopreservación, ya que ha sido demostrado ser un método eficiente y alternativo para el mantenimiento a largo plazo de callo embriogénico (Oseni *et al.*, 2018; Hong and Yin, 2012; Yin and Hong, 2010), entre otros beneficios, este método evita una pérdida en el potencial embriogénico y minimiza la variación somaclonal. Por otro lado, los cultivos de células en suspensión, que tienen también varias aplicaciones, usualmente se inician a partir de tejido calloso. Por último, el tejido calloso puede ser un paso intermedio para la regeneración de plantas por las vías de organogénesis y/o embriogénesis somática. En el primer caso, en el explante original se induce la aparición de tejido calloso organogénico a partir del cual se da la formación de brotes adventicios. A este proceso se le conoce también como organogénesis indirecta. En el segundo caso, a partir del explante original (que en muchos casos es un embrión cigótico), se induce la aparición de un tejido calloso embriogénico el cual es mantenido en un medio de cultivo rico en auxinas. La aparición de embriones somáticos a partir de este tejido se da al reducirse o eliminarse las auxinas. No todo el tejido calloso tiene potencial organogénico o embriogénico, por lo que la regeneración de plantas a partir de este tejido no siempre es posible (Pérez *et al.*, 1999).

Debido a las variaciones genéticas y epigenéticas que aparecen en las células del tejido calloso, es posible regenerar plantas fenotípicamente diferentes a la planta original que fue utilizada como fuente del tejido. Este hecho hace que el tejido calloso sea útil en programas de mejoramiento genético en los que la variabilidad genética natural de algún cultivo importante está muy reducida. Siempre se

debe tener una fuente de variación genética de la cual se pueda partir para seleccionar individuos con características agronómicas deseables (Pérez *et al.*, 1999). En este sentido, se ha trabajado con tejido calloso con la finalidad de obtener nuevos cultivares que permitan solucionar problemas agronómicos y/o buscar rasgos fisiológicos de interés por medio de este fenómeno, como por ejemplo resistencia a enfermedades, tolerancia a la sequía (Lu *et al.*, 2006), tolerancia a la salinidad (Benderradji *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2011), mejora en la apariencia de la planta, flores y frutos, tamaño, sabor, fragancia, sincronización de periodos florales y mayor producción de metabolitos de interés. Algunos ejemplos son los trabajos realizados en kiwi (Prado *et al.*, 2007) donde se estableció un protocolo para la generación de tejido calloso con la finalidad de buscar variación genética que permitiera obtener gonocorismo funcional en esta especie; en algunos cítricos (Xu *et al.*, 2011) donde se utilizó callo de cítrico como un sistema alternativo de investigación para el entendimiento de la regulación de carotenogénesis. Sin embargo, durante la micropropagación y en bancos de germoplasma *in vitro*, este tipo de variación es indeseable ya que para estos fines es de suma importancia mantener al máximo la uniformidad genética (Priyanka *et al.*, 2021; Sánchez-Chiang y Jiménez, 2009).

### **Generalidades sobre la embriogénesis somática**

La embriogénesis somática (ES) es una técnica muy útil para la conservación de germoplasma *in vitro* y para su mejoramiento genético (Efferth, 2019; Monja-Mio and Robert, 2016). La ES se define como un proceso de formación, a partir de células somáticas, de estructuras que siguen los patrones de histodiferenciación que conducen a un patrón corporal similar al de los embriones zigóticos (Sáenz *et al.*, 2006). En la ES, los embriones son formados asexualmente a partir de células somáticas. La ES se asocia comúnmente con el cultivo *in vitro* de tejidos en un medio nutritivo suplementado con reguladores de crecimiento vegetales. Sin embargo, ES puede ocurrir naturalmente como en el caso de las hojas suculentas de las especies de *Kalanchoe* y un tipo de ES puede ocurrir también *in vivo* a través del proceso de apomixis, donde las plantas desarrollan embriones en el óvulo sin su fertilización y la semilla fértil es producida con el mismo genotipo que el parental (Chandra and Pandey, 2017; Quero *et al.*, 2010; Nolan and Rose, 2010).

El desarrollo de ES *in vitro* es clasificada en *indirecta*, donde el tejido inicial sufre una rápida división celular para formar una masa relativamente desorganizada de células llamada “callo”, de donde posteriormente emergen los embriones somáticos; y *directa*, donde los embriones se forman del explante sin una fase intermedia de callo. En ambos tipos de ES, los embriones aparentan

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

embriones zigóticos. En plantas dicotiledóneas, pasan a través de las etapas embrionarias: globular, corazón, torpedo y cotiledonar, tal como ocurre en embriones zigóticos (Nolan and Rose, 2010). En el caso de las monocotiledóneas pasan por las etapas embrionarias globular, en el cual el embrión tiene una forma esférica y se fija mediante el suspensor al tejido materno; la etapa escutelar con la formación del cotiledón y; la etapa coleoptilar (Montero-Cortés *et al.*, 2010). Los embriones pueden germinar y producir plantas fértiles. Una de las mayores diferencias entre los embriones somáticos y zigóticos es que en los primeros no se observa la desecación y dormancia, sino más bien continúan con el desarrollo de germinación tan pronto como son formados completamente (Nolan and Rose, 2010).

Existe una considerable variación de métodos usados para inducir la ES en diferentes plantas. Se ha aprendido acerca de la importancia del tipo de explante y el rol de auxinas y citocininas aplicadas exógenamente, así como otras condiciones de cultivo. En algunas especies, diferencias genóticas entre plantas afectan la habilidad embriogénica, por lo que la respuesta ante tratamientos varía según la especie con la cual se esté trabajando (Nolan and Rose 2010; Von Arnold *et al.*, 2002).

Recientemente, han sido descubiertos otros factores como el estrés y proteínas secretadas en el medio implicados durante la respuesta de la ES. Estos factores junto con el aumento de descubrimientos genéticos han permitido un mejor entendimiento de dicho proceso, en este sentido es importante mencionar la habilidad de la sobreexpresión de ciertos factores de transcripción para inducir la ES, independientemente de la adición de reguladores de crecimiento exógenos (Nolan and Rose, 2010).

Uno de los factores que deben de considerarse en la inducción de la ES es la selección del cultivar y tipo de explante. La respuesta de ES es genóticamente dependiente para cada especie incluso con una variación significativa entre cultivares. Esto puede verificarse en algodón, soya, cebada, trigo y palma (Nolan and Rose, 2010; Von Arnold *et al.*, 2002). Si una especie no ha sido previamente regenerada para ES, entonces es importante evaluar diferentes cultivares. Para determinar el tipo de tejido que debe usarse como explante es recomendable basarse en estudios previos de ES ya sea en la misma especie o en especies, género o familias cercanas. Los embriones zigóticos (u otros tejidos en un estado meristemático), son una fuente de explante muy usada ya que los embriones somáticos se formarán más fácilmente de células que ya están en un estado embriogénico, no obstante, los embriones pueden ser muy tediosos de aislar. Otra opción es el uso de

tejido de plántula ya que muestra un buen proceso de regeneración, también se ha encontrado que tejidos de hoja, raíz, peciolos o tallo, pueden ser utilizados. Como regla general, el tejido seleccionado como explante inicial deberá ser el más joven y sano posible (Nolan and Rose, 2010).

Otro factor para considerar es el medio de cultivo utilizado, el cual deberá proveer los nutrientes esenciales para el crecimiento de la planta, una fuente de carbón y reguladores de crecimiento apropiados para el crecimiento y la inducción de embriones somáticos. Aunque diferentes y numerosos medios de cultivo han sido utilizados, muchos de ellos han sido basados en muy pocas formulaciones originales, tales como la de Gamborg (medio B5), Murashige and Skoog (medio MS) Nitsch and Nitsch (medio NN) o Schenk and Hildebrandt (medio SH). Los reguladores de crecimiento deberán ser considerados fuera de los nutrientes del medio basal. A parte de requerir una adecuada nutrición para el crecimiento y división celular, la ES puede ser mejorada por la regulación, el tipo y la concentración de los nutrientes del medio de cultivo. El nutriente más importante al respecto es el nitrógeno, ya que el tipo de nitrógeno utilizado tiene una fuerte influencia en la inducción de la ES. Frecuentemente, es requerida la presencia de amonio o alguna otra fuente de nitrógeno reducido como la glicina, el glutamato o la caseína hidrolizada. La relación de amonio a nitrato tiende también a afectar la ES. La optimización de la fuente de carbono, potasio, fósforo o calcio ha sido demostrado que afecta positivamente a la ES. Una fuente de carbono, generalmente la sacarosa, es necesaria ya que el tejido de la planta no es capaz de suministrar su propio carbono a través del proceso de la fotosíntesis. La tiamina y myo-inositol parecen ser las vitaminas más importantes en el medio de cultivo. La adición de hidrolizado de caseína provee de aminoácidos esenciales que no pueden ser sintetizados por el tejido cultivado (Nolan and Rose, 2010).

Los reguladores de crecimiento son otro factor para considerar, ya que, aunque el medio basal puede influenciar la respuesta hormonal, es el regulador de crecimiento quien conduce la respuesta de la ES. La hormona más importante en la inducción de ES es la auxina. La auxina sintética ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) es la mayormente utilizada para la inducción de la ES, aunque el ácido 1-naftalenacético (ANA), el ácido indol-3-butírico (AIB), el picloram (ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico) y el ácido indol-3-acético (AIA) también son utilizados. El AIA es una auxina natural, tiende a ser fácilmente desnaturalizada en comparación con las auxinas sintéticas 2,4-D y ANA. Las auxinas estimulan la formación de masas proembriogénicas, las cuales son cúmulos de células dentro de una población celular, que son competentes a formar ES. Una vez que las masas proembriogénicas han sido formadas, estas pueden desarrollarse a un estado globular de

embriogénesis, pero entonces su posterior desarrollo es bloqueado por la acción de las auxinas. La eliminación o reducción de auxinas en el medio de cultivo, permite a las masas proembriogénicas desarrollarse en algunos embriones somáticos. Algunas especies de plantas son capaces de formar embriones somáticos usando auxinas como única fuente de regulador de crecimiento, pero otras requieren el uso de citocininas (Nolan and Rose, 2010).

La inducción de la ES mediante el uso únicamente de citocininas tiende a no tener una fase de callo (vía directa). En la mayoría de los casos la citocinina más usada es el thidiazuron 1-Fenil-3-(1,2,3-tidiazol-5-il) urea, la cual imita los efectos tanto de las auxinas como de las citocininas en el crecimiento y diferenciación. Otras citocininas utilizadas, únicamente cuando embriones zigóticos son usados como fuente de explante, son la 6-bencilaminopurina (BAP), kinetina (6 furfuryl amino purina), zeatina y 6-(y, y dimetilalimino) purina (2iP) (Nolan and Rose, 2010).

En general, la ES puede ser definida como un proceso de múltiples pasos *in vitro* en los que se involucra la iniciación, desarrollo, maduración y germinación de embriones somáticos (Lu *et al.*, 2017). Esta se divide en varias etapas, en cada una existen variaciones en cuanto a las condiciones de cultivo, los reguladores de crecimiento, los medios de cultivo utilizados, entre otras (Von Arnold *et al.*, 2002). De acuerdo con Nolan and Rose (2010), las cuatro etapas generales de la ES indirecta son:

*Callo proembriogénico*, la cual consiste en establecer el estímulo celular para que inicie la ES y se forme la masa de células proembriogénicas. Esta etapa implica una división asimétrica de las células en respuesta a reguladores de crecimiento, usualmente auxinas. Además, se caracteriza por una acidificación del citoplasma y de la pared celular en las células con capacidad embriogénica.

*Desarrollo proembriogénico*, donde se genera el crecimiento de la masa proembriogénica formada en la etapa anterior.

*Maduración de proembriones*, donde se estimula la conversión de proembriones a embriones. Durante esta etapa los embriones somáticos comienzan a acumular productos de reserva.

*Desarrollo de embriones*, ocurre el crecimiento de los embriones, que pasan por las etapas características de su desarrollo (globular, escutelar y coleoptilar en caso de las monocotiledóneas) hasta que se convierten en pequeñas plantas completas (germinación de embriones).

## **Generalidades sobre la variación genética y las formas de detectarla en cultivos de tejidos vegetales.**

La variabilidad genética o diversidad genética, en sentido amplio, es el componente más básico de la biodiversidad y se define como las variaciones heredables que ocurren en cada organismo, entre los individuos de una población y entre las poblaciones dentro de una especie. El resto de la biodiversidad se deriva de los procesos evolutivos que operan sobre esas variaciones; de ahí que su conocimiento y comprensión sea de vital importancia tanto para la conservación y el avance de la genética evolutiva, como para la salud pública, la sustentabilidad y la productividad agrícolas, pecuarias, pesqueras y forestales, la domesticación y la biomedicina (Piñero *et al.*, 2008).

Para estudiar la diversidad genética mediante el uso de la biología molecular en especies vegetales, es conveniente considerar dos tipos de recursos genéticos *in situ* y *ex situ*. El primero de ellos se caracteriza por la identificación de poblaciones para conservar, su manejo, acceso a recurso genético y su utilización; y el segundo por la adquisición, mantenimiento, caracterización y utilización de la diversidad genética. Estas características son puntos clave que son útiles para identificar preguntas específicas que continuamente deben afrontarse para poder tomar decisiones sobre la diversidad genética. Las preguntas pueden variar en su complejidad; desde aquellas que son relativamente fáciles de definir, como por ejemplo, conocer si dos individuos son idénticos, o aquellas cuya definición es más complicada, tales como problemas relacionados con “erosión genética” o la identificación de “variación útil”. No obstante, una característica común y esencial que se comparte, es la necesidad de información referente a la diversidad, y es justo donde, las técnicas de biología molecular han contribuido enormemente (Karp, 2002).

Entre la información sobre la diversidad genética que puede ser obtenida mediante el uso de técnicas moleculares se encuentra: la cantidad de diversidad (una cuantificación de la diversidad presente a nivel intra-específico e inter-específico); la estructura de la diversidad (la repartición de la diversidad entre y dentro de las poblaciones en espacio y tiempo); la historia evolutiva (historia poblacional, linaje genético, genealogía genética y distinciones entre diferenciación y divergencia); las distancias genéticas (una medida del grado de diferencia entre genes, secuencias, poblaciones o especies); el parentesco (afinidad y el grado de parentesco entre parientes); la identidad (determinar

individuos genéticamente idénticos o distintos); el flujo génico (medida en que se intercambian los genes) y; los errores de unión y su correlación inter-locus de variación alélica (Karp, 2002).

La diversidad genética requiere más que su caracterización, también es necesaria información que se pueda utilizar para abordar los problemas clave tanto del manejo de la diversidad genética *ex situ* como *in situ*, y que pueda asistir en la toma de decisiones. Con respecto a esto, se puede argumentar que el número, potencialmente infinito de “diferentes caracteres”, que puede revelarse mediante ensayos basados en el uso de ADN, es solo una pequeña parte de la contribución de técnicas moleculares de relevancia en el contexto del manejo de la diversidad genética (Karp, 2002).

Es de gran importancia el tipo de información sobre diversidad genética que puede ser derivada mediante el uso de técnicas moleculares, junto con la calidad, velocidad y eficiencia con la que puede ser obtenida. En caso de que la información obtenida sea de confianza, podrá utilizarse para mejorar las prácticas o ayudar en la toma de decisiones, en el manejo de los recursos genéticos (Karp, 2002).

Las técnicas moleculares difieren en el contenido de información generada. Algunas técnicas producen solo marcadores dominantes, mientras que otras son co-dominantes y permiten la detección de alelos diferentes. Otras técnicas detectan variación en varios locus y otras en uno solo. Algunos marcadores proveen información genealógica, mientras que otros relaciones fenéticas. Comprender exactamente el tipo de información necesaria sobre la diversidad genética que se requiere, es esencial para abordar problemas específicos, permitiendo con ello, elegir una técnica molecular que genere información apropiada. Además, la calidad de información obtenida dependerá de la estrategia de muestreo utilizada y la forma en que los datos son obtenidos y analizados. Finalmente, cada una de las técnicas moleculares también difiere en los requerimientos de recursos, la reproducibilidad, en su facilidad para automatización y la facilidad para manejar los datos en programas o base de datos (Karp, 2002).

El cultivo de tejidos vegetales es una técnica biotecnológica que depende del uso de recursos genéticos de tipo *ex situ*, la cual dependiendo de la estrategia o metodología utilizada, puede generar un amplio rango de variación genética en plantas, lo cual puede ser incorporado en programas de mejoramiento vegetal (Biswas *et al.*, 2009; Jain, 2001). Teóricamente, de cualquier parte de la planta se pueden regenerar nuevas plantas, sin embargo, la estabilidad genética depende de varios factores, entre los de mayor importancia se mencionan el tipo de explante, el sistema de regeneración, el

genotipo, la concentración óptima de los reguladores de crecimiento y el tiempo transcurrido en cultivo de callo (masa de células indiferenciadas) o de células en suspensión, que en la mayoría de los casos estas vías están protagonizadas por una mitosis acelerada (Golubov *et al.*, 2007; Jain, 2001). De esta manera, existe un gran potencial en el uso de técnicas de cultivo vegetal para el mejoramiento de plantas ya que se puede inducir la variación somaclonal y regenerar una enorme cantidad de material vegetal mediante estas técnicas (Krishna *et al.*, 2016; Jain, 2001). En este sentido, la embriogénesis somática como parte del cultivo de tejidos vegetales, es considerada una poderosa herramienta para la regeneración y mejoramiento genético de plantas (Arzate-Fernández y Mejía-Franco, 2011). Prueba de ello, es que cultivos embriogénicos son actualmente producidos rutinariamente en una amplia variedad de especies, incluyendo las de mayor importancia económica, y ha llegado a ser el método predilecto para la regeneración de la mayoría de los cultivos biotecnológicos cultivados comercialmente (Vasil, 2008).

La variación somaclonal puede ser definida como una variación entre plantas regeneradas a partir del cultivo *in vitro* y es un fenómeno común en el cultivo de tejidos vegetales (Biswas, 2009). Esta variación se considera asociada a mutaciones puntuales, re-arreglos y recombinación cromosomal, metilación de ADN, alteración en el número de secuencias copiadas y elementos transponibles. El CTV por sí mismo actúa como un sistema mutagénico, ya que las células experimentan una experiencia traumática de aislamiento y puede reprogramarse durante la regeneración de la planta, lo cual ocurre diferente que en condiciones naturales. Reprogramación o reestructuración de eventos pueden crear un amplio rango de variación somaclonal, que puede ser heredable (genético) o no heredable (epigenético) en las nuevas plantas regeneradas (Jain, 2001).

La variación somaclonal puede llegar a ser parte del mejoramiento en plantas, siempre que las plantas generadas hereden los rasgos de interés y sean genéticamente estables, ampliando de esta manera, la variación genética en cultivos de plantas; permitiendo con ello, manipular características como la altura de la planta, el rendimiento, el número de flores, la generación de flores tempranas, calidad de grano, contenido de aceite y cambio en sus cualidades, resistencia a enfermedades, resistencia a insectos y pesticidas, tolerancia al calor, frío y salinidad (Jain, 2001).

Cuando la variación somaclonal se presenta a nivel de cromosomas, las especies con alta ploidía y número de cromosomas muestran mayor variabilidad que las especies con baja ploidía y números de cromosomas. La poliploidía en plantas derivadas de cultivo de tejidos es generalmente

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

resultado de la endopoliploidización o fusión nuclear. Los cariotipos alterados en los somaclones incluyen los re-arreglos cromosomales, así como aneuploidías y euploidías. Las aneuploidías pueden ser causadas por la no disyunción, husos aberrantes, rotura cromosomal que produce cromosomas dicéntricos y acéntricos. Los controles del ciclo celular normal, que previenen la división celular antes de la replicación de ADN, son presumiblemente trastornados por el cultivo de tejidos, resultando en el rompimiento de los cromosomas (Jain, 2001). Este rompimiento y sus consecuencias (deleciones, duplicaciones, recambios y traslocaciones) causan aberraciones (Biswas et al., 2009). Los eventos de rompimientos no son aleatorios, sino que están implicadas regiones cromosómicas de replicación tardía caracterizadas por la heterocromatina. El rompimiento de cromosomas puede crear mutaciones directamente por el “efecto de posición” o la alteración en la expresión genética mediante el re-arreglo cromosomal y colocación en un sitio próximo de una región específica de heterocromatina. También, la alteración de niveles de metilación de ADN puede ocasionar rompimientos en los cromosomas (Biswas *et al.*, 2009; Jain, 2001). De esta manera, el grado de inestabilidad cromosomal en el cultivo de tejidos varía de una especie a otra. La edad del callo también afecta la frecuencia de aberración cromosomal (Orzechowska *et al.*, 2013).

También puede presentarse variación somaclonal derivado de la activación de elementos transponibles. Los elementos genéticos transponibles (transposón) pueden ser activados durante el cultivo de tejidos y permitir una variación, cuyas líneas derivadas y regeneradas no muestran mutaciones cualitativas o poco estables (Jain, 2001).

Otro tipo de variación somaclonal que puede presentarse es de tipo epigenético, la cual, resulta de la metilación de ADN y que es asociada con la alteración de la expresión genética. La metilación de la citosina es correlacionada con la modificación de la expresión de genes en plantas, y esta puede incrementar los rasgos cualitativos de la variación, ya que algunos genes pueden ser afectados simultáneamente, además, el incremento en la metilación *in vitro* potencialmente incrementa la actividad de genes y su regulación. Durante el proceso de embriogénesis somática, la metilación de un gen inactiva su transcripción y de esta manera controla su expresión. Se ha propuesto que la metilación de genes relevantes para la diferenciación y eliminación progresiva de células capaces de diferenciación, sea la responsable para la progresiva pérdida del potencial organogénico (Jain, 2001).

De acuerdo con Jain (2001), para la inducción de variación somaclonal, deben de considerarse los siguientes aspectos; cultivos de tejido calloso o células en suspensión con sub-cultivos previos; la

regeneración de plantas a partir de cultivos con largos periodos de incubación; la selección de plantas con rasgos deseables, la estabilidad genética de clones seleccionados y las subsecuentes generaciones; y la multiplicación de somaclones genéticamente estables para el desarrollo de nuevos cultivares.

Los avances en la metodología para analizar variabilidad genética a nivel molecular han permitido avances paralelos en los campos de mejoramiento, análisis de diversidad, análisis de filogenias y análisis taxonómicos (Gil-Vega *et al.*, 2007). Los recientes desarrollos en la genómica han generado nuevas herramientas para descubrir y marcar nuevos alelos y genes, los cuales pueden potenciar la eficiencia del mejoramiento en plantas mediante el uso de selección asistida mediante marcadores moleculares. El uso de estos marcadores en el mejoramiento de plantas es aplicable a todos los cultivos (Jain, 2010). El uso de los métodos moleculares es especialmente útil en estudios de especies con ciclos de vida longevos, perennes y en donde los episodios de floración y reproducción sexual son únicos o escasos. En general, la mayoría de las especies de agaves son de este tipo (Gil-Vega *et al.*, 2007).

Los marcadores moleculares presentan varias ventajas, entre ellas destacan que son fenotípicamente neutros, pueden ser evaluados desde los primeros estadios de desarrollo de las plántulas, son aplicables a cualquier tipo de material vegetal, son independientes de la época del año en que se realiza el análisis, permiten la identificación correcta de la variedad sin necesidad de muchos caracteres, están libres de los efectos epistáticos y presentan o revelan polimorfismo en la secuencia de bases del ADN, permitiendo por tanto abordar la variación a nivel del genoma. Los marcadores moleculares permiten la caracterización de especies, variedades, cultivares y clones (Azofeifa-Delgado, 2006).

Un marcador se refiere a cualquier molécula de proteína, ARN o ADN de tamaño o peso molecular conocido que sirve para monitorear o calibrar la separación de las mismas utilizando electroforesis o cromatografía, o un marcador genético como cualquier gen cuya expresión permite un efecto fenotípico que puede ser detectado fácilmente (por ejemplo, un gen que ocasiona resistencia para algún antibiótico). Los marcadores del ADN se basan fundamentalmente en el análisis de las diferencias en pequeñas secuencias del ADN entre individuos. Las técnicas empleadas para ello son muy diversas y dan el nombre a los distintos tipos de marcadores, los cuales pueden ser de carácter dominante o codominante. Estos marcadores se pueden clasificar en tres categorías básicas:

1) Métodos que no se basan en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Por ejemplo, polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP por sus siglas en inglés) y número variable de repeticiones en tandem (VNTRs por sus siglas en inglés).

2) Técnicas que utilizan iniciadores “primer” arbitrarios o semi-arbitrarios. Por ejemplo, iniciadores PCR múltiples arbitrarios (MAAP por sus siglas en inglés), amplificación aleatoria del ADN polimórfico (RAPD por sus siglas en inglés), amplificación aleatoria del polimorfismo de microsatélites (RAMPO por sus siglas en inglés).

3) PCR con sitio “objetivo específico”. Por ejemplo, microsatélites o *Secuencias Simples Repetidas* (SSR por sus siglas en inglés), e *Inter Secuencias Simples Repetidas* (ISSR) (Azofeifa-Delgado, 2006).

Los microsatélites SSR son regiones de secuencias pequeñas (dos a 10 pares de bases) repetidas, arregladas en serie, las cuales se asume que están distribuidas azorosamente por todo el ADN. Son secuencias de ADN altamente variables dispersas a través de los genomas de hongos, plantas y animales, los cuales pueden o no estar asociadas con genes, además, son loci altamente mutables que pueden estar presentes en muchos sitios del genoma. Dado que, la repetición por sí misma no codifica para formar ninguna proteína, y debido a que las secuencias de ADN repetitivo pueden recombinarse y expandirse más frecuentemente que otros tipos de secuencias, estas regiones son a menudo altamente variables y consecuentemente útiles para medir el polimorfismo entre especies o variedades muy relacionadas. Los tipos de repeticiones que ocurren en los SSR varían entre las especies. Los SSRs representan un nivel adicional de información genómica que se puede usar para los estudios de mapeo y para la determinación de polimorfismos. El desarrollo de marcadores SSR es muy laborioso debido a que deben identificarse y secuenciarse regiones genómicas concretas (bordes del microsatélite), aunque una vez conseguido presenta un sistema muy informativo. Estos marcadores son ideales para el estudio de ligamiento genético en plantas y el mapeo físico, los estudios poblacionales y la identificación de variedades. La tecnología para el análisis de microsatélites es similar a la utilizada para el análisis RAPD, con la adición de una evaluación y secuenciación previa para determinar los iniciadores. La detección del polimorfismo SSR se realiza mediante un PCR y la separación de los productos mediante electroforesis en geles de agarosa, poliacrilamida o geles de secuenciación. Las variaciones detectadas por los SSR son el resultado de cambios en el número de unidades repetidas (Azofeifa-Delgado, 2006).

Otra herramienta importante para la caracterización molecular es mediante el uso de marcadores moleculares microsátélites ISSR los cuales amplifican fragmentos que se ubican entre las secuencias de repeticiones simples. Los iniciadores de ISSR suelen ser de 16 a 25 pares de bases (pb) y están conformados por una secuencia de 2 o 3 nucleótidos complementarios al microsátélite. Se ha observado que al menos el 96% de los fragmentos de ISSR segregan de manera mendeliana (Rocha *et al.*, 2014) y que son altamente polimórficos, relativamente fáciles de utilizar, de bajo costo y con numerosas aplicaciones (Gemmill and Grierson, 2021). Para su uso solo se requiere de un iniciador y la amplificación de fragmentos ocurre cuando dos secuencias repetidas se encuentran en orientación invertida y a una distancia que permita que la ADN polimerasa amplifique el fragmento completo, ya que si se encuentran muy alejadas entre sí, no se amplificará la región. Es importante destacar, que un mismo iniciador potencialmente puede ser utilizado de manera universal para el estudio de diversidad en todas plantas (Ng and Tan, 2015; Rocha *et al.*, 2014).

### **Cultivo de tejidos vegetales y uso de marcadores moleculares en especies de agaves.**

El desarrollo y aplicación de técnicas para el cultivo de tejidos vegetales es cada vez más frecuente, principalmente en el ámbito agronómico, alimentario, farmacéutico (Twaij *et al.*, 2020) y energético (Shrivastava *et al.*, 2021); donde las especies vegetales que poseen un mayor valor económico, reflejan la mayor contribución en el avance y la aplicación de esta biotecnología. No obstante, en el ámbito de la conservación y protección de especies vegetales silvestres, la generación de estrategias basadas en el cultivo de tejidos vegetales son desarrolladas en menor medida; esto puede explicarse en parte, a la mínima o quizá nula ganancia económica directa que puede obtenerse de la ejecución de dichas estrategias, y en algunos casos, la dificultad para la obtención de material vegetal inicial necesario para el establecimiento bajo condiciones *in vitro*, esto a causa de circunstancias adversas como la distribución y ubicación limitada, el estado fisiológico de la planta e incluso el estatus legal de la especie, entre otras cosas. En especies de agaves, únicamente el 9.25% han sido utilizadas para el desarrollo de técnicas de cultivo de tejidos vegetales, esto considerando un total de 210 especies de agaves (García-Mendoza *et al.*, 2019), lo cual refleja un bajo aprovechamiento de esta herramienta biotecnológica en este grupo de plantas, aunque desde otro punto de vista, lo anterior resulta en un amplio abanico de oportunidad para el desarrollo y aplicación de estas técnicas de cultivo. Es de considerar que la aplicación de la biotecnología en especies de

agaves se ha focalizado en la investigación de bio-combustibles, bebidas, alimentos, fibras, saponinas, entre otros (Nava-Cruz *et al.* 2015); esto marca una clara tendencia en el desarrollo del cultivo de tejidos vegetales en especies de evidente importancia económica, tales como el caso de *Agave tequilana*, *A. fourcroydes*, *A. sisalana*, *A. angustifolia* y *A. salmiana*, las cuales concentran más del 65% de un total de 39 trabajos publicados en esta área del conocimiento. Con relación al desarrollo de embriogenesis somática, 15 de 17 publicaciones son mediante el uso de especies de agaves con preponderante potencial económico, solo dos trabajos desarrollados en *Agave victoria-reginae* (Martínez-Palacios *et al.*, 2003; Rodríguez-Garay *et al.*, 1996) poseen un objetivo para la protección y conservación de la especie. En el Cuadro 1 se mencionan los artículos científicos referentes al área de cultivos de tejidos vegetales y la especie de agave utilizado.

**Cuadro 1. Referencias de artículos científicos correspondientes al área de cultivos de tejidos vegetales y la especie de agave utilizado.**

<b>Agave</b>	<b>Objetivo</b>	<b>Referencia</b>
<i>Agave spp.</i>	Regeneración de plantas a través de organogénesis indirecta	Groenewald <i>et al.</i> , 1977
<i>A. fourcroydes</i>	Regeneración de plantas a través de organogénesis indirecta	Robert <i>et al.</i> , 1987
<i>A. arizonica</i>	Regeneración de plantas a través de organogénesis indirecta	Powers and Backhaus, 1989
<i>A. fourcroydes</i> <i>A. cantala</i> <i>A. sisalana</i>	Regeneración de plantas a través de organogénesis indirecta	Binh <i>et al.</i> , 1990
<i>A. amanuensis</i>	Formación de fitoesteroides por medio de cultivo <i>in vitro</i> de tejido calloso	Indrayanto <i>et al.</i> , 1993
<i>A. sisalana</i>	Regeneración de brotes a partir de meristemos basales (rizomas).	Das, 1992
<i>A. victoria-reginae</i>	Embriogénesis somática directa en explantes de hoja	Rodríguez-Garay <i>et al.</i> , 1996
<i>A. sisalana</i>	Regeneración de brotes a partir de meristemos basales y organogénesis indirecta.	Nikam, 1997
<i>A. amaniensis</i>	Cultivo de tejido calloso y producción de sapogeninas.	Andrijany <i>et al.</i> , 1998
<i>A. parrasana</i>	Regeneración de brotes a partir de meristemos basales y organogénesis indirecta	Santacruz-Ruvalcaba <i>et al.</i> , 1999
<i>A. sisalana</i>	Regeneración de plantas a través de organogénesis indirecta.	Hazra <i>et al.</i> , 2002

<i>A. fourcroydes</i>	Embriogénesis indirecta a partir de ápices de bulbilos	González-Oramas <i>et al.</i> , 2002
<i>A. victoria-reginae</i>	Regeneración por embriogénesis somática y generación de brotes a partir de meristemas basales	Martínez-Palacios <i>et al.</i> , 2003
<i>A. sisalana</i>	Regeneración por embriogénesis somática.	Nikam <i>et al.</i> , 2003
<i>A. fourcroydes</i>	Micropropagación, embriogénesis somática	González <i>et al.</i> , 2004
<i>A. angustifolia</i>	Generación de brotes de a través de organogénesis directa a partir de segmentos de médula de tallo.	Enríquez del Valle <i>et al.</i> , 2005
<i>A. tequilana</i>	Regeneración de plantas a través de organogénesis indirecta y generación de brotes a partir de meristemas basales.	Valenzuela-Sánchez <i>et al.</i> , 2006
<i>A. tequilana</i>	Embriogénesis somática indirecta a partir de hoja y mediante sistema de inmersión temporal	Portillo y Santacruz-Ruvalcaba, 2006-a
<i>A. tequilana</i>	Embriogénesis somática indirecta a partir de raíz	Portillo y Santacruz-Ruvalcaba, 2006-b
<i>A. salmiana</i>	Generación de brotes a partir de meristemas basales.	Silos-Espino <i>et al.</i> , 2007
<i>A. tequilana</i>	Regeneración por embriogénesis somática.	Portillo <i>et al.</i> , 2007
<i>A. vera-cruz</i>	Regeneración por embriogénesis somática.	Tejavathi <i>et al.</i> , 2007
<i>A. salmiana</i>	Embriogénesis somática indirecta a partir de hojas y transformación genética mediante <i>Agrobacterium tumefaciens</i> y bombardeo de partículas	Flores-Benítez <i>et al.</i> , 2007
<i>A. tequilana</i> <i>A. salmiana</i> <i>A. duranguensis</i> <i>A. oscura</i> <i>A. pigmaea</i> <i>A. victoria-reginae</i>	Propagación <i>in vitro</i>	Ramírez-Malagón <i>et al.</i> , 2008
<i>A. cupreata</i> <i>A. difformis</i> <i>A. karwinski</i> <i>A. obscura</i> <i>A. potatorum</i>	Generación de brotes a partir de meristemas basales	Domínguez-Rosales <i>et al.</i> , 2008-a
<i>A. tequilana</i>	Revisión de técnicas de micropropagación	Santacruz-Ruvalcaba <i>et al.</i> , 2008
<i>A. tequilana</i>	Embriogenesis somática indirecta	Santacruz-Ruvalcaba y Portillo, 2009

<i>A. angustifolia</i>	Embriogénesis somática indirecta a partir de embriones cigóticos	Arzate-Fernández and Mejía-Franco, 2011
<i>A. tequilana</i>	Embriogénesis somática indirecta a partir de hoja	Rodríguez-Sahagún <i>et al.</i> , 2011
<i>A. bracteosa</i> <i>A. chiapensis</i> <i>A. nizandensis</i> <i>A. ornithobroma</i> <i>A. peacockii</i> <i>A. titanota</i> <i>A. victoria-reginae</i> <i>A. cupreata</i> <i>A. karwinski</i> <i>A. potatorum</i>	Desarrollo de un sistema de conservación <i>in vitro</i> en condiciones de crecimiento retardado	Pérez-Molphe-Balch <i>et al.</i> , 2012
<i>A. fourcroydes</i>	Embriogénesis somática directa a partir de tallo	Monja-Mio and Robert, 2013
<i>A. tequilana</i>	Determinación de dosis letal media (DL <sub>50</sub> ) mediante la irradiación con rayos gama Co <sup>60</sup> en callos y plántulas	Ángeles-Espino <i>et al.</i> , 2013
<i>A. sisalana</i>	Embriogénesis somática indirecta a partir de bulbilos	Carneiro <i>et al.</i> , 2014
<i>A. americana</i>	Proliferación de brotes a partir de callo	Miguel-Luna <i>et al.</i> , 2014
<i>A. angustifolia</i>	Regeneración de embriones somáticos obtenidos de ejes embrionarios	Arzate-Fernández <i>et al.</i> , 2016
<i>A. fourcroydes</i>	Generación de brotes a partir de meristemos basales	Malavert y Gonzales, 2018
<i>A. bracteosa</i> <i>A. celsii</i> <i>A. chiapensis</i> <i>A. difformis</i> <i>A. funkiana</i> <i>A. obscura</i> <i>A. palmeri</i> <i>A. peacockii</i> <i>A. potatorum</i> <i>A. victoria-reginae</i> <i>A. salmiana</i> <i>A. titanota</i>	Análisis de tolerancia a metales pesados bajo condiciones <i>in vitro</i>	Perales-Aguilar <i>et al.</i> , 2020
<i>A. guiengola</i>	Propagación <i>in vitro</i> en medio semisólido y mediante el uso de bioreactores de inmersión temporal	Chávez-Ortiz <i>et al.</i> , 2021

Con respecto al desarrollo de técnicas mediante el uso de marcadores moleculares, se encuentran publicados 33 artículos científicos en su mayoría dirigidos al estudio de diversidad genética de poblaciones. No obstante, destacan 6 publicaciones específicas en el análisis de la variación somaclonal en *Agave fourcroydes* (Monja-Mio *et al.*, 2018; González *et al.*, 2003; Infante

*et al.*, 2003) y en *Agave tequilana* (Díaz-Martínez *et al.*, 2012; Torres-Morán *et al.*, 2010; Torres-Morán *et al.*, 2006). En el Cuadro 2 se mencionan los artículos científicos referentes a la aplicación de marcadores moleculares en especies de agaves.

**Cuadro 2. Referencias de artículos científicos correspondientes a la aplicación de marcadores moleculares en especies de agaves.**

Agave	Objetivo	Marcadores moleculares	Referencia
<i>A. fourcroydes</i> <i>A. angustifolia</i>	Análisis filogenético	Isoenzimas	Colunga-García <i>et al</i> 1999
<i>A. victoria-reginae</i>	Análisis de variación genética en diez poblaciones	Aloenzimas	Martínez-Palacios <i>et al.</i> , 1999
<i>A. cocui</i>	Análisis de variación genética en población silvestre y cultivada	RAPD	Yépez <i>et al.</i> , 2001
<i>A. tequilana</i>	Análisis de variación genética de poblaciones cultivadas	RAPD	Gil-Vega <i>et al.</i> , 2001
<i>A. fourcroydes</i> <i>A. angustifolia</i> <i>A. deserti</i> <i>A. americana</i> <i>A. sisalana</i>	Comprobación de eficiencia de método de extracción de ADN en agaves	ISTR y AFLP	Keb-Llanes <i>et al.</i> , 2002
<i>A. deserti</i> <i>A. cerulata</i> <i>A. subsimplex</i>	Análisis de diferenciación genética	RAPD	Navarro-Quezada <i>et al.</i> , 2003
<i>A. fourcroydes</i>	Análisis de variación asexual en cinco poblaciones clonales de agaves	AFLP	Infante <i>et al.</i> , 2003
<i>A. fourcroydes</i>	Análisis de variación genética en individuos obtenidos mediante embriogénesis somática	AFLP	González <i>et al.</i> , 2003
<i>A. fourcroydes</i>	Análisis diversidad genética entre planta madre, bulbilos e hijuelos	ISTR y AFLP	Demey <i>et al.</i> , 2004
<i>A. fourcroydes</i>	Análisis de variación genética en plantas con propagación asexual	AFLP	González <i>et al.</i> , 2004
<i>A. angustifolia</i>	Variación genética en tres diferentes poblaciones	AFLP	Barraza-Morales <i>et al.</i> , 2006
<i>A. tequilana</i> <i>A. cocui</i>	Variación genética en especies micropropagadas	ISTR	Torres-Morán <i>et al.</i> , 2006

<i>A. tequilana</i> <i>A. angustifolia</i> <i>A. salmiana</i> <i>A. potatorum</i> <i>A. karwinski</i> <i>A. sisalana</i> <i>A. americana</i>	Variación genética en diferentes agaves y variedades	AFLP	Cuevas-Figueroa y Flores-Berrios, 2006
<i>A. tequilana</i>	Análisis de variación genética entre variedades	Análisis AFLP	Gil-Vega <i>et al.</i> , 2006
<i>A. cocui</i> <i>A. angustifolia</i> <i>A. tequilana</i>	Análisis de variación intra e inter-poblacionales de agaves	Análisis ISSR	Dávila <i>et al.</i> , 2007
<i>A. salmiana</i> <i>A. salmiana</i> <i>A. mapisaga</i>	Análisis de diversidad genética en y dentro de poblaciones de agaves pulqueros	RAPD	Alfaro-Rojas <i>et al.</i> , 2007
<b>71 especies de Agaves</b>	Relaciones taxonómicas	AFLP	Gil-Vega <i>et al.</i> , 2007
<b>20 especies</b>	Revisión de información de la diversidad genética en varias especies de agaves	Isoenzimas, AFLP, RAPD, ISSR	Piñero <i>et al.</i> , 2008
<i>A. angustifolia</i>	Análisis de diversidad genética en tres poblaciones silvestres y clonas a partir de rizomas	AFLP	Sánchez-Teyer <i>et al.</i> , 2009
<i>A. tequilana</i>	Análisis de variación genética entre especies propagadas por rizomas y propagadas mediante embriogenesis somática y brotes axilares	ISTR	Torres-Morán <i>et al.</i> , 2010
<i>A. tequilana</i>	Construcción de bibliotecas de ADNc	RT-PCR Gen subunidad rbcS (RuBisCO), gen enzima ácido málico dependiente de NADP, gen 1-SST fructosyltransferasa, gen proteína relacionada al estrés abiótico LEA-Like.	Martínez-Hernández <i>et al.</i> , 2010
<i>A. tequilana</i>	Análisis de variación genética y variación epigenética entre tres diferentes métodos de propagación asexual	AFLP, MSAP, ETS	Díaz-Martínez <i>et al.</i> , 2012
<i>A. parryi</i> <i>A. palmeri</i>	Análisis de genética de poblaciones	Microsatélites	Lindsay <i>et al.</i> , 2012

<i>A. deserti</i> <i>A. tequilana</i>	Construcción y análisis de transcriptoma, análisis de polimorfismos	SNPs	Gross <i>et al.</i> , 2013
<i>A. cupreata</i> <i>A. potatorum</i>	Análisis diversidad genética en cinco poblaciones silvestres para determinar la erosión genética	ISSR	Aguirre-Dugua <i>et al.</i> , 2013
<i>A. potatorum</i>	Análisis de diversidad genética en 12 poblaciones silvestres	SSR	Félix-Valdez <i>et al.</i> , 2016
<i>A. salmiana</i>	Análisis diversidad genética y estructura poblacional de tres poblaciones silvestres	AFLP	Lara-Ávila y Alpuche-Solís, 2016
<i>A. angustifolia</i>	Análisis genético y epigenético de plantas variegadas, albinas y verdes	Marcadores de histonas y de metilación ADN	Us-Camas <i>et al.</i> , 2017
<i>A. salmiana</i> <i>A. americana</i> <i>A. mapisaga</i> <i>A. tequilana</i> <i>A. applanata</i> <i>A. desmettiana</i> <i>A. lechuguilla</i> <i>A. weberi</i>	Análisis de diversidad genética en especies de agave mezcalero	ISTR	Mandujano-Bueno <i>et al.</i> , 2018
<i>A. fourcroydes</i>	Análisis de variación en clones de líneas embriogénicas y no embriogénicas	Análisis AFLP y MSAP	Monja-Mio <i>et al.</i> , 2018
<b>74 especies de Agaves</b>	Análisis filogenético de secuencias de ADN	Análisis de región de cloroplasto e ITS	Jiménez-Barron <i>et al.</i> , 2020
<i>A. salmiana</i> <i>A. mapisaga</i> <i>A. americana</i>	Análisis de diversidad genética en especies y diferentes poblaciones	Microsatélites nucleares	Álvarez-Rios <i>et al.</i> , 2020
<i>A. tequilana</i>	Análisis de expresión en plantas cultivadas de dos años de edad	TERT gen	De la Torre-Espinosa <i>et al.</i> , 2020

## JUSTIFICACIÓN

México es el país que atesora la mayor diversidad y endemismo de agaves en el mundo, los cuales, desempeñan funciones primordiales en el sostenimiento de los ecosistemas. También, algunos agaves se caracterizan por su exclusividad en ambientes específicos, presentando en varios casos, relaciones simbióticas únicas con otros seres vivos. Desafortunadamente, como resultado de la destrucción de sus hábitats, los cambios cada vez más extremos en las condiciones climáticas, la sobreexplotación, la carencia de estrategias de aprovechamiento responsable, entre otras causas derivadas de actividades antropogénicas; las poblaciones silvestres de agaves han sufrido una reducción considerable, incluso en algunos casos han derivado en situaciones de peligro de desaparecer. Esto se complica en algunas especies que, inherente a su propia biología, presentan ciclos de vida relativamente largos con un solo evento reproductivo (monocarpismo) y que además solo presentan la reproducción sexual como único mecanismo reproductivo.

Actualmente, existen pocas estrategias dirigidas a la conservación y protección de las especies de agave, las cuales, omiten enfoques multidisciplinarios que podrían en gran medida, ayudar a contener y en el mejor de los casos, recuperar las poblaciones silvestres de estas especies vegetales. En este sentido, la biotecnología, por medio del desarrollo de protocolos de cultivo de tejidos vegetales para la generación de embriogénesis somática indirecta, puede aportar, además de un sistema rápido y eficiente de multiplicación *in vitro*, la inducción de variación somaclonal en plántulas de agave obtenidas por medio de esta técnica, generando con esto, alternativas para establecer las bases o la inclusión en programas de propagación en diferentes agaves; con el objetivo de asegurar directa o indirectamente la continuidad de manera silvestre no solo de los agaves, sino también de otros seres vivos que dependen de estas especies vegetales.

## HIPÓTESIS

Es posible establecer protocolos para la embriogénesis somática indirecta y su posterior análisis de variación somaclonal en dos especies de agave.

## OBJETIVO GENERAL

Establecer protocolos para la embriogénesis somática indirecta en dos especies de agaves y analizar la posible variación somaclonal en las plantas regeneradas.

### Objetivos específicos

1. Analizar la respuesta *in vitro* a la inducción de tejido calloso en cinco especies de agaves
2. Establecer protocolos *in vitro* para la inducción de tejido calloso embriogénico en dos especies de agave
3. Establecer un protocolo *in vitro* para la obtención de embriones somáticos a partir de tejido calloso embriogénico en dos especies de agave
4. Verificar la presencia de variación somaclonal en las plántulas regeneradas a partir de embriogénesis somática indirecta en dos especies de agave.

## METODOLOGÍA

### Material vegetal

Se eligieron plántulas en etapa de enraizamiento *in vitro* de *Agave wocomahi* Gentry, *A. horrida* Lem. ex Jacq. var. *perotensis*, *A. salmiana* Otto. ex Salm-Dick var. *xamini*, *A. americana* L. var. *comiteco* y *A. parryi* Engelm. var. *huachucensis* Baker Little ex Benson previamente establecidas en el banco de germoplasma *in vitro* de la Unidad de Biotecnología Vegetal de la Universidad Autónoma de Aguascalientes. Cabe aclarar, que las especies de agaves fueron seleccionadas considerando la disponibilidad del material vegetal en el banco de germoplasma *in vitro*, así como los antecedentes en el desarrollo de técnicas de cultivo de tejidos vegetales, principalmente la ausencia de protocolos para la embriogénesis somática. Además, inicialmente se utilizaron cinco especies de agaves con el objetivo de asegurar en al menos dos especies de agaves, el material vegetal suficiente para los tratamientos en la inducción de embriogénesis somática. Lo anterior se justifica debido a que la cantidad y velocidad de propagación *in vitro* varía entre especies de agaves, limitando el desarrollo de la investigación cuando la respuesta de propagación es lenta o escasa.

### Multiplicación de material vegetal

Se realizó la multiplicación *in vitro* de las cinco especies de agaves, mediante el uso de explantes de tallo de aproximadamente 2.0 cm de longitud colocados en frascos de vidrio con capacidad de 500 mL y conteniendo un volumen de 30 mL de medio basal MS (Murashige and Skoog, 1962) adicionado con 30 g/L de sacarosa comercial refinada, 8 g/L de agar (Sigma-Aldrich®), 1.0 mg/L de benciladenina (BA) (Sigma-Aldrich®) y ajustado a un pH de 5.7 mediante el uso de un medidor de pH (Starter2100 OHAUS®). El medio de cultivo fue previamente esterilizado en autoclave (LSSB35L Labtronic Scientific) a una temperatura de 124 °C, con una presión de 1.3 kg/cm<sup>2</sup> durante 20 minutos. Se cultivaron de cinco a siete explantes por frasco y estos fueron colocados bajo condiciones de incubación a 25±2 °C con un fotoperiodo de 16 h luz (54 µm<sup>2</sup>s<sup>-1</sup>) utilizando lámparas LED (T8/9W 100-250 VAC 50/60 HZ Havells®) y 8 h oscuridad durante ocho semanas.

### Inducción de tejido calloso

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

A partir de la previa multiplicación *in vitro*, de cada una de las cinco especies de agave, se tomaron 48 brotes y se distribuyeron en cuatro frascos de 500 mL conteniendo 30 mL de medio MS (Murashige and Skoog, 1962) ajustado a un pH de 5.7 utilizando un medidor de pH (Starter2100 OHAUS®), adicionado con 30 g/L de sacarosa comercial refinada y gelificado con 8 g/L de agar (Sigma-Aldrich®) libre de reguladores de crecimiento vegetal, y se colocaron bajo condiciones de incubación a 25±2 °C con un fotoperiodo de 16 h luz (54 μm<sup>2</sup>s<sup>-1</sup>) utilizando lámparas LED (T8/9W 100-250 VAC 50/60 HZ Havells®) y 8 h oscuridad por lo menos seis semanas previo al proceso de inducción de callo.

Posteriormente, segmentos de 1.0 cm<sup>2</sup> de hoja, 1.0 cm de raíz y tallos de 1.0 cm cortados longitudinalmente, fueron usados como fuente de explantes, los cuales fueron colocados en frascos de vidrio estériles con capacidad de 100 mL y conteniendo un volumen de 30 mL de medio MS (Murashige and Skoog, 1962) ajustado a un pH de 5.7 utilizando un medidor de pH (Starter2100 OHAUS®), adicionado con 30 g/L de sacarosa comercial refinada y gelificado con 8 g/L de agar (Sigma-Aldrich®), y en concentraciones de 1.5 y 4.0 mg/L de ácido indolacético (AIA) (Phyto Technologies Laboratories™), ácido naftalenacético (ANA) (Sigma-Aldrich®), ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) (Sigma-Aldrich®) y ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico “Picloram” (PIC) (Sigma-Aldrich®) solas o en combinación con 1.5 y 3.0 mg/L de benciladenina (BA) (Sigma-Aldrich®); todos los cultivos fueron colocados bajo condiciones de 25±2 °C en oscuridad. Cada explante fue considerado como una unidad experimental y se evaluó como variable el tipo de explante y los diferentes tratamientos con reguladores de crecimiento vegetal (26 tratamientos). Transcurridos 60 días de su cultivo se colectaron datos de eficiencia de inducción de callo %EIC = (Número de callos / Total de explantes) X 100; presencia de callo por explante *PCE* (determinación semicuantitativa, abundante +++, moderado ++ o escaso +; con respecto al tamaño del explante); características cualitativas (color, apariencia, oxidación) y respuestas morfogénicas. Con la finalidad de determinar diferencias estadísticamente significativas en la inducción de tejido calloso en explante de tallo, hoja y raíz, y entre los diferentes tratamientos con reguladores de crecimiento vegetal, se realizó un análisis de medias ANOM mediante proporciones utilizando el programa estadístico Minitab 17 Statistical Software (2010).

Plántulas de las especies *Agave wocomahi* y *A. parryi* var. *huachucensis* mantenidas bajo condiciones *in vitro* sin ningún regulador de crecimiento vegetal, fueron utilizadas como fuente de explantes para obtener segmentos de 1.0 cm<sup>2</sup> de hoja, 1.0 cm de raíz y tallos de 1.0 cm cortados

longitudinalmente. Los explantes fueron colocados en cajas de Petri de 90X15 mm de poliestireno estériles conteniendo un volumen de 15 mL de medio MS (Murashige and Skoog, 1962) ajustado a un pH de 5.7 utilizando un medidor de pH (Starter2100 OHAUS®), adicionado con 30 g/L de sacarosa comercial refinada y gelificado con 8 g/L de agar (Sigma-Aldrich®), y en concentraciones de 1.5, 3.0 y 4.0 mg/L de AIA (Phyto Technologies Laboratories™) solas o en combinación con 1.5 y 3.0 mg/L de BA (Sigma-Aldrich®); todos los cultivos fueron colocados bajo condiciones de 25±2 °C en oscuridad. Cada explante fue considerado como una unidad experimental y se evaluó como variable el tipo de explante y los diferentes tratamientos con reguladores de crecimiento vegetal (13 tratamientos). Transcurridos 60 días de su cultivo se colectaron datos de eficiencia de inducción de callo  $\%EIC = (\text{Número de callos} / \text{Total de explantes}) \times 100$ . Con la finalidad de determinar diferencias estadísticamente significativas en la inducción de tejido calloso en explante de tallo, hoja y raíz, y entre los diferentes tratamientos con AIA, se realizó un análisis de medias ANOM mediante proporciones utilizando programa estadístico Minitab 17 Statistical Software (2010).

El tejido calloso obtenido fue subcultivado en frascos de vidrio estériles con capacidad de 100 mL y conteniendo un volumen de 30 mL de medio MS (Murashige and Skoog, 1962) ajustado a un pH de 5.7 utilizando un medidor de pH (Starter2100 OHAUS®), adicionado con 30 g/L de sacarosa comercial refinada y gelificado con 8 g/L de agar (Sigma-Aldrich®) y en las mismas concentraciones de reguladores de crecimiento vegetal de donde se obtuvo el tejido calloso. Los subcultivos fueron colocados bajo condiciones de 25±2 °C en oscuridad.

### **Desarrollo de embriones somáticos**

De acuerdo con la disponibilidad, fragmentos de tejido calloso fueron cultivados en frascos de vidrio estériles con capacidad de 100 mL y conteniendo un volumen de 30 mL de medio MS (Murashige and Skoog, 1962) solo o adicionado con 1.0 mg/L de carbón activado (Sigma-Aldrich®); ajustados a un pH de 5.7 utilizando un medidor de pH (Starter2100 OHAUS®), adicionado con 30 g/L de sacarosa comercial refinada y gelificado con 8 g/L de agar (Sigma-Aldrich®). Todos los cultivos fueron colocados bajo condiciones de incubación a 25±2 °C con un fotoperiodo de 16 h luz ( $54 \mu\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) utilizando lámparas LED (T8/9W 100-250 VAC 50/60 HZ Havells®) y 8 h oscuridad. Cada fragmento de tejido calloso (ahora explante) fue considerado como una unidad experimental y se evaluó como variable la procedencia del tejido calloso (tipo de explante inicial y reguladores de crecimiento vegetal) y el medio de regeneración. Pasado 90 días de su cultivo se colectó el número

total de embriones somáticos desarrollados por explante, tratamiento y medio de regeneración. Con la finalidad de determinar diferencias estadísticamente significativas entre los medios de regeneración, se realizó un análisis de varianza ANOVA y las diferencias entre las medias se determinaron mediante la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ) utilizando el programa estadístico Minitab 17 Statistical Software (2010).

### **Evidencia microscópica**

Durante el proceso de inducción de tejido calloso y desarrollo de embriones somáticos se realizaron colectas del tejido callosos y/o embriones somáticos en diferentes estadios con ayuda de un estereoscopio electrónico modelo EZ4 (Leica Microsystems) para su posterior observación mediante el uso de un microscopio electrónico de barrido (MEB). Las muestras obtenidas fueron fijadas con 1.5 % de glutaraldehído en buffer de fosfato salino (0.2 M) durante 24 h y posteriormente lavadas con buffer de fosfato salino 1 X por tres ocasiones. Las muestras fueron deshidratadas gradualmente durante 10 minutos en alcohol al 70, 80 90 y 96 %, y durante 30 minutos en alcohol al 96 % por dos ocasiones. Se colocaron las muestras en una cámara de secado de punto crítico (Samdri®795 Tousimis®) a 900 psi, y se aumentó a 1720 psi durante 4 minutos. Posteriormente, las muestras se colocaron en un soporte cilíndrico de aluminio (stub) de 1.0 cm de ancho x 1.0 cm de alto y fueron bañadas en oro mediante el uso de un metalizador (Denton Vacuum, Desk II) con la aplicación de flujo de corriente a un tiempo de 130 segundos. Finalmente, las muestras fueron observadas y digitalizadas a 12 kv de aceleración a diferentes magnificaciones mediante el uso del MEB (JEOL LV JSM-5900).

Por otro lado, las muestras de tejido embriogénico así como embriones somáticos fueron observadas directamente o con ayuda de una tinción directa (una gota por muestra) de colorante rojo para alimentos (Phyto Technologies Laboratories™) o una tinción diferencial (acetocarmín al 0.5 % y azul de Evans al 0.5 %). Las muestras fueron fotografiadas a diferentes magnificaciones mediante el uso de un estereoscopio electrónico modelo EZ4 (Leica Microsystems), atendiendo las sugerencias propuestas por Yeung (2012).

### **Adaptación de plántulas a condiciones *ex vitro***

Se realizó la adaptación a condiciones *ex vitro* de plántulas obtenidas mediante embriogénesis somática de *Agave wocomahi* y *Agave parryi* var. *huachucensis*. Las plántulas desarrolladas en condiciones *in vitro* fueron plantadas dentro de charolas de poliestireno (50 cavidades de 100 cm<sup>3</sup> por cavidad) provistas de un domo transparente y conteniendo un sustrato de Turba de *Sphagnum* (Premier®), perlita y tierra preparada (Vigoro) en una composición 1:2:1 previamente humedecido. Se colocaron bajo condiciones de invernadero a una temperatura de entre 25 °C mínima y máxima de 35 °C y con una humedad relativa inicial del 70 %. El domo fue retirado de la charola paulatinamente durante los primeros 15 días; el riego se realizó quincenalmente los primeros 30 días y subsecuentemente cada semana, hasta que se cumplió un periodo de adaptación de 120 días para su traspaso a maceta y determinación de supervivencia:

$$\% \text{ supervivencia} = \frac{\text{Total plantas final (adaptadas)}}{\text{Total plantas inicial}} \times 100$$

### **Evaluación de variación somaclonal**

Se obtuvo ADN genómico a partir de tejido de hoja procedente de una muestra control (línea clonal bajo condiciones *in vitro* sin proceso de inducción de embriogénesis somática) y cuatro muestras vegetales procedentes de diferentes líneas de embriones somáticos de las especies *Agave wocomahi* y *Agave parryi* var. *huachucensis*, así como una muestra vegetal de *Phaseolus vulgaris* L. como control externo al género *Agave*.

La extracción y purificación de ADN se realizó ajustando el protocolo descrito por Murray y Thompson (1980). Se maceró 0.2 g de tejido de hoja de agave mezclado con 5 mL de buffer de lisis (Anexo A) pre-calentado a 45 °C. La mezcla fue distribuida en tubos Eppendorf (CAPP®) de 2.0 mL y fueron incubados a 45 °C en un Multi-Blok® Heater (Lab-Line Instruments Inc.) durante 15 minutos mezclando ocasionalmente. Posteriormente, se centrifugó en una centrífuga (SIGMA 1-14) durante 5 minutos a 12,000 rpm y se recuperó la fase acuosa (sobrenadante), la cual fue distribuida en alícuotas de 1.0 mL dentro de tubos Eppendorf (CAPP®) de 2.0 mL. A cada tubo se agregó 0.850 mL de cloroformo (J.T. Baker): alcohol isoamílico (HOPKIN & WILLIAMS LDT) 49:1 y se mezcló vigorosamente. Se centrifugó durante 5 minutos a 12,000 rpm y se recuperó la fase acuosa (suspensión superior) en tubos Eppendorf (CAPP®) de 2.0 mL. Se agregó un volumen de isopropanol (Sigma-Aldrich®) a cada tubo y fueron mezclados por inversión y colocados a una temperatura de -

20 °C durante 20 minutos. Posteriormente las mezclas fueron centrifugadas a 12,500 rpm durante 10 minutos y fue eliminado el isopropanol (Sigma-Aldrich®). A la pastilla de ADN resultante, se agregó 0.1 mL de etanol absoluto (Sigma-Aldrich®) al 70 % y se centrifugó a 12,500 rpm durante 10 minutos. Posteriormente, se eliminó el etanol absoluto (Sigma-Aldrich®) al 70 % y se secó la pastilla de ADN a temperatura ambiente dentro de una campana de flujo laminar (CFL102NW Prendo). Finalmente, se disolvió la pastilla de ADN en 0.1 mL de H<sub>2</sub>O libre de nucleasas (Sigma-Aldrich®).

El ADN genómico fue visualizado mediante una electroforesis en gel de agarosa (Sigma-Aldrich®) al 1 %, sumergido en buffer TAE 1 X (Anexo B) dentro de una cámara para electroforesis (0WL EASYLAST™ B2 Thermo Scientific) utilizando un peine de 1.0 mm (0WLB2-12 Thermo Scientific) para el molde de los pozos de carga. Por cada muestra de ADN se utilizaron 17 µL mezclados con 3 µL de buffer de carga concentrado al 6 X (Sigma-Aldrich®); además, se utilizó 10 µL de marcador de peso molecular (O'GeneRuler Express DNA Ladder Thermo Scientific). La electroforesis se realizó mediante la aplicación de 86 volts durante 45 minutos con ayuda de una fuente de poder (Techware PS-250-1 Sigma). El gel de agarosa se sumergió durante 15 segundos dentro de una solución de H<sub>2</sub>O destilada con 0.5 mg/ml de bromuro de etidio (Sigma-Aldrich®) y posteriormente se colocó en H<sub>2</sub>O destilada por 8 minutos. El gel de agarosa fue visualizado y fotografiado bajo luz UV mediante el uso del fotodocumentador (Gel Documentaion System MicroDOC SCL-MICRODOC Cleaver Scientific). Finalmente, la imagen fue invertida a manera de negativo mediante el programa editor de fotos (ArcSoft PhotoStudio® 5.5).

Mediante espectrofotometría se analizó por triplicado cada una de las muestras de ADN con ayuda de un espectrofotómetro (UNICO® UV2150). En una celda de cuarzo (Sigma-Aldrich®) de 10 mm se colocó 10 µL de muestra de ADN en 490 µL de H<sub>2</sub>O libre de nucleasas (Sigma-Aldrich®) y se obtuvo su absorbancia a una longitud de onda de 230, 260, 280 y 320 nm. Posteriormente, se determinó la concentración y pureza mediante el uso de la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración en ng/}\mu\text{l o } \mu\text{g/ml} = A_{260} \times (\text{factor de dilución}) \times 50 \text{ (factor de conversión)}$$

$$\text{Pureza} = A_{260}/A_{280}$$

*Factor de conversión* = Una absorbancia de 1,0 a 260 nm se corresponde con una concentración de 50 ng/µL (50 µg/mL) de dsDNA puro.

*Factor de dilución* = 10 µL de ADN en 490 µL de H<sub>2</sub>O 1/50 o (10µL+490µL/10µL) = 50

*A<sub>260</sub>* = Longitud de onda a 260 nm

A280 = Longitud de onda a 280 nm

La amplificación del ADN fue verificada por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de un fragmento de 297 pb correspondiente a una región altamente conservada de ADN en cloroplasto, con la ayuda de oligonucleótidos (Control Primer Mix 25  $\mu$ M Thermo Scientific) provistos en el kit comercial para PCR (Phire Plant Direct PCR Master Mix 2X Thermo Scientific). La mezcla de reacción consistió en un volumen total de 20  $\mu$ L, compuesta de 10  $\mu$ L de mezcla para PCR (Phire Plant Direct PCR Master Mix 2X Thermo Scientific), 8.5  $\mu$ L de agua libre de nucleasas (Thermo Scientific), 1.0  $\mu$ L de ADN (50 ng/ $\mu$ L) y 0.5  $\mu$ L de oligonucleótido (Control Primer Mix 25  $\mu$ M Thermo Scientific). Las condiciones de amplificación consistieron en un ciclo de 5 minutos a 98 °C, 40 ciclos de 5 segundos a 98 °C, seguido de 5 segundos a 62 °C y 20 segundos a 72 °C, y un ciclo de 60 segundos a 72 °C. Las condiciones de reacción fueron obtenidas mediante el uso de un termociclador (TECHNE TC-412).

Los productos amplificados fueron visualizados mediante una electroforesis en gel de agarosa (Sigma-Aldrich®) al 1 % sumergido en buffer TAE 1 X (Anexo B) dentro de una cámara para electroforesis (OWL EASYLAST™ B2 Thermo Scientific), utilizando un peine de 1.0 mm (OWLB2-12 Thermo Scientific) para el molde de los pozos de carga. En cada pozo se colocó 20  $\mu$ L de cada muestra de amplificación y como referencia 10  $\mu$ L de marcador de peso molecular (O'GeneRuler Express DNA Ladder Thermo Scientific). La electroforesis se realizó mediante la aplicación de 86 volts durante 45 minutos con ayuda de una fuente de poder (Techware PS-250-1 Sigma). El gel de agarosa se sumergió durante 15 segundos dentro de una solución de H<sub>2</sub>O destilada con 0.5 mg/mL de bromuro de etidio (Sigma-Aldrich®) y posteriormente se colocó en H<sub>2</sub>O destilada por 8 minutos. El gel de agarosa fue visualizado y fotografiado bajo luz UV mediante el uso del fotodocumentador (Gel Documentaion System MicroDOC SCL-MICRODOC Cleaver Scientific). Finalmente, la imagen fue invertida a manera de negativo mediante el programa editor de fotos (ArcSoft PhotoStudio® 5.5).

Posteriormente, utilizando el ADN obtenido, se analizó por medio de PCR cinco marcadores moleculares de tipo ISSR con las siguientes secuencias nucleotídicas: 34 (CAGCAGCAGCAGCAGRC); 36 (CGCAGCAGCAGCAGCAG); 811 (GAGAGAGAGAGAGAC); 845 (CACACACACACACAGT) y 853 (TCTCTCTCTCTCTCTT). La mezcla de reacción consistió en un volumen total de 20  $\mu$ L, compuesta de 10  $\mu$ L de mezcla para PCR (Phire Plant Direct PCR Master Mix 2 X Thermo Scientific),

7  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas (Thermo Scientific), 1.5  $\mu\text{L}$  (50 ng/ $\mu\text{l}$ ) de ADN y 1.5  $\mu\text{L}$  de ISSR (Sigma-Aldrich®). Las condiciones de amplificación consistieron en un ciclo de 60 segundos a 98 °C, 40 ciclos de 20 segundos a 98 °C, seguido de 50 segundos a 40 °C y 60 segundos a 72 °C, y un ciclo de 120 segundos a 72 °C para los ISSR 34, 36, 845 y 853. Para el caso del ISSR 811 las condiciones de amplificación consistieron en un ciclo de 60 segundos a 98 °C, 40 ciclos de 20 segundos a 98 °C, seguido de 50 segundos a 36 °C y 60 segundos a 72 °C, y un ciclo de 120 segundos a 72 °C. Ambas condiciones de reacción fueron obtenidas mediante el uso de un termociclador (TECHNE TC-412) y se realizaron por duplicado.

Los productos amplificados fueron analizados mediante una electroforesis en gel de agarosa (Sigma-Aldrich®) al 1.5 % sumergido en buffer TAE 1 X (ver anexo B) dentro de una cámara para electroforesis (OWL EASYLAST™ B2 Thermo Scientific) utilizando un peine de 1.0 mm (OWLB2-12 Thermo Scientific) para el molde de los pozos de carga. En cada pozo se colocó 20  $\mu\text{L}$  de cada muestra de amplificación y como referencia 10  $\mu\text{L}$  de marcador de peso molecular (O'GeneRuler Express DNA Ladder Thermo Scientific). La electroforesis se realizó mediante la aplicación de 76 volts durante 130 minutos con ayuda de una fuente de poder (Techware PS-250-1 Sigma). El gel de agarosa se sumergió durante 15 segundos dentro de una solución de H<sub>2</sub>O destilada con 0.5 mg/mL de bromuro de etidio (Sigma-Aldrich®) y posteriormente se colocó en H<sub>2</sub>O destilada por 15 minutos. El gel de agarosa fue visualizado y fotografiado bajo luz UV mediante el uso del fotodocumentador (Gel Documentaion System MicroDOC SCL-MICRODOC Cleaver Scientific). Finalmente, la imagen fue invertida a manera de negativo mediante el programa editor de fotos (ArcSoft PhotoStudio® 5.5).

El número y tamaño de las bandas obtenidas por cada ISSR fue determinado mediante comparación visual con ayuda del marcador de peso molecular 5000-100 pb (O'GeneRuler Express DNA Ladder Thermo Scientific). Simultáneamente, se construyó una matriz binaria mediante la determinación de la presencia (1) y ausencia (0) de cada una de las bandas generadas. Posteriormente, se ingresaron los datos de la matriz binaria dentro del software estadístico PAST 4.03 (Hammer *et al.*, 2001), donde se calculó la similitud entre las muestras analizadas por medio del índice de Jaccard y finalmente se generó un dendrograma de agrupación jerárquica mediante el uso del algoritmo de emparejamiento de UPGMA (Unwithed Pairwise Group Method with Arithmetic Averages).

## RESULTADOS

### Multiplicación *in vitro* por medio de meristemos basales

Se logró la multiplicación *in vitro* de cinco especies de *Agave*, con tres diferentes líneas de clones (Cuadro 3 y Figura 6), utilizando solo benciladenina para generar brotes en explantes basales. Todas las especies fueron capaces de generar brotes; no obstante, hubo diferencias en cuanto a la especie de agave, así como entre las líneas clónicas de cada tipo de agave. La mayor producción de brotes se presentó en *Agave horrida* var. *perotensis* clona A, con hasta 34 brotes por explante dentro de los primeros dos meses de cultivo; por el contrario, *A. parryi* var. *huachucensis* generó menor cantidad de brotes con tan solo 3.3 brotes por explante dentro del mismo período de tiempo.

**Cuadro 3. Generación de brotes *in vitro* en cinco especies de *Agave*, en respuesta de 1.0 mg/L de benciladenina.**

<i>Agave</i>	Línea clonal	Número de brotes (2 meses)	Número de brotes por explante ( $\pm$ error estándar)
<i>A. americana</i> var. <i>comiteco</i>	A	17	5.6 $\pm$ 5.6
	B	0	
	C	0	
<i>A. horrida</i> var. <i>perotensis</i>	A	40	34.0 $\pm$ 7.0
	B	42	
	C	20	
<i>A. parryi</i> var. <i>huachucensis</i>	A	6	3.3 $\pm$ 1.7
	B	4	
	C	0	
<i>A. salmiana</i> var. <i>xamini</i>	A	5	8.0 $\pm$ 5.7
	B	19	
	C	0	
<i>A. wocomahi</i>	A	16	11.7 $\pm$ 3.4
	B	14	
	C	5	



**Figura 6. Generación de brotes *in vitro* en cinco especies de *Agave*, en respuesta a 1.0 mg/L de benciladenina.** De izquierda a derecha: *A. wocomahi*, *A. americana* var. *comiteco*, *A. salmiana* var. *xamini*, *A. horrida* var. *perotensis* y *A. parryi* var. *huachucensis*.

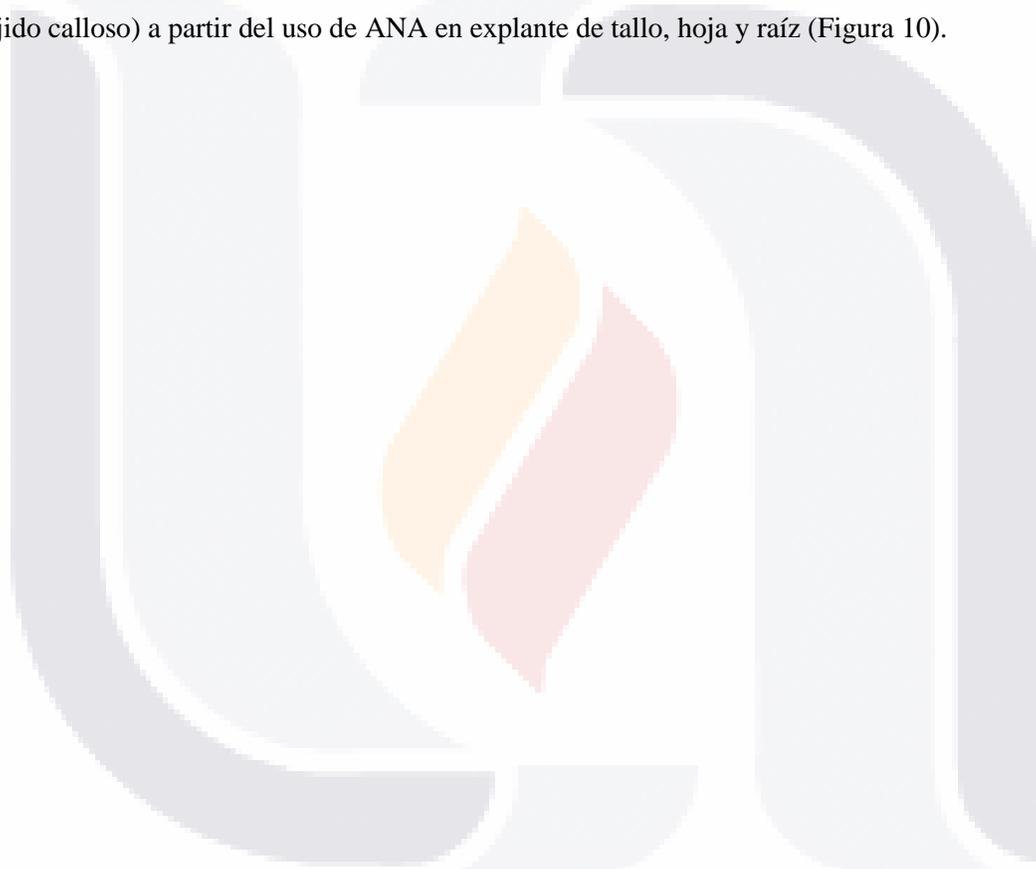
### **Inducción de tejido calloso *in vitro***

En la eficiencia de inducción de callo se observó un rango de respuesta general entre 35 a 74 %. Esto determinó la selección de *Agave wocomahi* y *Agave parryi* var. *huachucensis* para la continuidad en el desarrollo de embriogénesis somática, ya que estas especies presentaron la mayor eficiencia de inducción de callo con 66 y 74%, respectivamente.

En la especie *Agave americana* var. *comiteco* se observó el desarrollo de tejido calloso a partir de dos semanas de incubación, en el cual una mayor eficiencia en la inducción de tejido calloso fue registrada mediante el uso de explante de tallo con un 60.3 %; donde el uso de los tratamientos con ANA y PIC solos, y en combinación con BA fueron los que presentaron mayor respuesta. Esta misma tendencia, aunque con menor eficiencia de inducción de callo, se presentó tanto para el explante de hoja como el de raíz. De manera general, el tejido calloso generado en su mayoría fue de tipo compacto con una coloración heterogénea y con moderada presencia de oxidación (Cuadro 4). Para el explante de tallo, el análisis de proporciones ANOM arrojó 11 tratamientos con una proporción superior significativamente diferente a la proporción general de 0.604 correspondiente a todos los

tratamientos, mientras que solo se observaron dos tratamientos para explante de hoja y de igual cantidad para explante de raíz cuyas proporciones generales fueron de 0.319 y 0.2154, respectivamente (Figuras 7, 8 y 9).

Adicionalmente, algunas respuestas de organogénesis fueron observadas, como la generación de brotes mediante la activación de yemas basales mediante el uso BA y AIA en explante de tallo, así como brotes adventicios en explante de hoja mediante el uso de solo AIA y en combinación con BA. También se observó la generación de raíz vía organogénesis indirecta (posterior a la generación de tejido calloso) a partir del uso de ANA en explante de tallo, hoja y raíz (Figura 10).

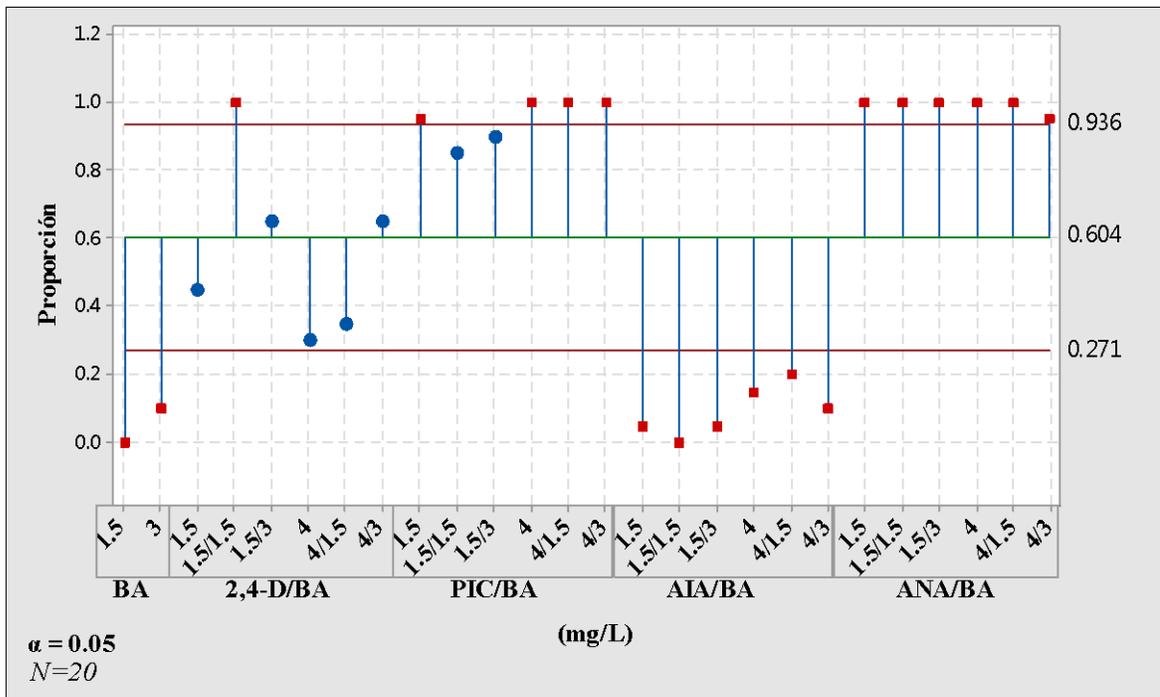


**Cuadro 4. Efecto en la inducción de tejido calloso utilizando distintas concentraciones de AIA, ANA, 2,4-D, PIC, solas o en combinación con BA, en explantes de tallo, hoja y raíz de *Agave americana* var. *comiteco*.**

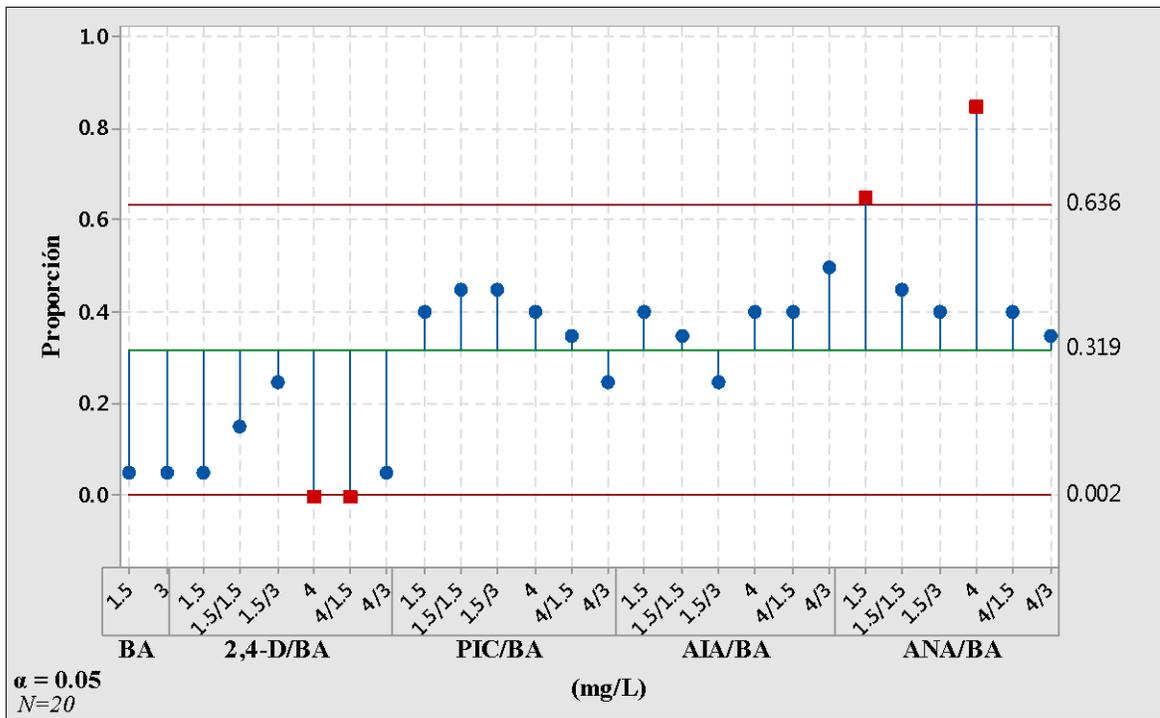
Tratamiento (mg/L)					Caracterización de tejido calloso															
2,4-D	PIC	AIA	ANA	BA	Tallo				Hoja				Raíz							
					EIC%	PCE	Tipo	Color	OX	EIC%	PCE	Tipo	Color	OX	EIC%	PCE	Tipo	Color	OX	
-	-	-	-	-	0	-	NA	NA	+	5	+	CC	B	+	0	-	NA	NA	+	
-	-	-	-	1.5	0↓	-	NA	NA	+	5	+	CC	B	+	0↓	-	NA	NA	+	
-	-	-	-	3	10↓	+	CB	B	+	5	+	CC	V	+	0↓	-	NA	NA	+	
1.5	-	-	-	-	45	+	CC	A/C	+	5	+	CC	A/C	+++	45	++	CC	A	+	
1.5	-	-	-	1.5	100↑	+++	CC	A/C	++	15	+	CC	A	++	30	++	CC	A	+	
1.5	-	-	-	3	65	+++	CC	A/C	++	25	+	CC	A	++	20	+	CC	A	++	
4	-	-	-	-	30	++	CC	A/C	++	0↓	-	NA	NA	+++	30	++	CC	A	+	
4	-	-	-	1.5	35	++	CC	A/C	++	0↓	-	NA	NA	++	30	+	CC	A/C	++	
4	-	-	-	3	65	++	CC	A/C	++	5	+	CC	A	++	10	+	CC	A/C	++	
-	1.5	-	-	-	95↑	+++	CG	A	+	40	+	CR	A/B	++	35	+	CC	A	+	
-	1.5	-	-	1.5	85	+++	CG	A/B	+	45	++	CC	C/A	+	10	+	CC	A	++	
-	1.5	-	-	3	90	++	CC	A/B	+++	45	++	CC	C/B	++	20	+	CC	A	++	
-	4	-	-	-	100↑	++	CG	A	-	40	+	CC	A/B	++	40	+	CC	A	++	
-	4	-	-	1.5	100↑	+++	CC	A/B	+	35	++	CC	C/B	++	20	+	CC	A	+++	
-	4	-	-	3	100↑	+++	CC	A/B	-	25	+	CC	A	++	25	+	CC	A	++	
-	-	1.5	-	-	5↓	+	CF	B/V	+	40	+	CC	B/V	+	0↓	-	NA	NA	-	
-	-	1.5	-	1.5	0↓	-	NA	NA	+	35	+	CC	B/V	+	0↓	-	NA	NA	+	
-	-	1.5	-	3	5↓	+	CC	B	+	25	+	CF	B	+	0↓	-	NA	NA	+	
-	-	4	-	-	15↓	+	CC	B/V	++	40	+	CC	B/V	+	0↓	-	NA	NA	+++	
-	-	4	-	1.5	20↓	+	CF	B/A	+	40	+	CF	B/V	+	5	+	CC	C	++	
-	-	4	-	3	10↓	+	CB	B	-	50	+	CC	B/V	+	0↓	-	NA	NA	++	
-	-	-	1.5	-	100↑	+++	CR	C/B	+	65↑	++	CR	B/C	++	65↑	+	CR	C/B	++	
-	-	-	1.5	1.5	100↑	++	CR	C/B	++	45	++	CR	C	+++	30	+	CR	C/B	+++	
-	-	-	1.5	3	100↑	++	CF	B/C	+	40	++	CF	C	+++	20	+	CF	C/A	+++	
-	-	-	4	-	100↑	+++	CR	C/B	++	85↑	++	CR	B/C	++	55↑	+	CR	C/B	+	
-	-	-	4	1.5	100↑	+++	CC	C/A	+	40	++	CF	C	++	45	+	CC	C/A	+++	
-	-	-	4	3	95↑	++	CC	C/A	+	35	++	CR	C	+++	25	+	CC	C/A	+	
<b>Resumen</b>					<b>60.3</b>	<b>+++</b>	<b>CC</b>	<b>A/C</b>	<b>+</b>	<b>31.8</b>	<b>+</b>	<b>CC</b>	<b>B/V</b>	<b>++</b>	<b>21.5</b>	<b>+</b>	<b>CC</b>	<b>A</b>	<b>++</b>	

N=20. ↑ = indica diferencia estadística respecto a la proporción general considerando el límite de decisión superior; ↓ = indica diferencia estadística respecto a la proporción general considerando el límite de decisión inferior.  $\alpha = 0.05$

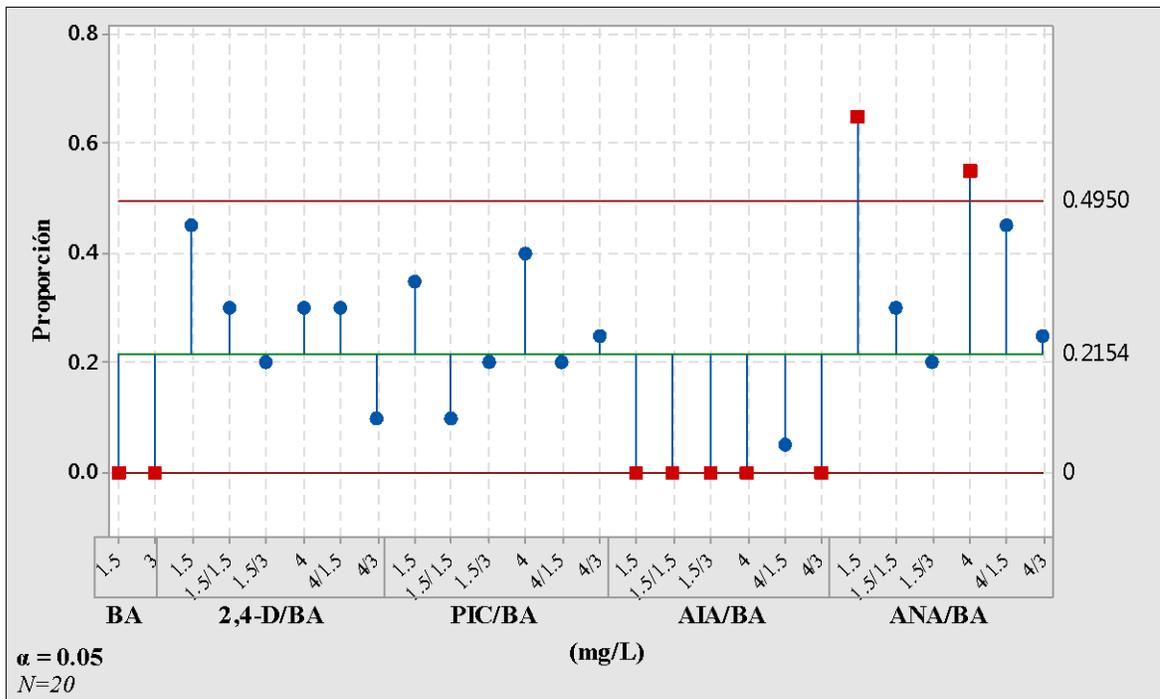
(EIC) Eficiencia Inducción Callo; (PCE) Presencia de Callo por Explante; (OX) Oxidación; (CN) Callo Nodular; (CC) Callo Compacto; (CR) Callo Raíz; (CF) Callo Friable; (NA) No Aplica; (BA) Benciladenina; (PIC) Ácido 4-amino-3,5,6-tricloro-2-piridincarboxílico; (AIA) ácido indolacético; (ANA) ácido naftalenacético; (2,4-D) ácido 2,4-diclorofenoxiacético; (A) Amarillo; (B) Blanco; (V) Verde; (C) Café. (+++) Abundante (++) Moderado (+) Escaso (-) Nula.



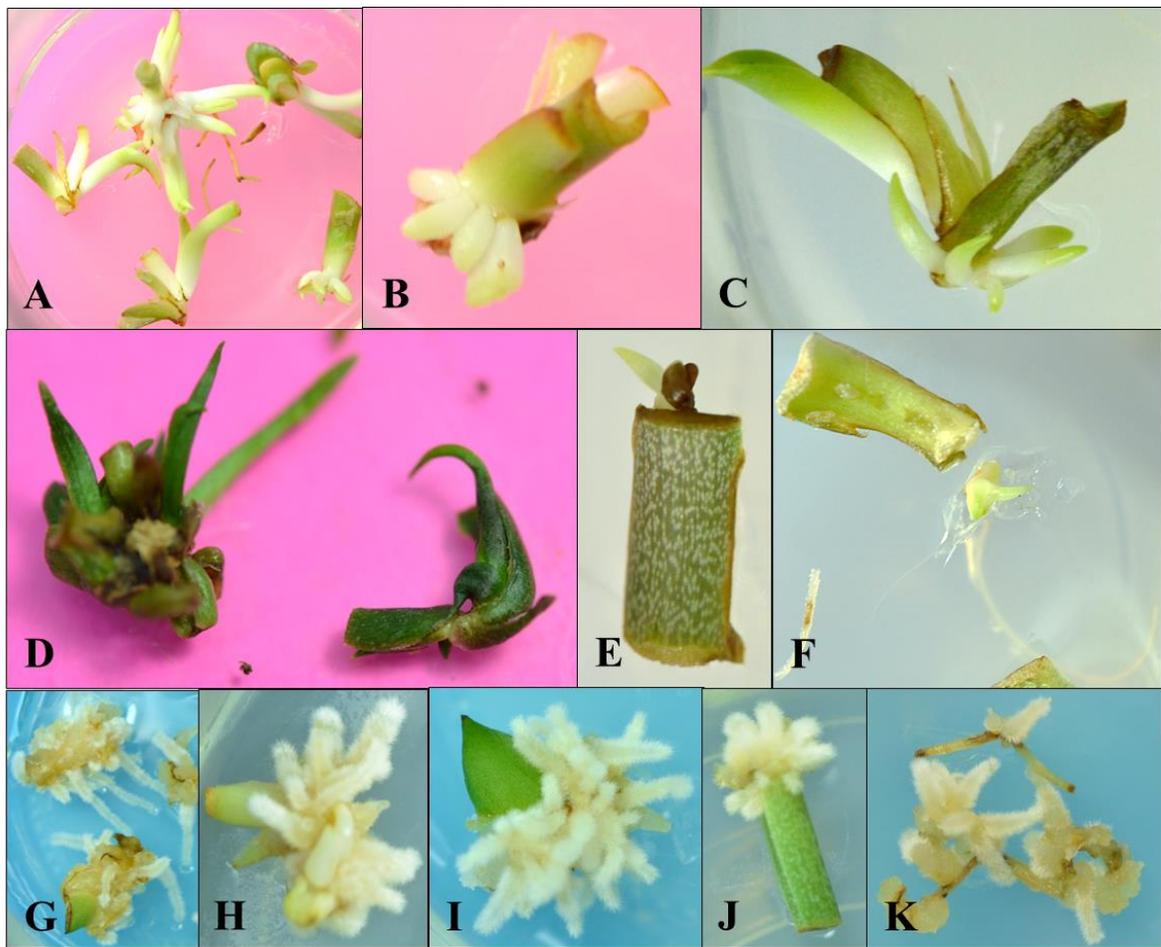
**Figura 7. Análisis de medias ANOM mediante proporciones en la inducción de tejido calloso de explante de tallo en *Agave americana* var. *comiteco*, sometidos a diferentes concentraciones de (BA) benciladenina; (2,4-D) ácido 2,4-diclorofenoxiacético; (PIC) Ácido 4-amino-3,5,6-tricloro-2-piridincarboxílico; (AIA) ácido indolacético y (ANA) ácido naftalenacético. La gráfica muestra la proporción para cada tratamiento; la línea central indica la proporción general de todas las muestras y; las líneas rojas indican los límites de decisión con base a un nivel de significancia de 0.05. La proporción ubicada más allá de un límite de decisión especifica que la diferencia entre la proporción del grupo y la población general es estadísticamente significativa.**



**Figura 8.** Análisis de medias ANOM mediante proporciones en la inducción de tejido caloso de explante de hoja en *Agave americana* var. *comiteco*, sometidos a diferentes concentraciones de (BA) benciladenina; (2,4-D) ácido 2,4-diclorofenoxiacético; (PIC) Ácido 4-amino-3,5,6-tricloro-2-piridincarboxílico; (AIA) ácido indolacético y (ANA) ácido naftalenacético. La gráfica muestra la proporción para cada tratamiento; la línea central indica la proporción general de todas las muestras y; las líneas rojas indican los límites de decisión con base a un nivel de significancia de 0.05. La proporción ubicada más allá de un límite de decisión específica que la diferencia entre la proporción del grupo y la población general es estadísticamente significativa.



**Figura 9.** Análisis de medias ANOM mediante proporciones en la inducción de tejido caloso de explante de raíz en *Agave americana* var. *comiteco*, sometidos a diferentes concentraciones de (BA) benciladenina; (2,4-D) ácido 2,4-diclorofenoxiacético; (PIC) Ácido 4-amino-3,5,6-tricloro-2-piridincarboxílico; (AIA) ácido indolacético y (ANA) ácido naftalenacético. La gráfica muestra la proporción para cada tratamiento; la línea central indica la proporción general de todas las muestras y; las líneas rojas indican los límites de decisión con base a un nivel de significancia de 0.05. La proporción ubicada más allá de un límite de decisión especifica que la diferencia entre la proporción del grupo y la población general es estadísticamente significativa.



**Figura 10. Respuestas morfogénicas en distintos explantes de *Agave americana* var *comiteco* expuestas a diferentes reguladores de crecimiento vegetal.** Inducción directa de brotes basales en explante de tallo mediante el uso de 1.5 mg/L de benciladenina (BA) (A), 3.0 mg/L de BA (B) y 3.0 mg/L de BA en combinación con 1.5 mg/L de AIA (C); inducción directa de brotes adventicios en explante de hoja mediante el uso de 3.0 mg/L de BA en combinación de 4.0 mg/L de ácido indolacético (AIA) (D) y 1.5 mg/L de AIA (E); embriogénesis directa mediante el uso de 1.5 mg/L de AIA en explante de hoja (F); inducción indirecta de raíces mediante el uso de 1.5 mg/L de ácido naftalenacético en explante de tallo (G y H), hoja (I y J) y raíz (K).

En la especie *Agave salmiana* var. *xamini* se obtuvo una mayor eficiencia en la inducción de tejido calloso mediante el uso de explante de tallo con 48.1 %, donde los tratamientos del ANA solos y en combinación con BA fueron los que presentaron mayor cantidad de tejido calloso, y en su mayoría de tipo compacto. Esta misma tendencia, aunque con menor eficiencia de inducción de callo, se presentó tanto para el explante de hoja como el de raíz. De manera general, el tejido calloso generado en su mayoría fue de tipo compacto con una coloración en su mayoría café y con abundante presencia de oxidación (Cuadro 5). Para el explante de tallo, el análisis de proporciones ANOM arrojó seis tratamientos, todos ellos sometidos al ANA y cuya proporción superior fue

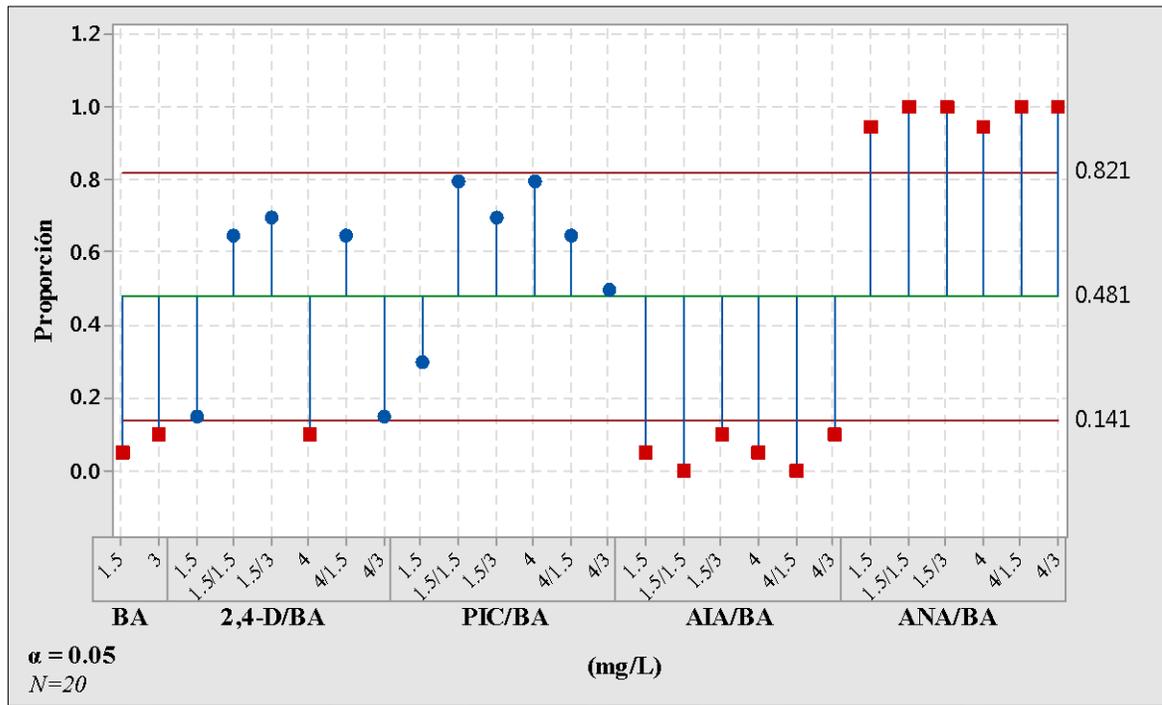
significativamente diferente a la proporción general de 0.481 correspondiente a todos los tratamientos, mientras que para el explante de hoja se observó la misma tendencia bajo una proporción general de 0.362 y para el explante de raíz, únicamente dos tratamientos presentaron una proporción superior significativamente diferente respecto a una proporción general de 0.2154 (Figuras 11, 12 y 13).

**Cuadro 5. Efecto en la inducción de tejido caloso utilizando distintas concentraciones de AIA, ANA, 2,4-D, PIC, solas o en combinación con BA, en explantes de tallo, hoja y raíz de *Agave salmiana* var. *xamini*.**

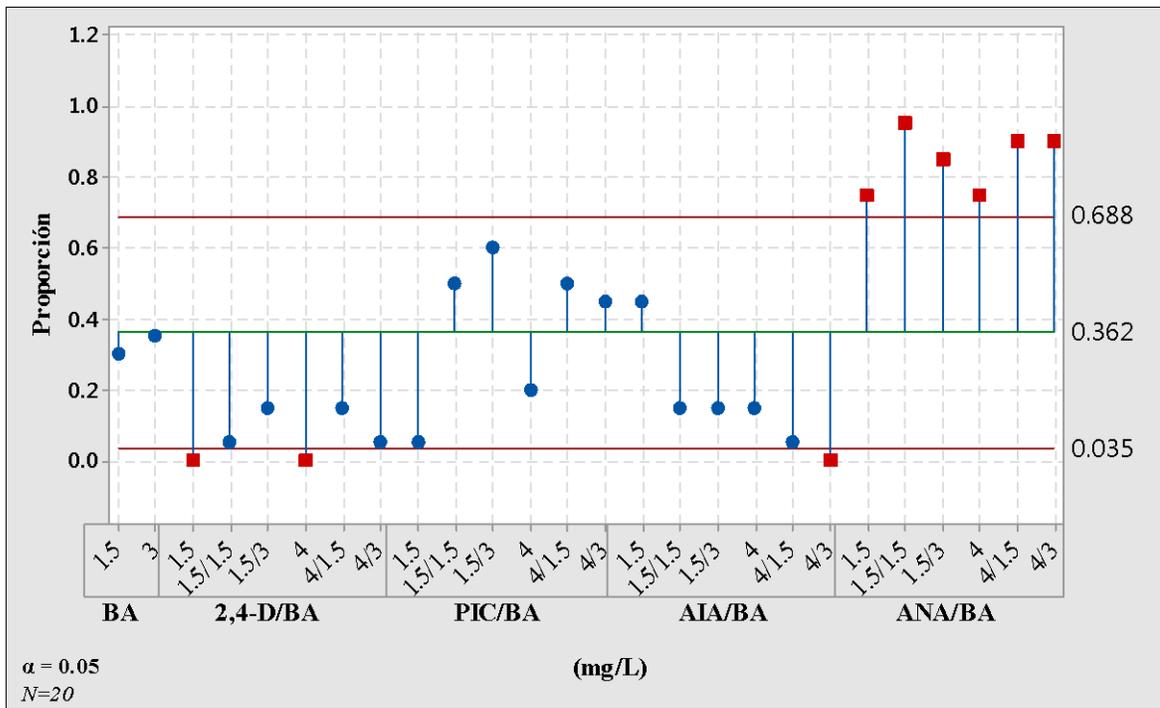
Tratamiento (mg/L)					Caracterización de tejido caloso															
2,4-D	PIC	AIA	ANA	BA	Tallo				Hoja				Raíz							
					EIC%	PCE	Tipo	Color	OX	EIC%	PCE	Tipo	Color	OX	EIC%	PCE	Tipo	Color	OX	
-	-	-	-	-	0	-	NA	NA	+	0	-	NA	NA	+	0	-	NA	NA	+	
-	-	-	-	1.5	5↓	+++	CC	B/A	-	30	+	CC	B	+	0↓	-	NA	NA	+	
-	-	-	-	3	10↓	+	CC	B/A	+	35	+	CC	B	+	0↓	-	NA	NA	+	
1.5	-	-	-	-	15	+	CC	A	+++	0↓	-	NA	NA	+++	35	+	CC	A	+	
1.5	-	-	-	1.5	65	++	CC	A/C	++	5	+	CC	C	+++	25	++	CC	C	++	
1.5	-	-	-	3	70	++	CC	C	++	15	+	CF	B	+++	30	+	CC	C	++	
4	-	-	-	-	10↓	+	CC	A	+++	0↓	-	NA	NA	+	0↓	-	NA	NA	++	
4	-	-	-	1.5	65	+	CC	C/A	+++	15	+	CC	C	+++	40	+	CC	C	+	
4	-	-	-	3	15	+	CC	C	++	5	+	CC	A	+++	25	+	CC	C	++	
-	1.5	-	-	-	30	+	CC	A/B	+++	5	+	CC	A	+++	40	++	CG	A	++	
-	1.5	-	-	1.5	80	+++	CG	C	+++	50	+++	CC	C	+++	30	+	CC	A/C	+++	
-	1.5	-	-	3	70	+++	CG	A/B	+++	60	++	CF	A/B	+++	15	+	CC	C	++	
-	4	-	-	-	80	+	CG	A	+++	20	+	CG	A	+++	45	++	CF	A	++	
-	4	-	-	1.5	65	+++	CG	C	+++	50	++	CF	A/B	+++	30	+	CC	C/B	+++	
-	4	-	-	3	50	++	CF	C	+++	45	++	CC	C/A	+++	5	+	CC	C	+++	
-	-	1.5	-	-	5↓	+	CF	B/V	++	45	+	CF	B/V	+	0↓	-	NA	NA	-	
-	-	1.5	-	1.5	0↓	-	NA	NA	+	15	+	CC	B/V	+	0↓	-	NA	NA	++	
-	-	1.5	-	3	10↓	+	CC	C/B	+	15	+	CC	B/V	+	0↓	-	NA	NA	++	
-	-	4	-	-	5↓	+	CC	V/B	+	15	+	CC	V/B	+	20	++	CC	B/A	+	
-	-	4	-	1.5	0↓	-	NA	NA	+	5	+	CC	B/V	+	0↓	-	NA	NA	++	
-	-	4	-	3	10↓	++	CC	B	+	0↓	-	NA	NA	+	0↓	-	NA	NA	++	
-	-	-	1.5	-	95↑	++	CR	C/B	++	75↑	+	CR	C/B	+	60↑	+++	CR	C/B	+	
-	-	-	1.5	1.5	100↑	++	CC	C/A	++	95↑	++	CC	C/A	++	35	+	CC	C	+	
-	-	-	1.5	3	100↑	+++	CC	C	++	85↑	++	CC	C	+++	10	+	CC	C	+++	
-	-	-	4	-	95↑	++	CF	C/B	+	75↑	++	CF	A/B	-	50↑	+	CF	A/B	+	
-	-	-	4	1.5	100↑	+++	CC	C/A	++	90↑	+	CC	C/A	++	35	+	CC	C	++	
-	-	-	4	3	100↑	++	CC	C/A	++	90↑	+	CC	C/A	+++	30	+	CC	C	++	
<b>Resumen</b>					<b>48.1</b>	<b>+</b>	<b>CC</b>	<b>C</b>	<b>+++</b>	<b>36.2</b>	<b>+</b>	<b>CC</b>	<b>C</b>	<b>+++</b>	<b>21.5</b>	<b>+</b>	<b>CC</b>	<b>C</b>	<b>++</b>	

N=20. ↑ = indica diferencia estadística respecto a la proporción general considerando el límite de decisión superior; ↓ = indica diferencia estadística respecto a la proporción general considerando el límite de decisión inferior.  $\alpha = 0.05$

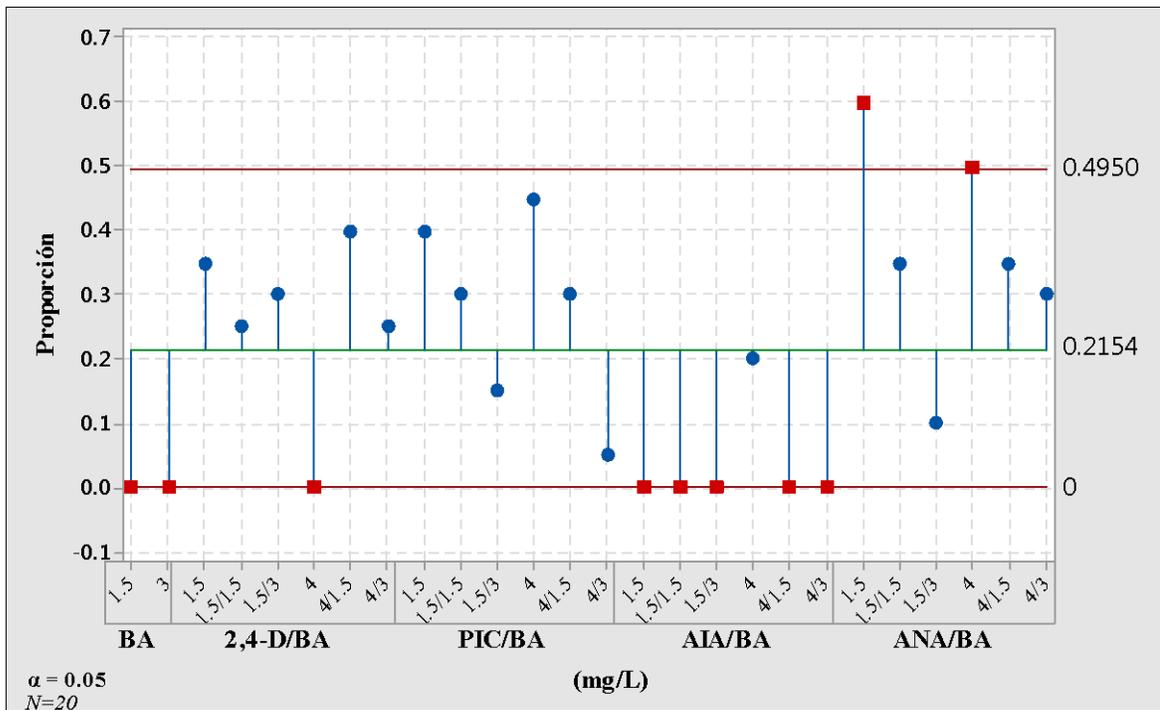
(EIC) Eficiencia Inducción Callo; (PCE) Presencia de Callo por Explante; (OX) Oxidación; (CN) Callo Nodular; (CC) Callo Compacto; (CR) Callo Raíz; (CF) Callo Friable; (NA) No Aplica; (BA) Benciladenina; (PIC) Ácido 4-amino-3,5,6-tricloro-2-piridincarboxílico; (AIA) ácido indolacético; (ANA) ácido naftalenacético; (2,4-D) ácido 2,4-diclorofenoxiacético; (A) Amarillo; (B) Blanco; (V) Verde; (C) Café. (+++) Abundante (++) Moderado (+) Escaso (-) Nula.



**Figura 11. Análisis de medias ANOM mediante proporciones en la inducción de tejido calloso de explante de tallo en *Agave salmiana* var. *xamini*, sometidos a diferentes concentraciones de (BA) benciladenina; (2,4-D) ácido 2,4-diclorofenoxiacético; (PIC) Ácido 4-amino-3,5,6-tricloro-2-piridincarboxílico; (AIA) ácido indolacético y (ANA) ácido naftalenacético. La gráfica muestra la proporción para cada tratamiento; la línea central indica la proporción general de todas las muestras y; las líneas rojas indican los límites de decisión con base a un nivel de significancia de 0.05. La proporción ubicada más allá de un límite de decisión especifica que la diferencia entre la proporción del grupo y la población general es estadísticamente significativa.**



**Figura 12. Análisis de medias ANOM mediante proporciones en la inducción de tejido caloso de explante de hoja en *Agave salmiana* var. *xamini*, sometidos a diferentes concentraciones de (BA) benciladenina; (2,4-D) ácido 2,4-diclorofenoxiacético; (PIC) Ácido 4-amino-3,5,6-tricloro-2-piridincarboxílico; (AIA) ácido indolacético y (ANA) ácido naftalenacético. La gráfica muestra la proporción para cada tratamiento; la línea central indica la proporción general de todas las muestras y; las líneas rojas indican los límites de decisión con base a un nivel de significancia de 0.05. La proporción ubicada más allá de un límite de decisión especifica que la diferencia entre la proporción del grupo y la población general es estadísticamente significativa.**



**Figura 13. Análisis de medias ANOM mediante proporciones en la inducción de tejido calloso de explante de raíz en *Agave salmiana* var. *xamini*, sometidos a diferentes concentraciones de (BA) benciladenina; (2,4-D) ácido 2,4-diclorofenoxiacético; (PIC) Ácido 4-amino-3,5,6-tricloro-2-piridincarboxílico; (AIA) ácido indolacético y (ANA) ácido naftalenacético. La gráfica muestra la proporción para cada tratamiento; la línea central indica la proporción general de todas las muestras y; las líneas rojas indican los límites de decisión con base a un nivel de significancia de 0.05. La proporción ubicada más allá de un límite de decisión específica que la diferencia entre la proporción del grupo y la población general es estadísticamente significativa.**

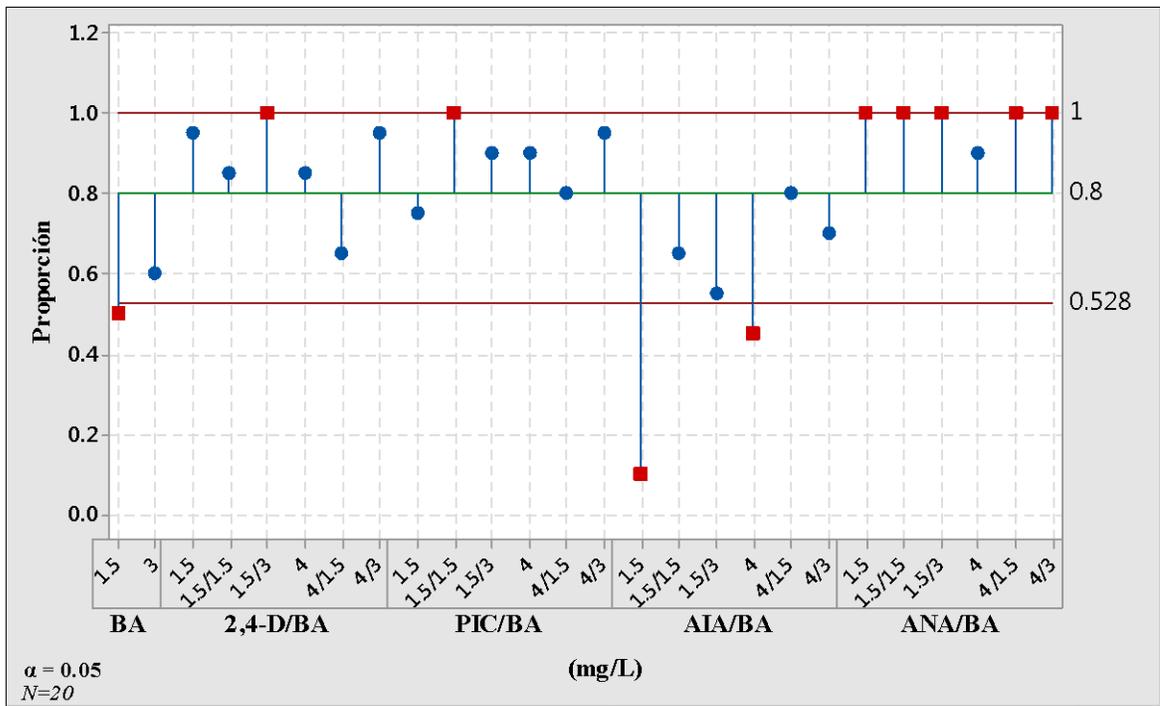
En la especie *Agave horrida* var. *perotensis* una evidente eficiencia en la inducción de tejido calloso fue registrada mediante el uso de explante de tallo con un 80 %; donde el uso de los tratamientos con ANA solos y en combinación con BA fueron los que presentaron mayor respuesta. Esta misma tendencia, aunque con menor eficiencia de inducción de callo, se presentó tanto para el explante de hoja como el de raíz. De manera general, el tejido calloso generado en su mayoría fue de tipo compacto con una coloración heterogénea y con escasa presencia de oxidación (Cuadro 6). Para el explante de tallo, el análisis de proporciones ANOM arrojó siete tratamientos con una proporción superior significativamente diferente a la proporción general de 0.8 correspondiente a todos los tratamientos, mientras que solo se observó tres tratamientos para explante de hoja y dos tratamientos para explante de raíz cuyas proporciones generales fueron de 0.2115 y 0.25 respectivamente (Figuras 14, 15 y 16).

**Cuadro 6. Efecto en la inducción de tejido calloso utilizando distintas concentraciones de AIA, ANA, 2,4-D, PIC, solas o en combinación con BA, en explantes de tallo, hoja y raíz de *Agave horrida* var. *perotensis*.**

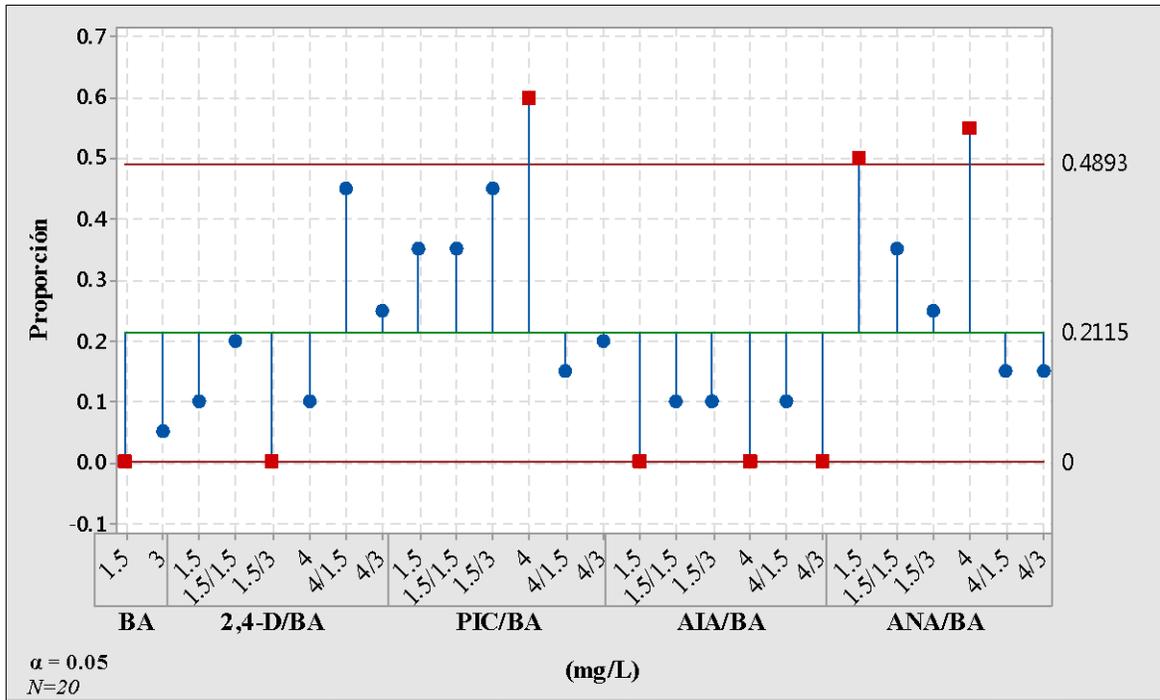
Tratamiento (mg/L)					Caracterización de tejido calloso														
2,4-D	PIC	AIA	ANA	BA	Tallo					Hoja					Raíz				
					EIC%	PCE	Tipo	Color	OX	EIC%	PCE	Tipo	Color	OX	EIC%	PCE	Tipo	Color	OX
-	-	-	-	-	0	-	NA	NA	+	0	-	NA	NA	+	0	-	NA	NA	+
-	-	-	-	1.5	50↓	+++	CB	B	-	0↓	-	NA	NA	++	0↓	-	NA	NA	+
-	-	-	-	3	60	+++	CC	B	-	5	+	CF	C/B	++	0↓	-	NA	NA	+
1.5	-	-	-	-	95	+++	CG	B/A	+	10	+	CC	A	+	35	+++	CC	A/B	+
1.5	-	-	-	1.5	85	+++	CG	B/A	+	20	+	CC	B/C	+	25	+	CC	A/B	+
1.5	-	-	-	3	100↑	+++	CC	A/B	-	0↓	-	NA	NA	++	30	+++	CC	B/C	++
4	-	-	-	-	85	++	CC	B/A	-	10	+	CC	A	+	0↓	-	NA	NA	-
4	-	-	-	1.5	65	+++	CC	B/A	++	45	+	CC	A/B	++	10	+	CC	A	++
4	-	-	-	3	95	+++	CC	A/B	+	25	++	CC	B/A	+	35	+++	CC	A	++
-	1.5	-	-	-	75	+++	CG	A	+	35	++	CG	A/B	++	50	++	CG	A	-
-	1.5	-	-	1.5	100↑	+++	CG	A/B	++	35	+	CC	A/B	+++	40	++	CC	A	++
-	1.5	-	-	3	90	+++	CG	C	+	45	+++	CG	A/B	+	30	++	CG	A/B	-
-	4	-	-	-	90	+++	CG	A/B	+	60↑	++	CG	A/B	+	45	+++	CG	A/B	-
-	4	-	-	1.5	80	+++	CG	C	+	15	+	CG	A	+++	35	++	CG	A/B	-
-	4	-	-	3	95	+++	CC	A/B	++	20	+	CC	A/B	+++	35	++	CC	A/B	++
-	-	1.5	-	-	10↓	+	CC	C	++	0↓	-	NA	NA	+++	10	+	CC	C	+
-	-	1.5	-	1.5	65	+++	CB	B	+	10	+	CC	C	+++	0↓	-	NA	NA	+
-	-	1.5	-	3	55	+++	CB	B	+	10	+	CC	C/B	++	0↓	-	NA	NA	-
-	-	4	-	-	45↓	+	CB	C/B	++	0↓	-	NA	NA	+++	20	+	CC	C/B	+
-	-	4	-	1.5	80	++	CC	C/B	+	10	+	CC	C/B	++	20	+	CC	C	+
-	-	4	-	3	70	+++	CB	C	+	0↓	-	NA	NA	+	0↓	-	NA	NA	-
-	-	-	1.5	-	100↑	+++	CR	B/A	+	50↑	+	CR	B/C	-	60↑	++	CR	B/A	+
-	-	-	1.5	1.5	100↑	+++	CR	B/V	-	35	+	CC	B	+++	35	+	CC	B/A	-
-	-	-	1.5	3	100↑	+++	CG	B/C	++	25	+++	CC	B/C	++	35	+	CC	B/C	+
-	-	-	4	-	90	++	CR	B/C	+	55↑	++	CR	B/C	+	40	+	CR	B/C	+
-	-	-	4	1.5	100↑	+++	CC	B/V	+	15	++	CC	B/A	++	55↑	+	CC	B/A	+
-	-	-	4	3	100↑	+++	CC	B	+	15	++	CR	B/C	+	5	+	CF	B/C	+
<b>Resumen</b>					<b>80.00</b>	<b>+++</b>	<b>CC</b>	<b>B/A</b>	<b>+</b>	<b>21.15</b>	<b>+</b>	<b>CC</b>	<b>A/B</b>	<b>++</b>	<b>25.00</b>	<b>+</b>	<b>CC</b>	<b>A/B</b>	<b>+</b>

N=20. ↑ = indica diferencia estadística respecto a la proporción general considerando el límite de decisión superior; ↓ = indica diferencia estadística respecto a la proporción general considerando el límite de decisión inferior.  $\alpha = 0.05$

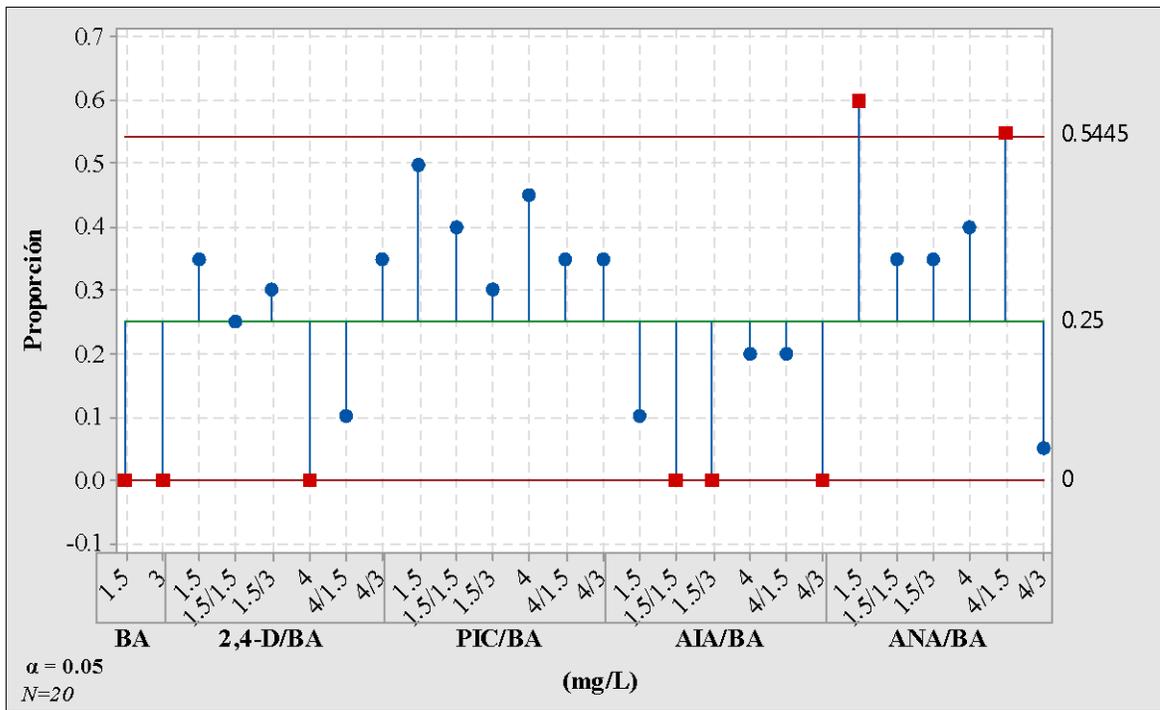
(EIC) Eficiencia Inducción Callo; (PCE) Presencia de Callo por Explante; (OX) Oxidación; (CN) Callo Nodular; (CC) Callo Compacto; (CR) Callo Raíz; (CF) Callo Friable; (NA) No Aplica; (BA) Benciladenina; (PIC) Ácido 4-amino-3,5,6-tricloro-2-piridincarboxílico; (AIA) ácido indolacético; (ANA) ácido naftalenacético; (2,4-D) ácido 2,4-diclorofenoxiacético; (A) Amarillo; (B) Blanco; (V) Verde; (C) Café. (+++) Abundante (++) Moderado (+) Escaso (-) Nula.



**Figura 14. Análisis de medias ANOM mediante proporciones en la inducción de tejido caloso de explante de tallo en *Agave horrida* var. *perotensis*, sometidos a diferentes concentraciones de (BA) benciladenina; (2,4-D) ácido 2,4-diclorofenoxiacético; (PIC) Ácido 4-amino-3,5,6-tricloro-2-piridincarboxílico; (AIA) ácido indolacético y (ANA) ácido naftalenacético. La gráfica muestra la proporción para cada tratamiento; la línea central indica la proporción general de todas las muestras y; las líneas rojas indican los límites de decisión con base a un nivel de significancia de 0.05. La proporción ubicada más allá de un límite de decisión específica que la diferencia entre la proporción del grupo y la población general es estadísticamente significativa.**

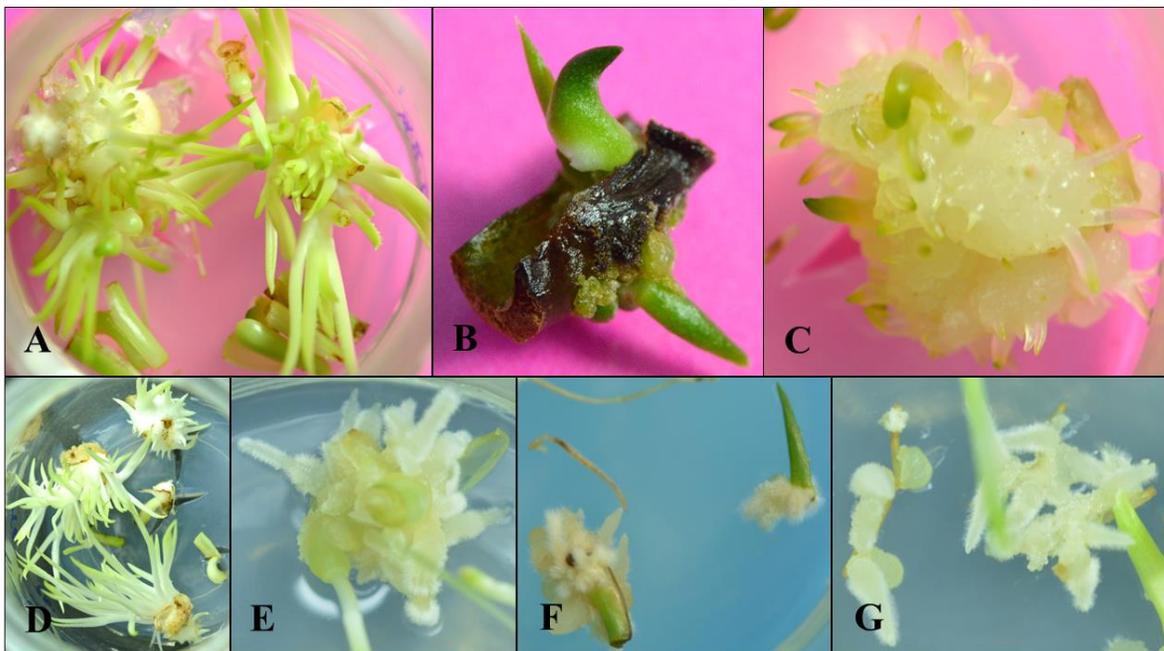


**Figura 15.** Análisis de medias ANOM mediante proporciones en la inducción de tejido caloso de explante de hoja en *Agave horrida* var. *perotensis*, sometidos a diferentes concentraciones de (BA) benciladenina; (2,4-D) ácido 2,4-diclorofenoxiacético; (PIC) Ácido 4-amino-3,5,6-tricloro-2-piridincarboxílico; (AIA) ácido indolacético y (ANA) ácido naftalenacético. La gráfica muestra la proporción para cada tratamiento; la línea central indica la proporción general de todas las muestras y; las líneas rojas indican los límites de decisión con base a un nivel de significancia de 0.05. La proporción ubicada más allá de un límite de decisión especifica que la diferencia entre la proporción del grupo y la población general es estadísticamente significativa.



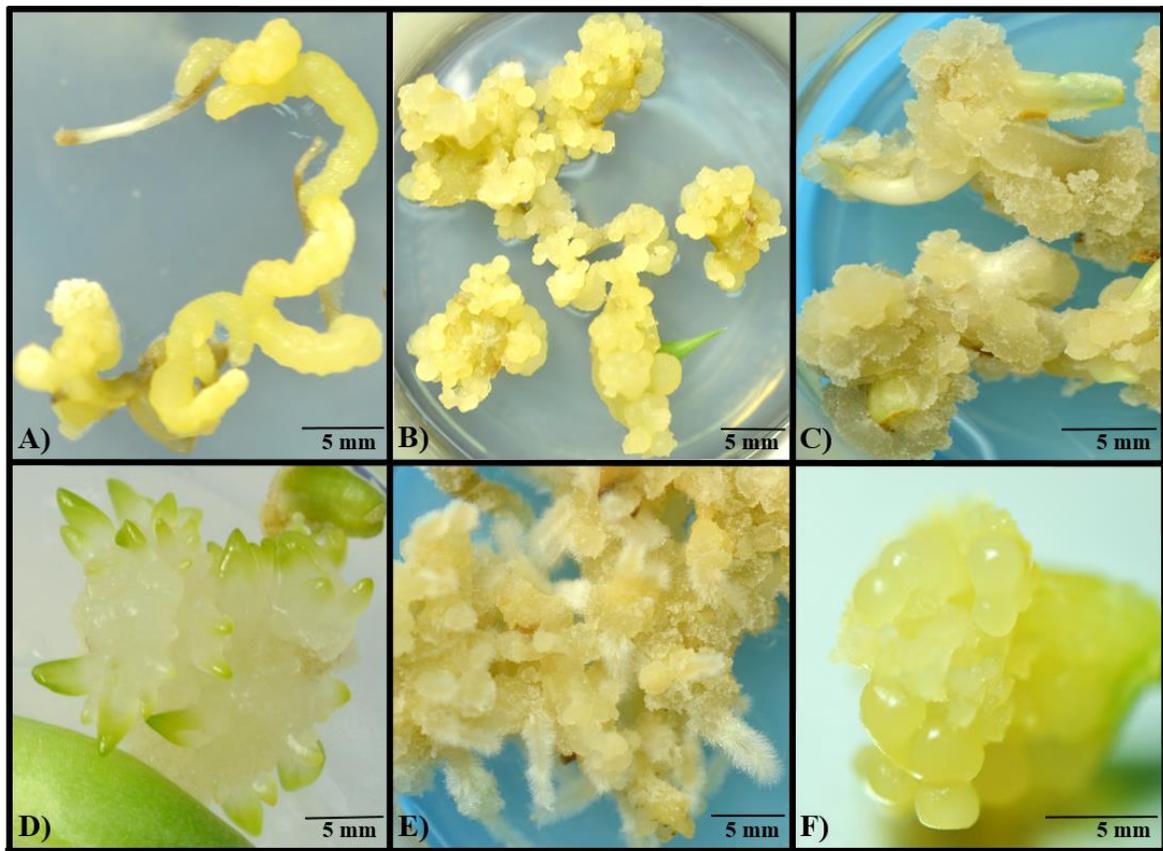
**Figura 16. Análisis de medias ANOM mediante proporciones en la inducción de tejido calloso de explante de raíz en *Agave horrida* var. *perotensis*, sometidos a diferentes concentraciones de (BA) benciladenina; (2,4-D) ácido 2,4-diclorofenoxiacético; (PIC) Ácido 4-amino-3,5,6-tricloro-2-piridincarboxílico; (AIA) ácido indolacético y (ANA) ácido naftalenacético. La gráfica muestra la proporción para cada tratamiento; la línea central indica la proporción general de todas las muestras y; las líneas rojas indican los límites de decisión con base a un nivel de significancia de 0.05. La proporción ubicada más allá de un límite de decisión especifica que la diferencia entre la proporción del grupo y la población general es estadísticamente significativa.**

Adicionalmente, algunas respuestas de organogénesis fueron observadas; como la generación de brotes mediante la activación de yemas basales y mediante el uso BA en explante de tallo, así como brotes adventicios en explante de hoja mediante el uso de BA. Este mismo regulador de crecimiento vegetal propició la formación de brotes vía organogénesis indirecta (posterior a la generación de tejido calloso) en explante de tallo. También se observó la generación de raíz vía organogénesis indirecta a partir del uso de ANA en explante de tallo, hoja y raíz (Figura 17).



**Figura 17. Diferentes respuestas morfológicas en distintos explantes de *Agave horrida* var *perotensis* expuestas a distintos reguladores de crecimiento vegetal.** Inducción directa de brotes basales en explante de tallo mediante el uso de 1.5 mg/L de benciladenina (BA) (A); inducción directa de brotes adventicios en explante de hoja mediante el uso de 3.0 mg/L de BA (B); inducción indirecta de brotes en explante de tallo mediante el uso de 3.0 mg/L de BA (C y D); inducción indirecta de raíces mediante el uso de 1.5 mg/L de ácido naftalenacético en explante de tallo (E), hoja (F) y raíz (G).

En términos generales *Agave wocomahi* obtuvo una eficiencia en la inducción de tejido calloso de 66 %, de este total, la generación de tejido calloso de tipo nodular fue la más persistente con 44.7 %, seguido del tejido calloso con raíz, compacto, friable y con presencia de brotes, y un color predominantemente amarillo blanquecino (Figura 18). Con respecto a los reguladores de crecimiento, los tratamientos con PIC y ANA fueron los que mostraron mayor eficiencia en la inducción de callo, seguidos del 2,4-D, AIA y BA. Cabe señalar que las concentraciones menores o iguales de auxinas con respecto a la BA, promueven una mayor inducción de tejido calloso. Esta observación es de manera general, no obstante, existen sus excepciones; un ejemplo se observó en *A. wocomahi*, donde el tratamiento con PIC mostró una mayor eficiencia de inducción de callo con concentraciones solas o mayores de auxina con respecto a la BA (Cuadro 7).



**Figura 18. Tipos de tejido calloso (TC) a partir de diferentes explantes de *Agave wocomahi*.** A) TC tipo compacto en explante de raíz; B) TC tipo nodular en explante de hoja; C) TC friable en explante de tallo; D) TC con brotes en explante de tallo; E) TC con raíz en explante de tallo; F) TC embriogénico en explante de tallo.

El 2,4-D generó en su mayoría un tejido calloso de tipo nodular en explantes de tallo, hoja y raíz con una abundante PCE y un color predominante amarillo con menor tonalidad de blanco y café. Con el uso de ANA, se obtuvo un tejido calloso con generación de raíz, en una coloración predominantemente blanca con menor tonalidad en café, persistente, homogéneo y con abundante PCE en prácticamente todos los explantes; por otro lado, el efecto del PIC fue en general homogéneo en los explantes de tallo y hoja, caracterizados por la generación de tejido calloso de tipo nodular, con abundante PCE, en su mayoría con un color amarillo blanquecino. Por su parte, los tratamientos con AIA mostraron una EIC por debajo de la proporción media en todos los explantes; además, mostraron una escasa PCE de tejido calloso predominantemente con tono blanquecino, del tipo friable, seguido del tipo compacto y con presencia de brotes. No obstante, esta auxina generó las respuestas de inducción de tejido calloso y morfogénesis más diversas. La inducción de tejido calloso mediante el uso de la BA sin la combinación de otros reguladores de crecimiento vegetal fue escasa en explante de tallo y hoja, e incluso nulo en explante de raíz.

El explante de tallo fue el que mostró la mayor eficiencia de inducción de callo con 73.2 %, mientras que la raíz fue el que presentó menor generación de tejido calloso con 52.1 %. El análisis de proporciones ANOM arrojó 11 tratamientos con una proporción superior significativamente diferente a la proporción general de 0.731 correspondiente a todos los tratamientos en explante de tallo, mientras que solo se observaron cinco tratamientos para explante de hoja y seis tratamientos para explante de raíz, cuyas proporciones generales fueron de 0.727 y 0.521, respectivamente. Cabe mencionar, que de los 22 tratamientos que presentaron una proporción en la inducción de tejido calloso por encima de la media (diferencia estadísticamente significativa) 20 de estos derivaron del uso de PIC y ANA solos y en combinación con BA (Figuras 19, 20 y 21).

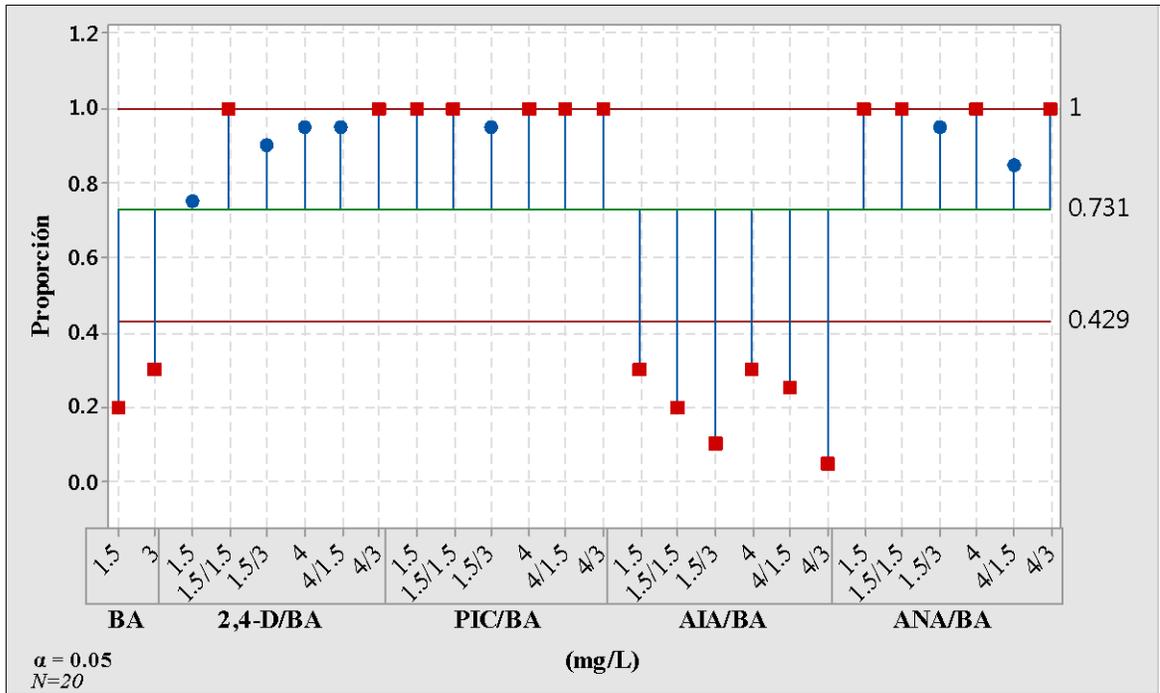
Adicionalmente, algunas respuestas de organogénesis fueron observadas; como la generación de brotes mediante la activación de yemas basales por el uso BA en explante de tallo, así como brotes adventicios en explante de hoja mediante el uso de BA y en explante de raíz mediante el uso AIA en combinación de BA. También se observó la generación directa de raíces mediante el uso de AIA en explante de hoja. Otra respuesta que se generó fue la embriogénesis somática directa mediante el uso de AIA en combinación con BA en explante de hoja, así como embriogénesis somática indirecta (posterior a la generación de tejido calloso) en explante de tallo con el uso de los mismos reguladores de crecimiento vegetal (Figura 22).

**Cuadro 7. Efecto en la inducción de tejido calloso utilizando distintas concentraciones de AIA, ANA, 2,4-D, PIC, solas o en combinación con BA, en explantes de tallo, hoja y raíz de *Agave wocomahi*.**

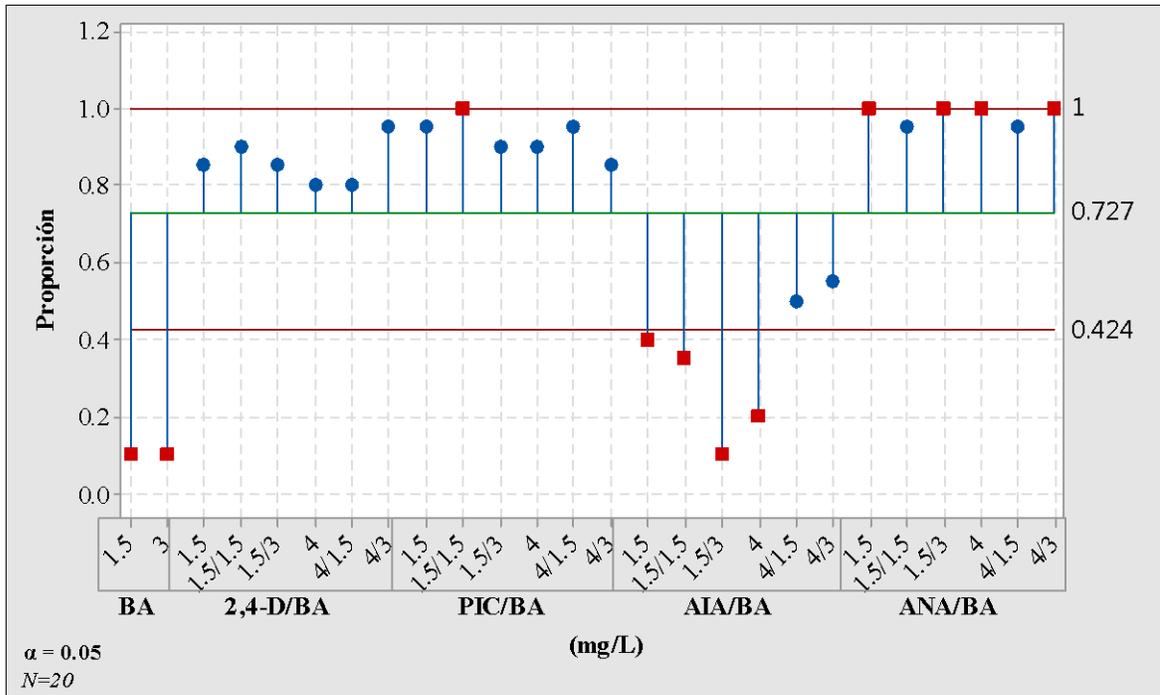
Tratamiento (mg/L)					Caracterización de tejido calloso														
2,4-D	PIC	AIA	ANA	BA	Tallo					Hoja					Raíz				
					EIC%	PCE	Tipo	Color	OX	EIC%	PCE	Tipo	Color	OX	EIC%	PCE	Tipo	Color	OX
-	-	-	-	-	0	-	NA	NA	+	0	-	NA	NA	++	0	-	NA	NA	+
-	-	-	-	1.5	22	+	CC	B	-	8	+	CF	B	+	0↓	-	NA	NA	-
-	-	-	-	3	32	+++	CF	B	-	8	+	CC	B/V	-	0↓	-	NA	NA	+
1.5	-	-	-	-	75	+++	CC	A/B	+	85	+++	CN	A/B	+	70	+	CC	B	+
1.5	-	-	-	1.5	100↑	+++	CN	A	+	90	+++	CN	A/B	+	55	+++	CN	A	-
1.5	-	-	-	3	90	+++	CN	B	+	85	+++	CN	A/V	-	55	+++	CN	A	+
4	-	-	-	-	95	++	CN	A/B	+	80	++	CC	A	+	45	+	CC	A	+
4	-	-	-	1.5	95	+++	CC	A	++	80	++	CN	A/B	+	50	+++	CN	A/C	+
4	-	-	-	3	100↑	+++	CN	A/B	+	95	+++	CN	A/C	+	55	+++	CC	A	+
-	1.5	-	-	-	100↑	+++	CN	A	++	95	+++	CN	A	+	95↑	+++	CN	A	++
-	1.5	-	-	1.5	100↑	+++	CN	A/B	+	100↑	+++	CN	A/B	+	90↑	++	CF	C	+++
-	1.5	-	-	3	95	+++	CN	C/B	++	90	+++	CC	C/B	+	70	++	CN	C	+++
-	4	-	-	-	100↑	+++	CN	A	+	90	+++	CN	A	+	100↑	+	CC	A/B	+
-	4	-	-	1.5	100↑	+++	CN	A/B	+	95	++	CN	A/B	+	90↑	++	CC	A/B	+++
-	4	-	-	3	100↑	+++	CN	A/B	+	85	+++	CN	A/B	+	80	++	CC	A/B	++
-	-	1.5	-	-	30↓	+	CF	B/V	+	40↓	+	CF	B/A	+	0↓	-	NA	NA	-
-	-	1.5	-	1.5	20↓	++	CF	B	+	35↓	+	CF	B	-	10↓	+	CC	C	++
-	-	1.5	-	3	10↓	+	CC	B/A	+	10↓	+	CF	B	+	5↓	+	CC	C	++
-	-	4	-	-	30↓	+	CF	B/V	+	20↓	+	CF	B	+	0↓	-	NA	NA	++
-	-	4	-	1.5	25↓	+	CF	B	+	50	++	CC	B/V	+	0↓	-	NA	NA	++
-	-	4	-	3	5↓	++	CC	B	+	55	++	CC	A/V	+	0↓	-	NA	NA	++
-	-	-	1.5	-	100↑	+++	CR	B/C	-	100↑	+++	CR	B/C	-	80	+++	CR	B/C	-
-	-	-	1.5	1.5	100↑	+++	CR	B/C	+	95	+++	CR	B/C	-	95↑	++	CR	B/C	++
-	-	-	1.5	3	95	+++	CN	C/B	++	100↑	+++	CR	C/B	+	90↑	++	CR	C/B	++
-	-	-	4	-	100↑	+++	CR	B/C	-	100↑	+++	CR	B/C	-	80	+++	CR	B/C	-
-	-	-	4	1.5	85	+++	CR	C/B	++	95	+++	CR	C/B	++	85	++	CR	C/B	++
-	-	-	4	3	100↑	+++	CR	C/B	+	100↑	+++	CR	C/B	+	55	++	CR	C/B	++
<b>Resumen</b>					<b>73.2</b>	<b>+++</b>	<b>CN</b>	<b>A/B</b>	<b>+</b>	<b>72.5</b>	<b>+++</b>	<b>CN</b>	<b>A/B</b>	<b>+</b>	<b>52.1</b>	<b>++</b>	<b>CR</b>	<b>A</b>	<b>++</b>

N=20. ↑ = indica diferencia estadística respecto a la proporción general considerando el límite de decisión superior; ↓= indica diferencia estadística respecto a la proporción general considerando el límite de decisión inferior.  $\alpha = 0.05$

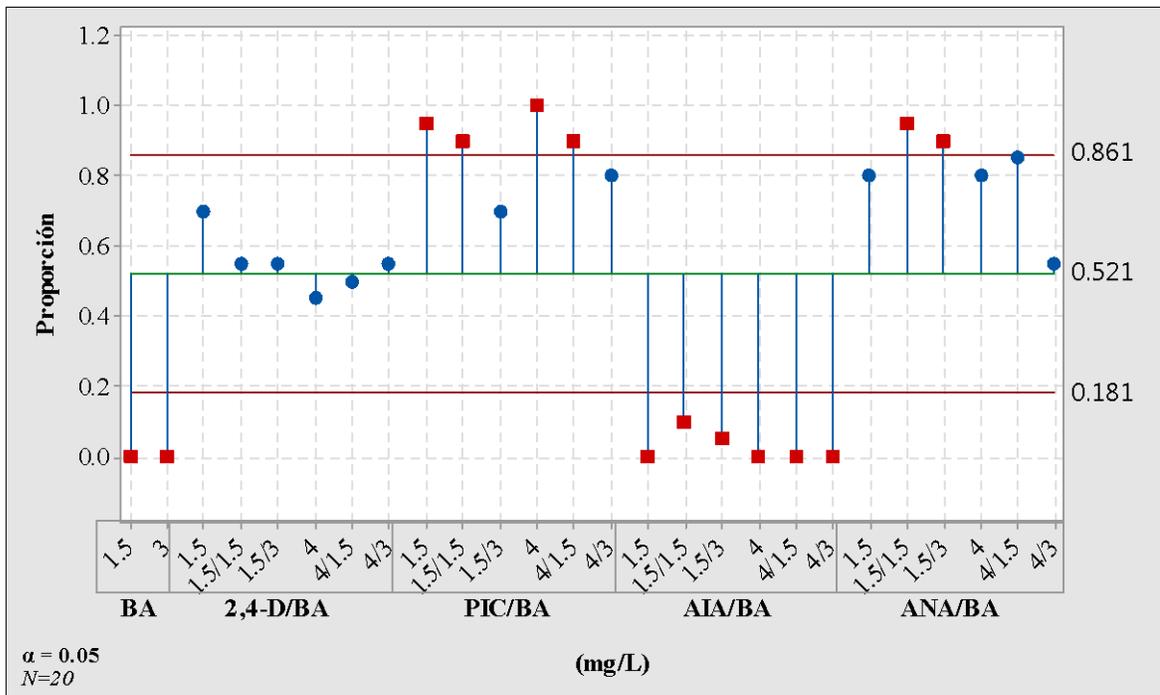
(EIC) Eficiencia Inducción Callo; (PCE) Presencia de Callo por Explante; (OX) Oxidación; (CN) Callo Nodular; (CC) Callo Compacto; (CR) Callo Raíz; (CF) Callo Friable; (NA) No Aplica; (BA) Benciladenina; (PIC) Ácido 4-amino-3,5,6-tricloro-2-piridincarboxílico; (AIA) ácido indolacético; (ANA) ácido naftalenacético; (2,4-D) ácido 2,4-diclorofenoxiacético; (A) Amarillo; (B) Blanco; (V) Verde; (C) Café. (+++) Abundante (++) Moderado (+) Escaso (-) Nula.



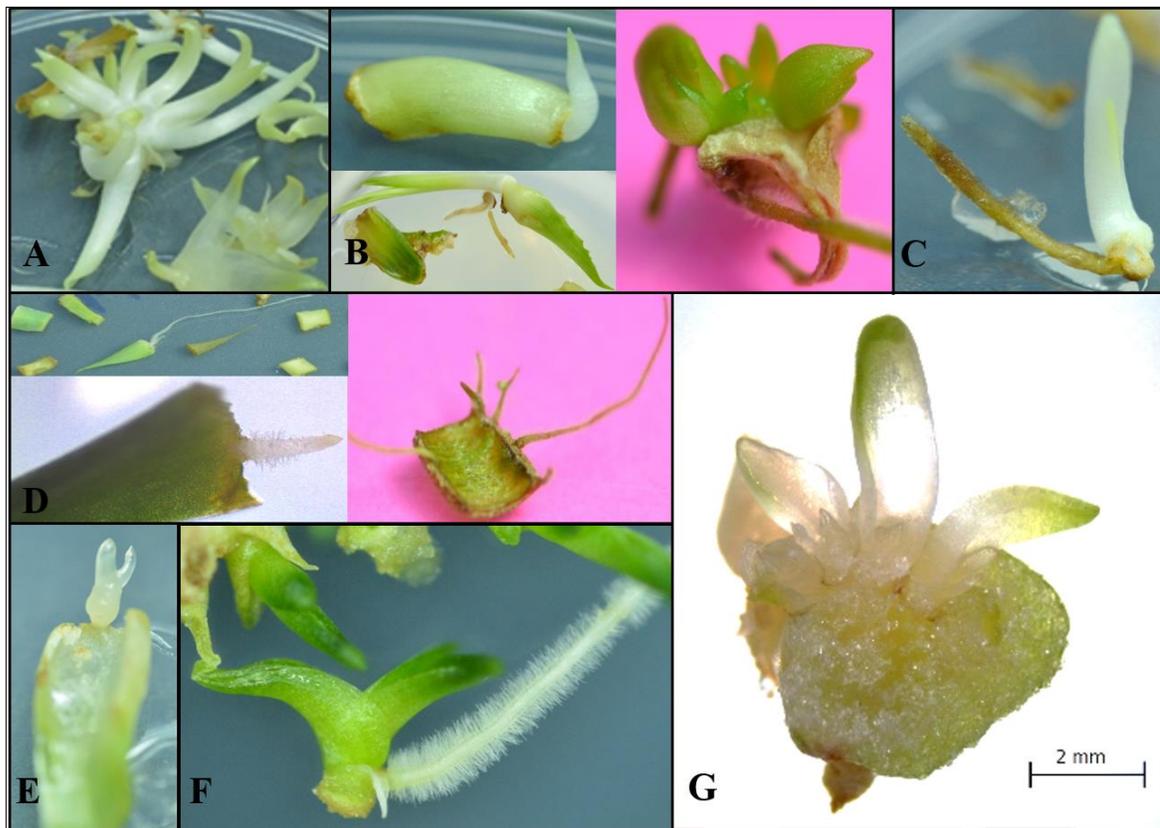
**Figura 19. Análisis de medias ANOM mediante proporciones en la inducción de tejido caloso de explante de tallo en *Agave wocomahi*, sometidos a diferentes concentraciones de (BA) benciladenina; (2,4-D) ácido 2,4-diclorofenoxiacético; (PIC) Ácido 4-amino-3,5,6-tricloro-2-piridincarboxílico; (AIA) ácido indolacético y (ANA) ácido naftalenacético. La gráfica muestra la proporción para cada tratamiento; la línea central indica la proporción general de todas las muestras y; las líneas rojas indican los límites de decisión con base a un nivel de significancia de 0.05. La proporción ubicada más allá de un límite de decisión especifica que la diferencia entre la proporción del grupo y la población general es estadísticamente significativa.**



**Figura 20. Análisis de medias ANOM mediante proporciones en la inducción de tejido calloso de explante de hoja en *Agave wocomahi*, sometidos a diferentes concentraciones de (BA) benciladenina; (2,4-D) ácido 2,4-diclorofenoxiacético; (PIC) Ácido 4-amino-3,5,6-tricloro-2-piridincarboxílico; (AIA) ácido indolacético y (ANA) ácido naftalenacético. La gráfica muestra la proporción para cada tratamiento; la línea central indica la proporción general de todas las muestras y; las líneas rojas indican los límites de decisión con base a un nivel de significancia de 0.05. La proporción ubicada más allá de un límite de decisión especifica que la diferencia entre la proporción del grupo y la población general es estadísticamente significativa.**

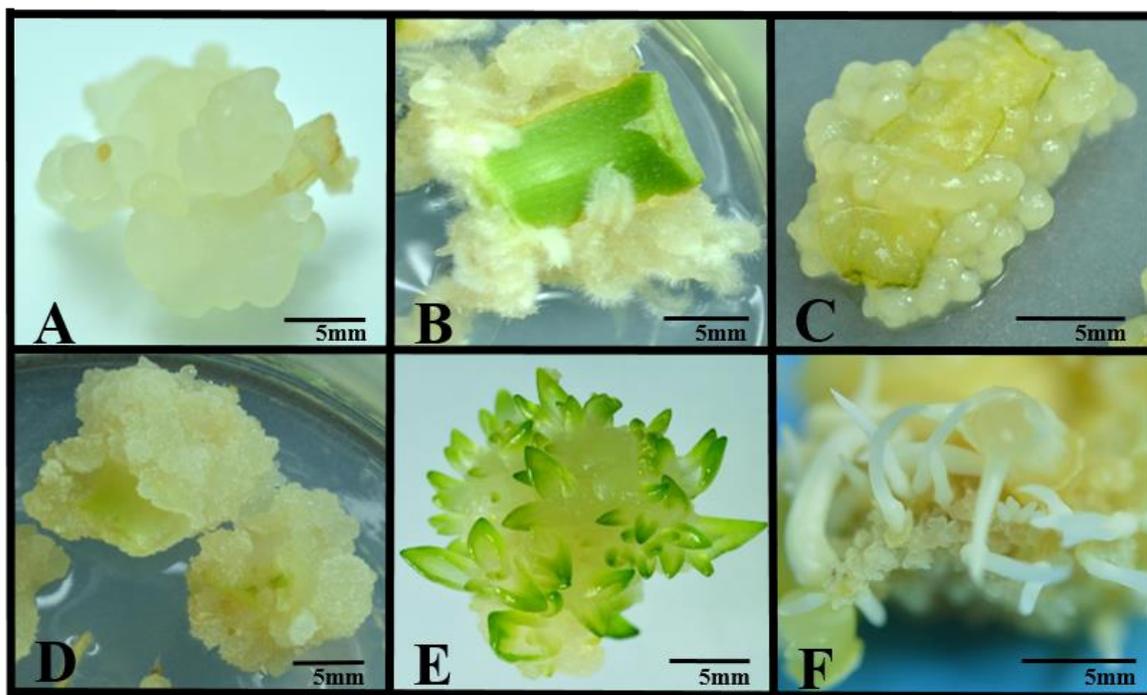


**Figura 21. Análisis de medias ANOM mediante proporciones en la inducción de tejido calloso de explante de raíz en *Agave wocomahi*, sometidos a diferentes concentraciones de (BA) benciladenina; (2,4-D) ácido 2,4-diclorofenoxiacético; (PIC) Ácido 4-amino-3,5,6-tricloro-2-piridincarboxílico; (AIA) ácido indolacético y (ANA) ácido naftalenacético. La gráfica muestra la proporción para cada tratamiento; la línea central indica la proporción general de todas las muestras y; las líneas rojas indican los límites de decisión con base a un nivel de significancia de 0.05. La proporción ubicada más allá de un límite de decisión especifica que la diferencia entre la proporción del grupo y la población general es estadísticamente significativa.**



**Figura 22. Respuestas morfológicas en distintos explantes de *Agave wocomahi* expuestas a distintos reguladores de crecimiento vegetal.** Inducción directa de brotes basales en explante de tallo mediante el uso de 3.0 mg/L de (BA) benciladenina (A); inducción directa de brotes adventicios mediante el uso de 3.0 mg/L de BA en explante de hoja (B); inducción directa de brotes adventicios mediante el uso de 1.5 mg/L de (AIA) ácido indolacético en combinación de 1.5 mg/L de BA en explante de raíz (C); inducción directa de raíces mediante el uso de 4.0 mg/L de AIA en explante de hoja (D); embriogénesis somática directa obtenida mediante el uso de 4.0 mg/L de AIA en combinación de 1.5 mg/L de BA en explante de hoja (E); embriogénesis somática indirecta obtenida mediante el uso de 1.5 mg/L de AIA en combinación de 3.0 mg/L de BA en explante de tallo (F) e inducción indirecta de brotes a partir de explante de tallo mediante el uso de 1.5 mg/L de AIA (G).

En *Agave parryi* var. *huachucensis* se obtuvo en general una eficiencia de inducción de callo de 74.1 % cuyo color de tejido calloso predominante fue el amarillo con baja tonalidad de blanco y café, del cual, el tejido calloso de tipo compacto fue el más evidente con 35.8 % con una PCE escasa en lo general, seguido del tejido calloso con raíz 30.36 %, nodular 23.38 %, friable 9.08 % y con presencia de brotes 1.38 % (Figura 23).



**Figura 23. Tipos de tejido calloso (TC) a partir de diferentes explantes de *Agave parryi* var. *huachucensis*.** TC de tipo compacto en explante de tallo (A); TC con raíz en explante de hoja (B); TC de tipo nodular en explante de hoja (C); TC de tipo friable en explante de hoja (D); TC con brotes en explante de tallo (E) y; TC embriogénico en explante de hoja (F).

Al evaluar el efecto de los reguladores de crecimiento vegetal, el AIA fue el que mostró mayor eficiencia de inducción de callo con 27 %, seguido del PIC con 25.2 %, el ANA con 24.4 % y el 2,4-D con 17.5 %. Los tratamientos sometidos al efecto del AIA y ANA presentaron una abundante PCE principalmente en explante de tallo y hoja; mientras que los tratamientos con 2,4-D y BA presentaron escasa PCE. Cabe destacar que los tratamientos con PIC y ANA mostraron una mayor homogeneidad respecto al tejido calloso obtenido, con la generación de tejido calloso nodular y con raíz respectivamente. Los tratamientos con AIA se caracterizaron por una alta eficiencia de inducción de callo con un predominantemente tejido calloso con raíz, seguido de un tejido calloso compacto y tejido calloso friable, todos ellos con una abundante PCE; cabe señalar, que el efecto del AIA, así como el del 2,4-D mostraron mayor diversidad de respuesta con respecto al tipo de tejido calloso. Con referencia a la coloración del tejido calloso, en los tratamientos con 2,4-D y PIC resultó una tendencia al amarillo blanquecino para los tres tipos de explante, así también, prevaleció una evidente coloración en blanco con el uso de ANA y BA, y un café blanquecino en tratamientos con AIA. Con respecto a los tratamientos con solo el uso de BA, se encontró un efecto prácticamente nulo en la eficiencia de inducción de callo en explante de raíz; no obstante, aunque con una PCE moderada, se obtuvo la inducción de tejido calloso en explante de tallo y hoja. Cabe destacar que las

concentraciones menores o iguales de auxinas con respecto a la BA, promueven una mayor inducción de tejido calloso (Cuadro 8).

Con respecto al explante, el tallo fue el que mostró la mayor eficiencia de inducción de callo con 88.1 %, seguido del explante de hoja con 74.6 %, mientras que la raíz fue el que presentó menor generación de tejido calloso con 59.6 %. El análisis de proporciones ANOM arrojó nueve tratamientos con una proporción superior significativamente diferente a la proporción general de 0.8808 correspondiente a todos los tratamientos en explante de tallo, mientras que solo se observaron cuatro tratamientos para explante de hoja y dos tratamientos para explante de raíz cuyas proporciones generales fueron de 0.746 y 0.596, respectivamente. Cabe mencionar, que de los 15 tratamientos que presentaron una proporción en la inducción de tejido calloso por encima de la media (diferencia estadísticamente significativa) siete de estos derivaron del uso de AIA solo y en combinación de BA (Figuras 24, 25 y 26).

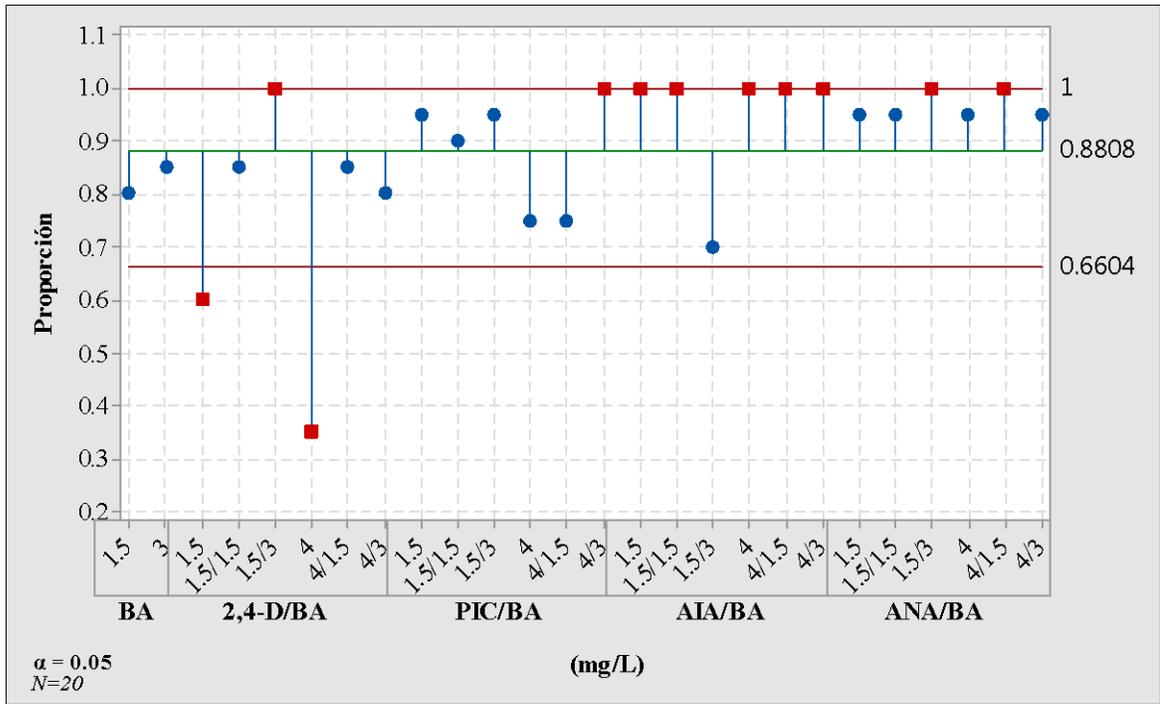
Adicionalmente, algunas respuestas de organogénesis fueron observadas; como la generación de brotes mediante la activación de yemas basales con el uso de BA sola y en combinación con AIA en explante de tallo; así como brotes adventicios en explante de hoja mediante el uso de BA. La generación de brotes vía organogénesis indirecta (posterior a la generación de tejido calloso) mediante el uso de BA en combinación de AIA con explante de tallo y en explante de hoja. También se observó la generación directa de raíz a partir del uso de AIA en explante de hoja y la generación indirecta de raíz mediante el uso de AIA y ANA solas y en combinación con BA con los tres tipos de explantes. Otra respuesta que se observó fue la inducción de embriogénesis somática en respuesta al estímulo del ANA solo y en combinación de BA en explante de tallo; también con el AIA en combinación con BA en explante de tallo; con el 2,4-D en explante de tallo y hoja, así como con el 2,4-D en combinación de BA en explante de hoja; con el PIC en combinación con BA en explante de hoja; así como con el uso de BA en explante de tallo (Figura 27).

**Cuadro 8. Efecto en la inducción de tejido calloso utilizando distintas concentraciones de AIA, ANA, 2,4-D, PIC, solas o en combinación con BA, en explantes de tallo, hoja y raíz de *Agave parryi* var. *huachucensis*.**

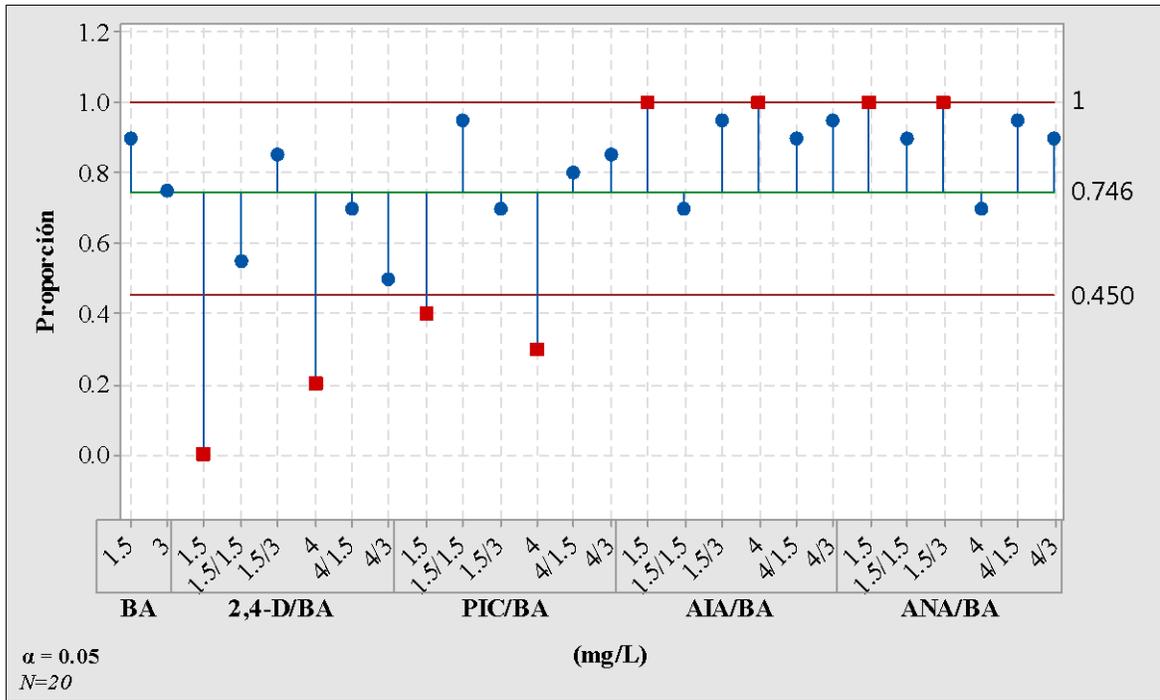
Tratamiento (mg/L)						Caracterización de tejido calloso													
2,4-D	PIC	AIA	ANA	BA	Tallo				Hoja				Raíz						
					EIC%	PCE	Tipo	Color	OX	EIC%	PCE	Tipo	Color	OX	EIC%	PCE	Tipo	Color	OX
-	-	-	-	-	20	+	CC	B/C	+	10	+	CF	B	-	0	-	NA	NA	+
-	-	-	-	1.5	80	++	CB	B	+	90	+	CC	B	+	5↓	+	CC	C/B	+
-	-	-	-	3	85	++	CC	B	+	75	+	CC	B	+	10↓	+	CC	B	+
1.5	-	-	-	-	60↓	++	CN	A/C	+	0↓	-	NA	NA	-	50	+	CC	A	-
1.5	-	-	-	1.5	85	++	CC	A/B	-	55	+	CC	A/B	+	60	++	CN	C/A	+
1.5	-	-	-	3	100↑	++	CC	A/B	+	85	+	CN	A/B	+	55	++	CN	A/C	+
4	-	-	-	-	35↓	+	CC	A	+	20↓	+	CC	A	+	30↓	+	CC	A	-
4	-	-	-	1.5	85	++	CF	A	+	70	+	CN	A/C	++	45	+	CF	C	+
4	-	-	-	3	80	++	CC	A/B	+	50	+	CC	A/B	+	45	+	CF	A	+
-	1.5	-	-	-	95	++	CN	A	+	40	+	CC	B/A	+	100↑	+++	CN	A	-
-	1.5	-	-	1.5	90	++	CN	A/B	+	95	++	CN	A/B	-	90	+	CC	A	++
-	1.5	-	-	3	95	+++	CC	A	-	70	++	CN	A	+	65	++	CN	A/B	++
-	4	-	-	-	75	++	CN	A	+	30↓	+	CC	B	+	100↑	+++	CC	A	+
-	4	-	-	1.5	75	++	CN	A/B	-	80	++	CN	A/B	+	90	++	CN	B/C	+
-	4	-	-	3	100↑	+++	CN	A/B	-	85	++	CN	A	+	80	++	CC	B/C	+
-	-	1.5	-	-	100↑	+++	CR	C/B	-	100↑	++	CR	C/B	-	95	+++	CR	C/B	-
-	-	1.5	-	1.5	100↑	++	CC	C/B	-	70	++	CR	C/B	-	65	+++	CC	C/B	-
-	-	1.5	-	3	70	+++	CC	C/B	-	95	++	CC	C/B	-	50	+++	CC	C/B	-
-	-	4	-	-	100↑	+++	CR	C/B	-	100↑	+++	CR	C/B	-	60	+++	CR	C/B	-
-	-	4	-	1.5	100↑	+++	CF	B/C	-	90	+++	CR	C/B	-	80	+++	CR	C/B	+
-	-	4	-	3	100↑	+++	CF	B/C	-	95	+++	CC	C/B	-	90	+++	CC	B/C	+
-	-	-	1.5	-	95	++	CR	B/A	-	100↑	+++	CR	A/B	-	10↓	++	CC	C/B	+
-	-	-	1.5	1.5	95	+++	CR	B/A	-	90	+++	CC	B/V	-	75	+	CR	B/C	+
-	-	-	1.5	3	100↑	+++	CR	B/A	-	100↑	+++	CC	B/A	-	55	++	CF	B/C	+
-	-	-	4	-	95	++	CR	A/B	-	70	++	CR	B/A	-	45	++	CR	C/B	+
-	-	-	4	1.5	100↑	+++	CR	B/A	-	95	+++	CR	B/A	-	30↓	++	CC	B/C	+
-	-	-	4	3	95	+++	CF	B/A	-	90	+++	CR	B/V	-	70	+	CC	B/C	+
<b>Resumen</b>					<b>88.1</b>	<b>++</b>	<b>CR</b>	<b>A/B</b>	<b>-</b>	<b>74.6</b>	<b>+++</b>	<b>CC</b>	<b>C/B</b>	<b>-</b>	<b>59.6</b>	<b>+++</b>	<b>CC</b>	<b>B/C</b>	<b>+</b>

N=20. ↑ = indica diferencia estadística respecto a la proporción general considerando el límite de decisión superior; ↓ = indica diferencia estadística respecto a la proporción general considerando el límite de decisión inferior. Alfa = 0.05

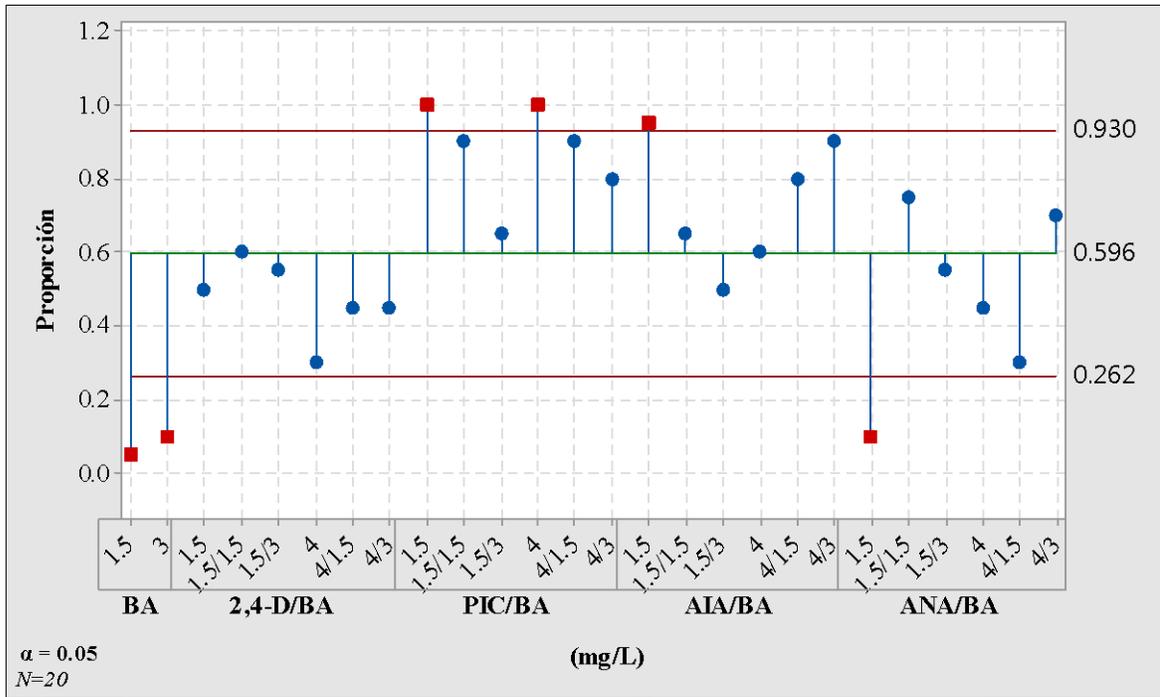
(EIC) Eficiencia Inducción Callo; (PCE) Presencia de Callo por Explante; (OX) Oxidación; (CN) Callo Nodular; (CC) Callo Compacto; (CR) Callo Raíz; (CF) Callo Friable; (CB) Callo Brote; (NA) No Aplica; (BA) Benciladenina; (PIC) Ácido 4-amino-3,5,6-tricloro-2-piridincarboxílico; (AIA) ácido indolacético; (ANA) ácido naftalenacético; (2,4-D) ácido 2,4-diclorofenoxiacético. (B) Blanco; (A) Amarillo; (C) Café; (V) Verde. (+++) Abundante (++) Moderado (+) Escaso (-) Nula.



**Figura 24.** Análisis de medias ANOM mediante proporciones en la inducción de tejido calloso de explante de tallo en *Agave parryi* var. *huachucensis*, sometidos a diferentes concentraciones de (BA) benciladenina; (2,4-D) ácido 2,4-diclorofenoxiacético; (PIC) Ácido 4-amino-3,5,6-tricloro-2-piridincarboxílico; (AIA) ácido indolacético y (ANA) ácido naftalenacético. La gráfica muestra la proporción para cada tratamiento; la línea central indica la proporción general de todas las muestras y; las líneas rojas indican los límites de decisión con base a un nivel de significancia de 0.05. La proporción ubicada más allá de un límite de decisión específica que la diferencia entre la proporción del grupo y la población general es estadísticamente significativa.

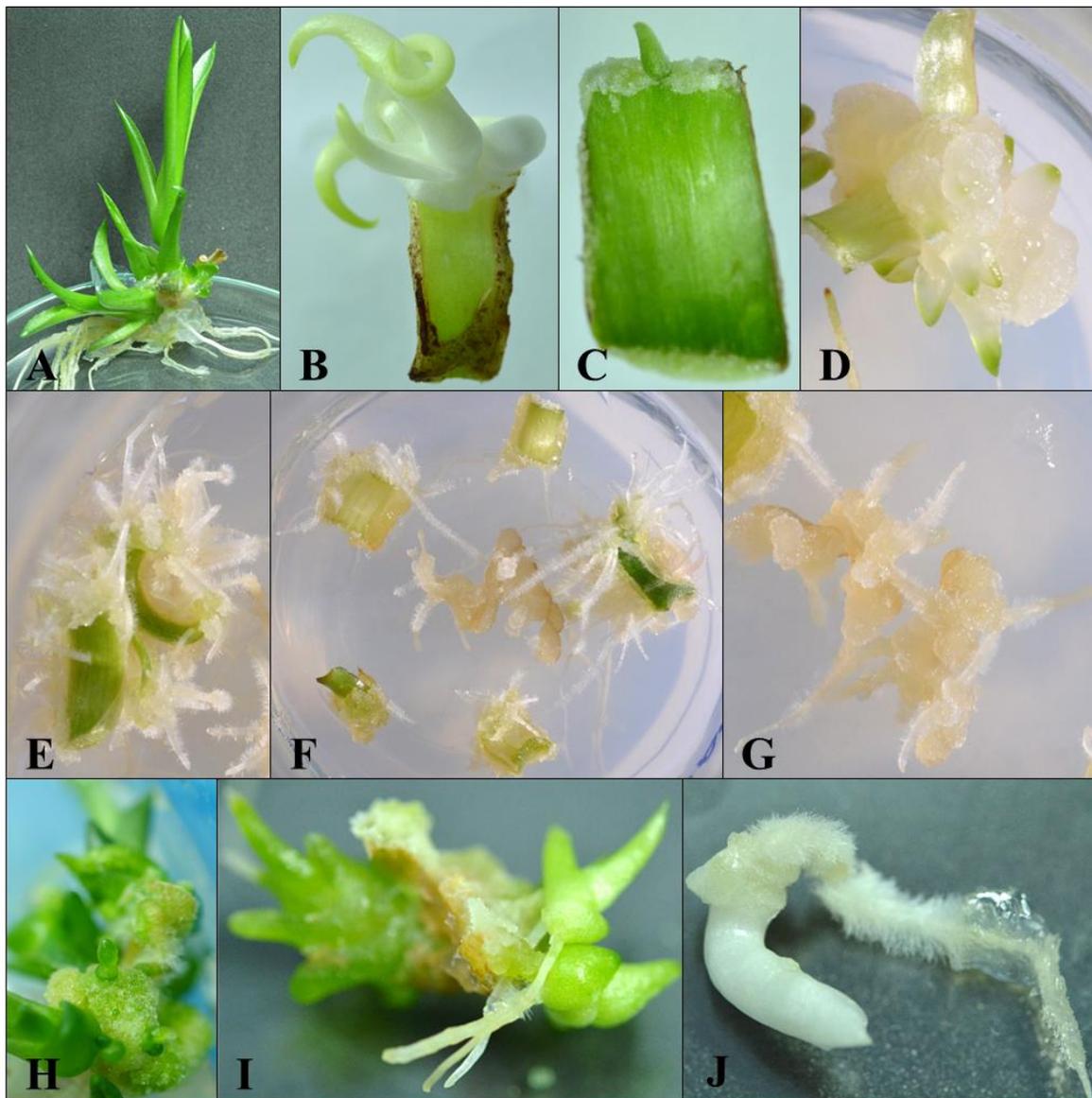


**Figura 25. Análisis de medias ANOM mediante proporciones en la inducción de tejido caloso de explante de hoja en *Agave parryi* var. *huachucensis*, sometidos a diferentes concentraciones de (BA) benciladenina; (2,4-D) ácido 2,4-diclorofenoxiacético; (PIC) Ácido 4-amino-3,5,6-tricloro-2-piridincarboxílico; (AIA) ácido indolacético y (ANA) ácido naftalenacético. La gráfica muestra la proporción para cada tratamiento; la línea central indica la proporción general de todas las muestras y; las líneas rojas indican los límites de decisión con base a un nivel de significancia de 0.05. La proporción ubicada más allá de un límite de decisión especifica que la diferencia entre la proporción del grupo y la población general es estadísticamente significativa.**



**Figura 26. Análisis de medias ANOM mediante proporciones en la inducción de tejido calloso de explante de raíz en *Agave parryi* var. *huachucensis*, sometidos a diferentes concentraciones de (BA) benciladenina; (2,4-D) ácido 2,4-diclorofenoxiacético; (PIC) Ácido 4-amino-3,5,6-tricloro-2-piridincarboxílico; (AIA) ácido indolacético y (ANA) ácido naftalenacético. La gráfica muestra la proporción para cada tratamiento; la línea central indica la proporción general de todas las muestras y; las líneas rojas indican los límites de decisión con base a un nivel de significancia de 0.05. La proporción ubicada más allá de un límite de decisión especifica que la diferencia entre la proporción del grupo y la población general es estadísticamente significativa.**

De manera general, se seleccionó un tratamiento por especie y por regulador de crecimiento vegetal que representó la mejor estrategia para inducir el tejido calloso (Cuadro 9). Cabe mencionar, que para elegir un tratamiento adecuado es necesario considerar no solo la eficiencia de inducción de callo, sino también la presencia de callo por explante, la incidencia de oxidación y probablemente lo más importante, el tipo de tejido calloso, el cual es determinado por el objetivo que persigue la investigación.



**Figura 27. Respuestas morfológicas en diferentes explantes de *Agave parryi* var. *huachucensis* expuestos a distintos reguladores de crecimiento vegetal.** Inducción directa de brotes basales mediante el uso de 1.5 mg/L de (BA) benciladenina en explante de tallo (A); inducción directa de brotes adventicios mediante el uso de 1.5 mg/L de BA en explante de hoja (B); inducción indirecta de brotes mediante el uso de 1.5 mg/L de (AIA) ácido indolacético en combinación con 3.0 mg/L de BA a partir de explante de hoja (C); inducción indirecta de brotes mediante el uso de 1.5 mg/L de AIA en combinación con 3.0 mg/L de BA a partir de explante de tallo (D); inducción indirecta de raíces mediante el uso de 4.0 mg/L de AIA en explante de tallo (E), hoja (F) y raíz (G); embriogénesis somática inducida indirectamente mediante el uso de 3.0 mg/L de BA (H); inducción de embriogénesis somática mediante el uso de 1.5 mg/L de AIA en combinación con 3.0 mg/L de BA en explante de tallo (I); y embriogénesis somática indirecta mediante el uso de 1.5 mg/L de AIA en combinación de 1.5 mg/L de BA en explante de tallo (J).

**Cuadro 9. Resumen de tratamientos con mejor respuesta para la inducción de callo en especies de agaves utilizando diferentes reguladores de crecimiento (RCV).**

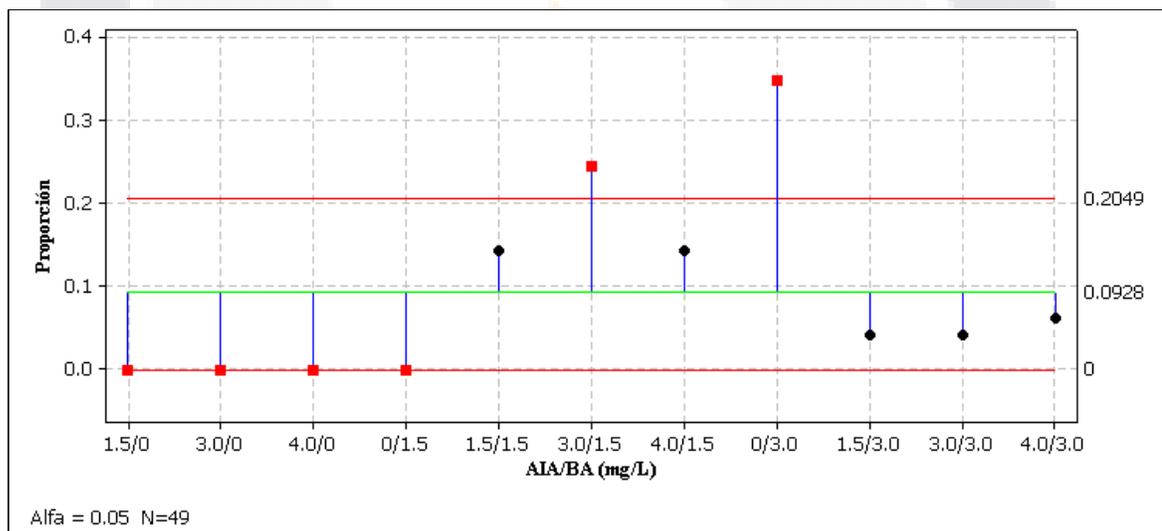
Agave	RCV	RCV µg/L	Explante	EIC %	PCE	Caracterización		
						Tipo callo	Color +/-	Oxidación
<i>A. americana</i> var. <i>comiteco</i>	BA/AIA	1.5/4.0	Hoja	70	+	CF	Blanco / Verde	+
	PIC	4.0	Tallo	100	++	CN	Amarillo	-
	ANA	1.5	Tallo	100	++	CR	Café	+
	BA/2,4-D	3.0/1.5	Tallo	50	+++	CN	Amarillo/Blanco	+
	BA	3.0	Tallo	8	+	CB	Blanco	+
<i>A. horrida</i> var. <i>perotensis</i>	BA/AIA	1.5/4.0	Tallo	100	++	CC	Café / Blanco	+
	PIC	4.0	Raíz	100	+++	CN	Amarillo / Blanco	-
	ANA	1.5	Tallo	100	++	CR	Blanco / Amarillo	-
	2,4-D	1.5	Tallo	95	+++	CN	Blanco/Amarillo	+
	BA	3.0	Tallo	57.5	+	CC	Blanco	++
<i>A. parryi</i> var. <i>huachucensis</i>	BA/AIA	1.5/4.0	Tallo- Hoja-Raíz	100	+++	CR	Café / Blanco	-
	BA/PIC	1.5/1.5	Raíz	100	+++	CN	Amarillo	+
	BA/ANA	3.0/1.5	Tallo	100	+++	CC	Blanco / Verde	-
	BA/2,4-D	3.0/1.5	Tallo/Hoja	100	++	CF/CN	Amarillo/Blanco	+
	BA	1.5	Hoja	87.5	+	CC	Blanco	+
<i>A. salmiana</i> var. <i>xamini</i>	AIA	4.0	Raíz	50	+	CC	Blanco / Amarillo	+
	BA/PIC	1.5/4.0	Tallo	100	+++	CN	Café	-
	ANA	4.0	Raíz	100	+++	CF	Amarillo / Blanco	+
	BA/2,4-D	3.0/1.5	Tallo	70	+++	CC	Café	+++
	BA	3.0	Hoja	35	+	CC	Blanco	+
<i>A. wocomahi</i>	BA/AIA	1.5/1.5	Hoja	70	+	CF	Blanco	-
	PIC	4.0	Tallo	100	+++	CN	Amarillo	+
	ANA	1.5	Tallo- Hoja-Raíz	100	+++	CR	Blanco / Café	-
	2,4-D	4.0	Tallo	100	++	CN	Amarillo/Blanco	+
	BA	3.0	Tallo	32	+	CB	Blanco	-

(EIC) Eficiencia inducción callo; (PCE) presencia de callo por explante; (BA) benciladenina; (AIA) ácido indolacético; (PIC) picloram, ácido 4-amino-3,5,6-tricloro-2-piridincarboxílico; (ANA) ácido naftalenacético; (2,4-D) ácido 2,4-diclorofenoxi acético; (CF) callo friable; (CN) callo nodular; (CR) callo con raíz; (CC) callo compacto (CB) callo con brotes.

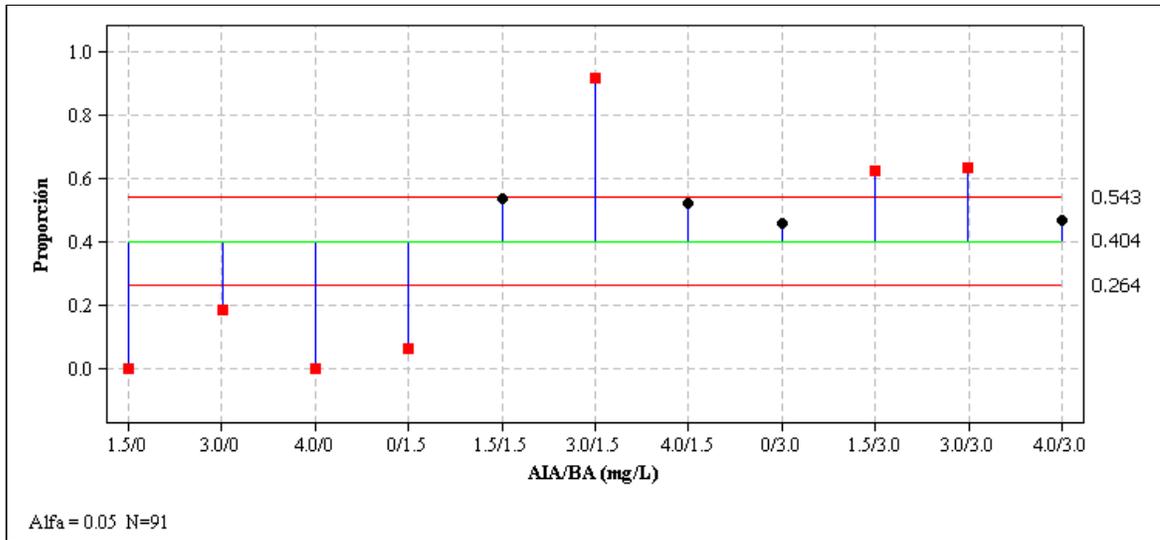
(+++)*Abundante*, (++)*moderado*, (+)*escaso* y (-)*nulo*.

Adicionalmente, con el objetivo de inducir mayor cantidad de tejido calloso de tipo embriogénico para su uso en el desarrollo de embriones somáticos, se implementó una serie de tratamientos con AIA en combinación con BA en explantes de tallo, hoja y raíz de *Agave wocomahi* y *Agave parryi* var. *huachucensis*.

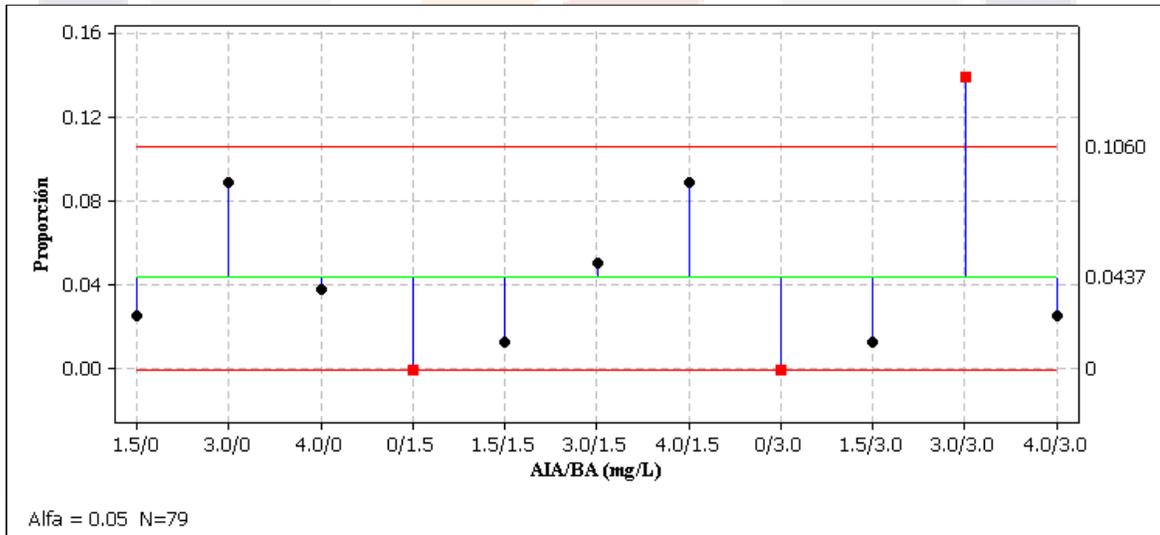
En *Agave wocomahi*, la EIC resultó de manera similar a lo obtenido previamente (Figuras 19, 20 y 21). La proporción general en los tres tipos de explante fue por debajo de 0.41, esto limitó en gran medida la etapa correspondiente al desarrollo de embriones somáticos. La mayor eficiencia de inducción de callo que se obtuvo fue en el tratamiento con 3.0 mg/L de AIA en combinación de 1.5 mg/L de BA en explante de hoja con una proporción por encima de 0.9. La inducción de tejido calloso mediante el uso de la BA sin la combinación de AIA fue escaso en explante de tallo y hoja, incluso nulo en explante de raíz. El análisis de proporciones ANOM arrojó tres tratamientos con una proporción superior significativamente diferente a la proporción general de 0.404, correspondiente a todos los tratamientos en explante de hoja, mientras que en explante de tallo se observaron dos tratamientos y un tratamiento para explante de raíz cuyas proporciones generales fueron de 0.0928 y 0.0437, respectivamente (Figuras 28, 29 y 30).



**Figura 28. Análisis de medias ANOM mediante proporciones en la inducción de tejido calloso de explante de tallo en *Agave wocomahi*, sometidos a diferentes concentraciones de (AIA) ácido indolacético y (BA) benciladenina.** La gráfica muestra la proporción para cada tratamiento; la línea central indica la proporción general de todas las muestras y; las líneas rojas indican los límites de decisión con base a un nivel de significancia de 0.05. La proporción ubicada más allá de un límite de decisión específica que la diferencia entre la proporción del grupo y la población general es estadísticamente significativa.

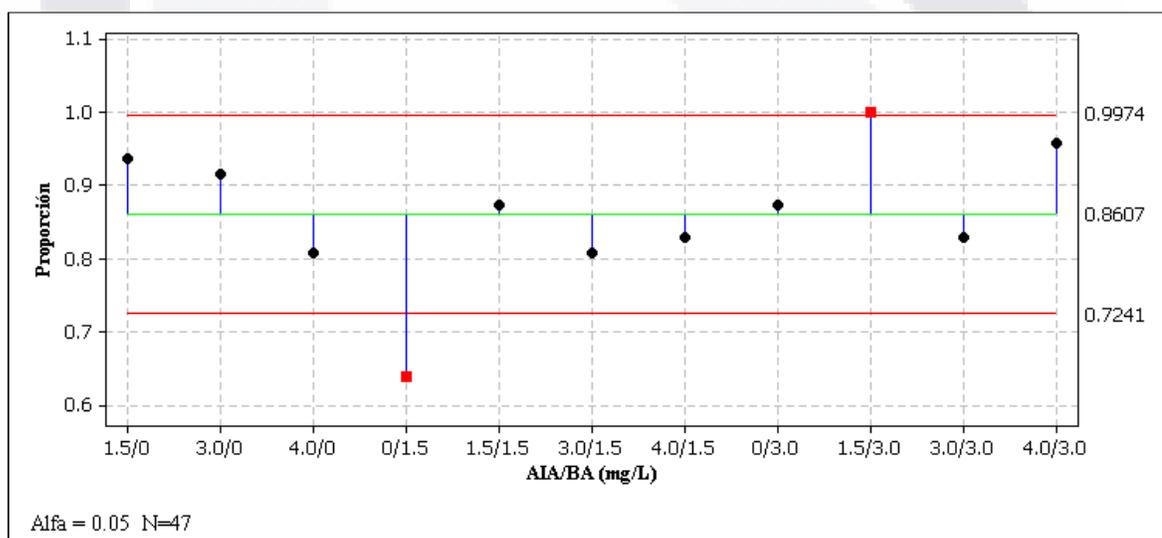


**Figura 29. Análisis de medias ANOM mediante proporciones en la inducción generación de tejido calloso de explante de hoja en *Agave wocomahi*, sometidos a diferentes concentraciones de (AIA) ácido indolacético y (BA) benciladenina.** La gráfica muestra la proporción para cada tratamiento; la línea central indica la proporción general de todas las muestras y; las líneas rojas indican los límites de decisión con base a un nivel de significancia de 0.05. La proporción ubicada más allá de un límite de decisión especifica que la diferencia entre la proporción del grupo y la población general es estadísticamente significativa.

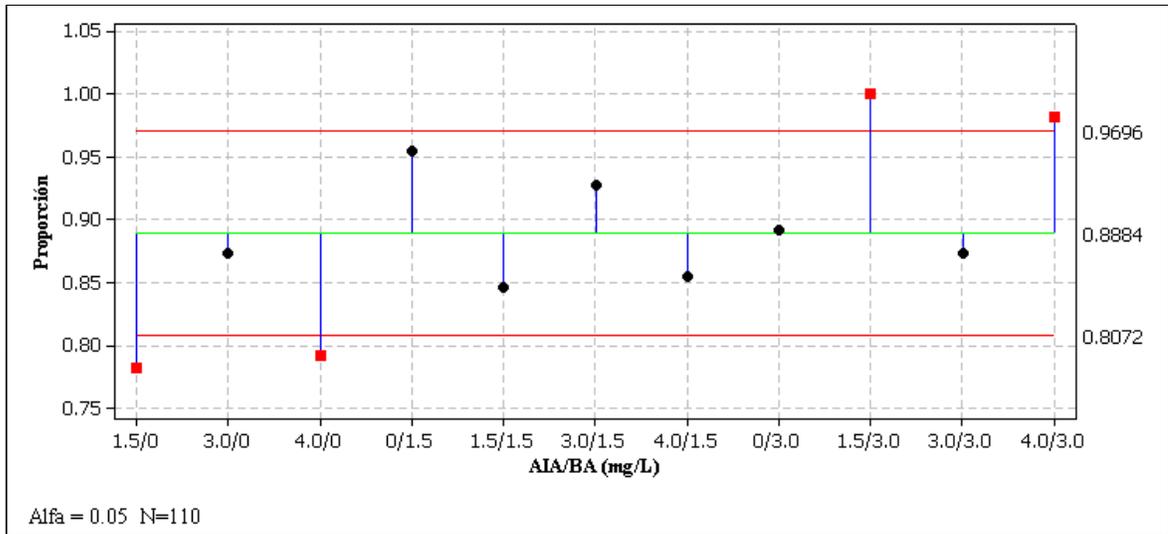


**Figura 30. Análisis de medias ANOM mediante proporciones en la inducción de tejido calloso de explante de raíz en *Agave wocomahi*, sometidos a diferentes concentraciones de (AIA) ácido indolacético y (BA) benciladenina.** La gráfica muestra la proporción para cada tratamiento; la línea central indica la proporción general de todas las muestras y; las líneas rojas indican los límites de decisión con base a un nivel de significancia de 0.05. La proporción ubicada más allá de un límite de decisión especifica que la diferencia entre la proporción del grupo y la población general es estadísticamente significativa.

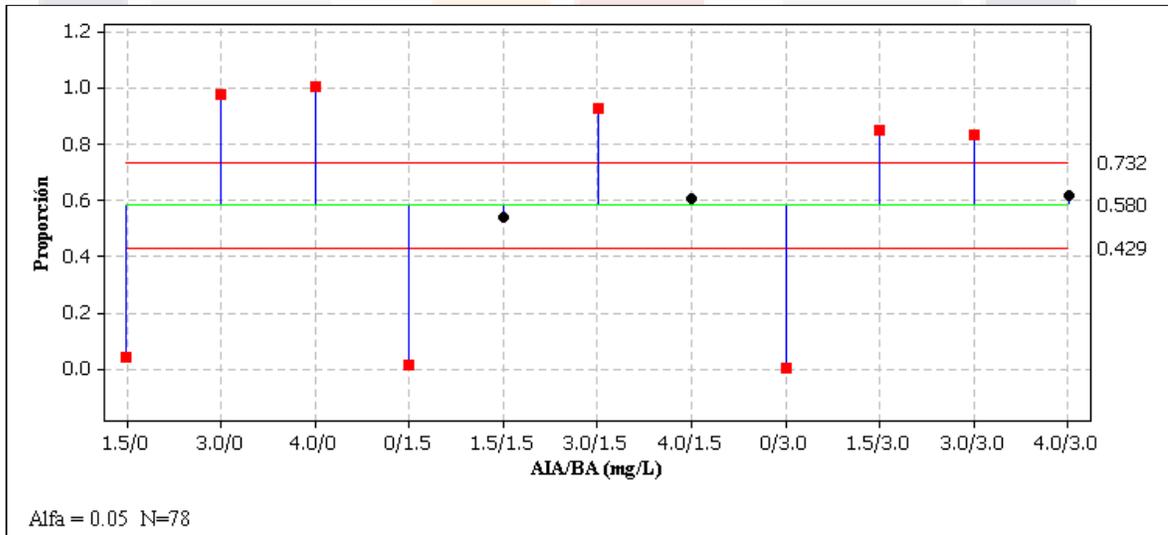
Para *Agave parryi* var. *huachucensis*, los tratamientos sometidos al efecto del AIA solos y en combinación con BA arrojaron una alta eficiencia de inducción de callo. Con respecto a los tratamientos con solo el uso de BA, se encontró un efecto prácticamente nulo en la eficiencia de inducción de callo en explante de raíz; no obstante, se obtuvo la inducción de tejido calloso en explante de tallo y hoja. De acuerdo con el análisis de proporciones ANOM el explante de hoja mostró la mayor eficiencia de inducción de callo con dos tratamientos con una proporción superior significativamente diferentes a la proporción general de 0.8884 correspondiente a todos los tratamientos en explante de hoja; mientras que en explante de tallo resultó una tratamiento y cinco tratamientos para explante de raíz cuyas proporciones generales fueron de 0.8607 y 0.580, respectivamente (Figuras 31, 32 y 33).



**Figura 31. Análisis de medias ANOM mediante proporciones en generación de tejido calloso de explante de tallo en *Agave parryi* var. *huachucensis*, sometidos a diferentes concentraciones de (AIA) ácido indolacético y (BA) benciladenina.** La gráfica muestra la proporción para cada tratamiento; la línea central indica la proporción general de todas las muestras y; las líneas rojas indican los límites de decisión con base a un nivel de significancia de 0.05. La proporción ubicada más allá de un límite de decisión específica que la diferencia entre la proporción del grupo y la población general es estadísticamente significativa.



**Figura 32. Análisis de medias ANOM mediante proporciones en generación de tejido calloso de explantes de hoja en *Agave parryi* var. *huachucensis*, sometidos a diferentes concentraciones de (AIA) ácido indolacético y (BA) benciladenina.** La gráfica muestra la proporción para cada tratamiento; la línea central indica la proporción general de todas las muestras y; las líneas rojas indican los límites de decisión con base a un nivel de significancia de 0.05. La proporción ubicada más allá de un límite de decisión específica que la diferencia entre la proporción del grupo y la población general es estadísticamente significativa.



**Figura 33. Análisis de medias ANOM mediante proporciones en la inducción de tejido calloso de explantes de raíz en *Agave parryi* var. *huachucensis*, sometidos a diferentes concentraciones de (AIA) ácido indolacético y (BA) benciladenina.** La gráfica muestra la proporción para cada tratamiento; la línea central indica la proporción general de todas las muestras y; las líneas rojas indican los límites de decisión con base a un nivel de significancia de 0.05. La proporción ubicada más allá de un límite de decisión específica que la diferencia entre la proporción del grupo y la población general es estadísticamente significativa.

## Desarrollo de embriones somáticos

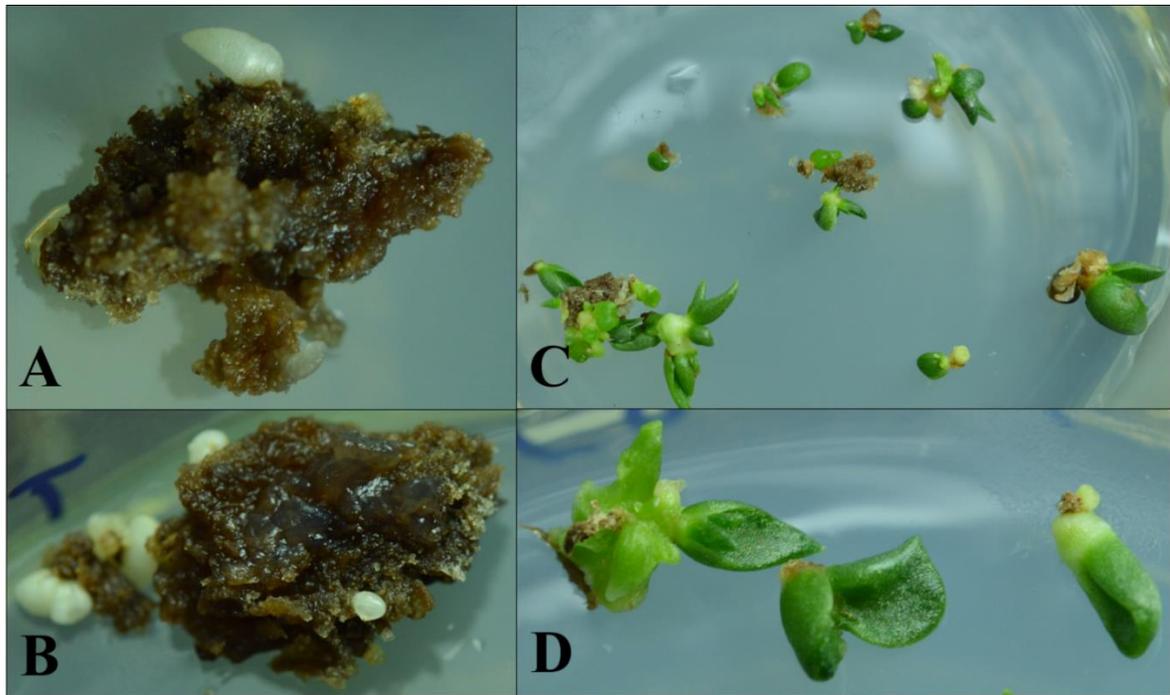
En general, la aparición de embriones somáticos se presentó de manera asincrónica, con una apariencia y cantidad de embriones somáticos variada, en respuesta a los diferentes reguladores de crecimiento vegetal, de la especie de agave, así como del explante utilizado. El registro de los embriones somáticos fue posterior al periodo de inducción de tejido calloso, durante un periodo de tres a 10 meses, dentro del mismo tratamiento de inducción de tejido calloso y en subcultivos de mantenimiento de tejido calloso. Se registró un total de 748 presuntos embriones somáticos en todas las especies de agave y la mayor parte fue resultado de la exposición al AIA en combinación con BA (Cuadro 10).

**Cuadro 10. Embriones somáticos obtenidos mediante el uso de diferentes reguladores de crecimiento vegetal (RCV) en cinco especies de agaves durante la etapa de inducción de tejido calloso.**

Agave	RCV							TOTAL
	BA	AIA	BA/AIA	ANA	BA/ANA	2,4-D	BA/2,4-D	
<i>A. americana</i> var. <i>comiteco</i>	-	-	19	-	1	-	-	20
<i>A. horrida</i> var. <i>perotensis</i>	18	11	176	6	56	-	-	267
<i>A. parryi</i> var. <i>huachucensis</i>	80	-	54	1	-	1	-	136
<i>A. salmiana</i> var. <i>xamini</i>	-	-	12	-	10	-	3	25
<i>A. wocomahi</i>	35	-	273	-	-	2	-	310
<b>TOTAL</b>	<b>133</b>	<b>11</b>	<b>524</b>	<b>7</b>	<b>67</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>748</b>

(BA) Benciladenina; (AIA) Ácido indolacético; (ANA) Ácido naftalenacético y (2,4-D) ácido 2,4-diclorofenoxiacético.

En *Agave americana* var. *comiteco* se obtuvo un total de 20 embriones somáticos, de los cuales 19 se generaron mediante el uso del AIA en combinación con BA, cuya apariencia fue vigorosa con una coloración inicialmente blanca y posteriormente verde una vez trasferido a condiciones de iluminación. En su mayoría los embriones somáticos presentaron un desarrollo apical normal y un tardío desarrollo radical (Figura 34).



**Figura 34. Desarrollo de embriones somáticos de *Agave americana* var. *comiteco* obtenidos mediante el uso de 4.0 mg/L ácido indolacético en combinación con 3.0 mg/L de benciladenina en explante de tallo. Aparición de embriones somáticos (A y B) y desarrollo de embriones somáticos (C y D).**

En *Agave salmiana* var. *xamini* se obtuvo un total de 25 embriones somáticos, de los cuales 12 se generaron mediante el uso del AIA en combinación con BA y 10 mediante el uso del ANA en combinación con BA. Estos últimos fueron visualizados con ayuda de un esteroscopio y un microscopio electrónico de barrido, donde las imágenes evidencian un desarrollo apical y radical en los embriones. Cabe señalar que las estructuras se desarrollaron envueltas en tejido calloso, lo cual inicialmente complicó la visualización de las estructuras (Figuras 35 y 36).

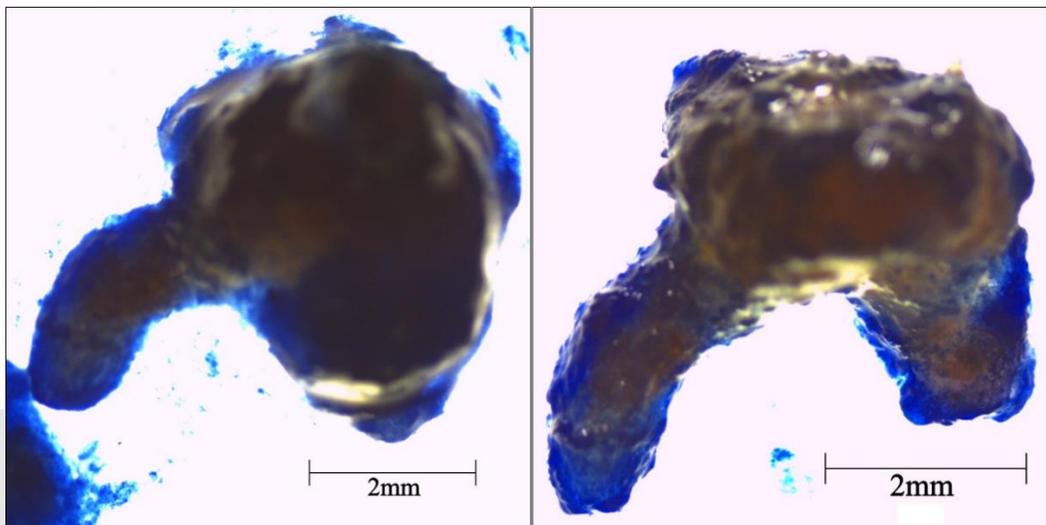


Figura 35. Embriones somáticos de *Agave salmiana* var. *xamini* obtenidos mediante el uso de 4.0 mg/L de ácido naftalenacético en combinación con 1.5 mg/L de benciladenina en explante de tallo y visualizados en un estereoscopio óptico.

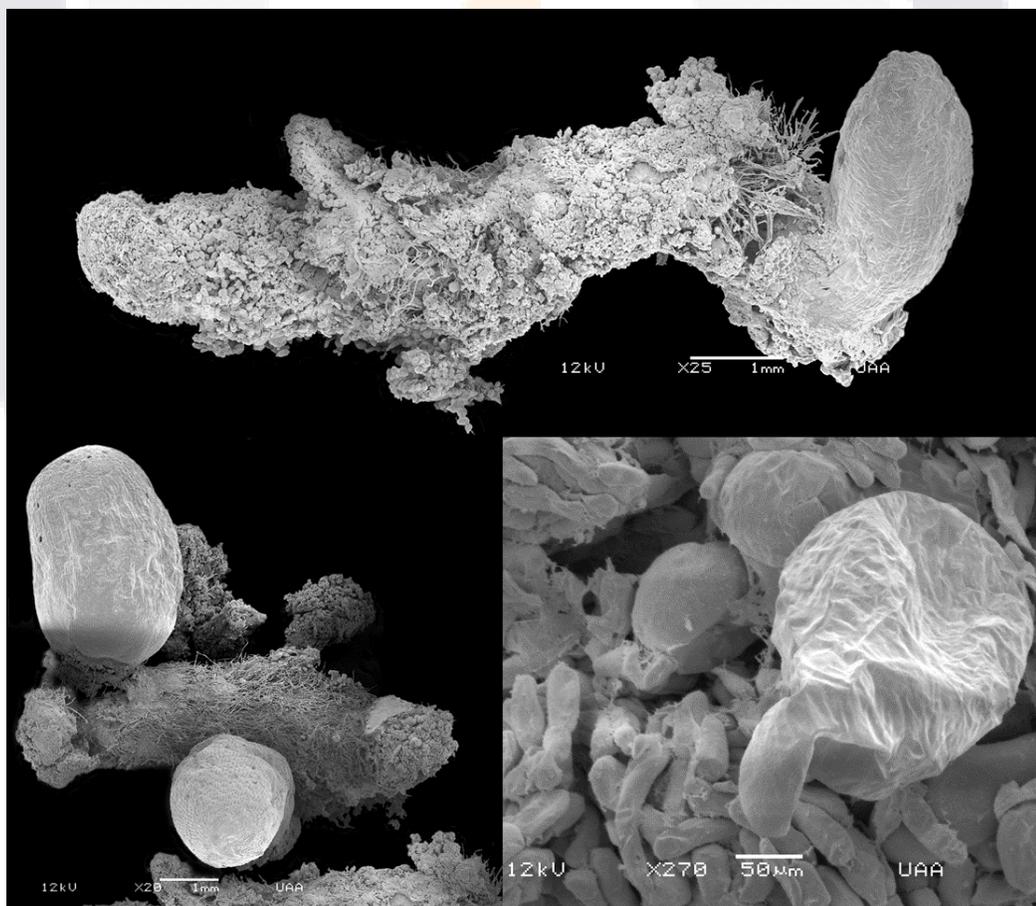
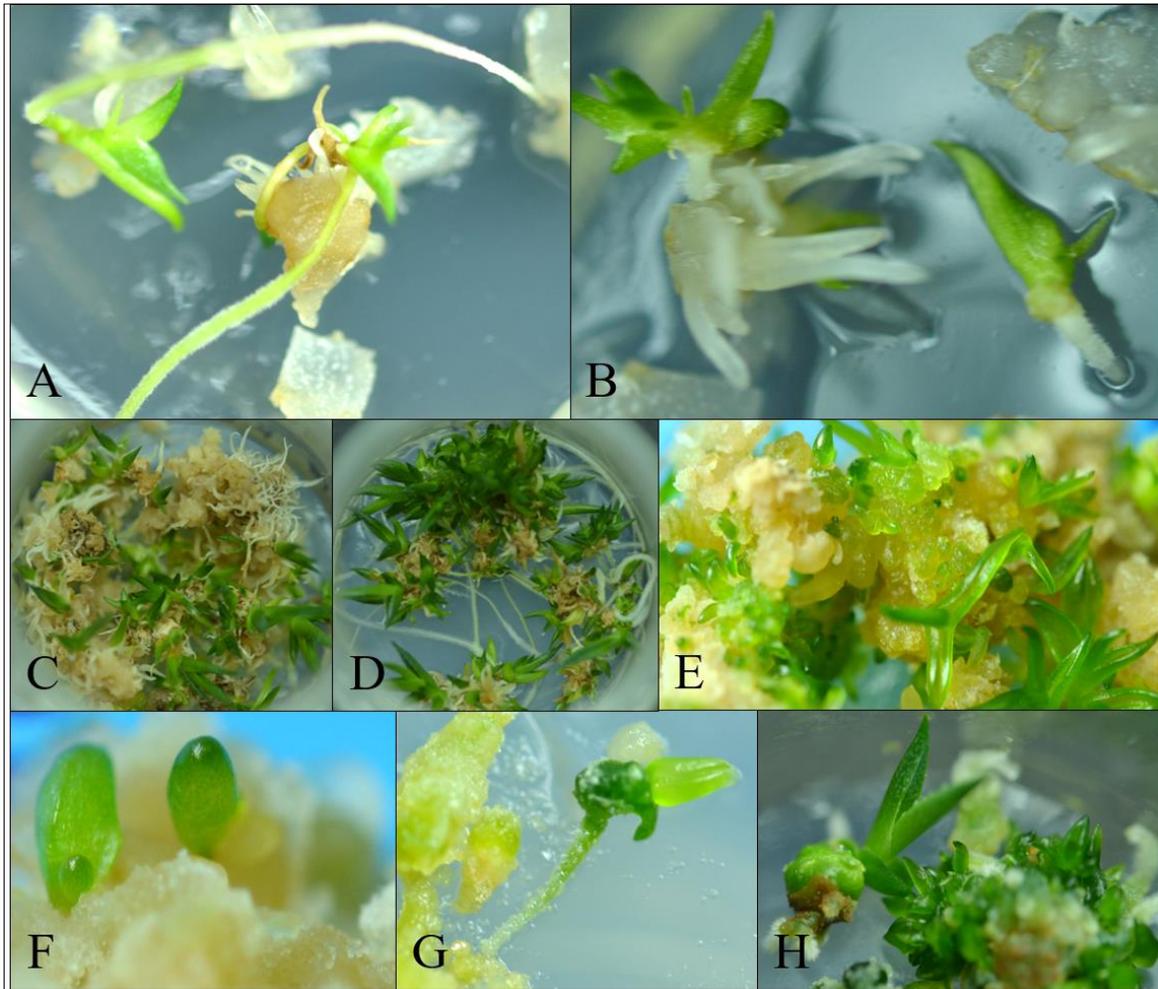


Figura 36. Embriones somáticos de *Agave salmiana* var. *xamini* obtenidos mediante el uso de 4.0 mg/L de ácido naftalenacético en combinación con 1.5 mg/L de benciladenina en explante de tallo y visualizados en un microscopio electrónico de barrido.

En *Agave horrida* var. *perotensis* se obtuvo un total de 267 embriones somáticos, de los cuales 176 se generaron mediante el uso del AIA en combinación con BA cuya apariencia fue vigorosa con una coloración inicial verde. En su mayoría los embriones somáticos presentaron un desarrollo apical y de raíz normal (Figura 37).



**Figura 37. Desarrollo de embriones somáticos de *Agave horrida* var. *perotensis*.** Desarrollo de embriones somáticos mediante el uso de 4.0 mg/L de (AIA) ácido indolacético en combinación con 1.5 mg/L de (BA) benciladenina en explante de tallo (A y B); desarrollo de embriones somáticos mediante el uso de 1.5 mg/L de AIA en combinación con 3.0 mg/L de BA en explante de tallo (C y D); desarrollo de embriones somáticos mediante el uso de 4.0 mg/L de AIA en combinación con 3.0 mg/L de BA en explante de tallo (E y F); desarrollo de un embrión somático mediante el uso de 1.5 mg/L de (ANA) ácido naftalenacético (G) y desarrollo de embriones somáticos mediante el uso de 1.5 mg/L de ANA en combinación con 1.5 mg/L de BA en explante de tallo (H).

En *Agave parryi* var. *huachucensis* se obtuvo un total de 136 embriones somáticos derivados de la etapa de inducción de tejido calloso mediante el uso de BA principalmente, este número fue incrementado a 498 una vez que se evaluó el medio de cultivo para el desarrollo de embriones somáticos, del cual resultó favorable el uso de medio MS sin reguladores de crecimiento vegetal con 391 embriones somáticos (Cuadro 11). Las observaciones con ayuda de estereoscopio y microscopio electrónico de barrido confirmaron la generación asincrónica y con diferente apariencia, de embriones somáticos en varios tratamientos para la inducción de tejido calloso. El efecto del 2,4-D resultó en la generación de embriones somáticos en concentraciones de 1.5 mg/L en combinación con 1.5 mg/L de BA en explante de hoja y con 4.0 mg/L en combinación con 3.0 mg/L de BA en explante de tallo, estos últimos se observaron en una etapa globular y con una notable formación del polo radical y apical (Figuras 38 y 39).

Con el uso de PIC a 4.0 mg/L en combinación con 3.0 mg/L de BA en explante de hoja, se observaron embriones somáticos con un crecimiento apical y radical equitativo, no obstante, también se presentaron embriones somáticos con diferentes aspectos en su morfología del ápice y raíz (Figuras 40 y 41). El efecto de 1.5 mg/L de ANA en combinación con 3.0 mg/L de BA en explante de tallo resultó en la generación de embriones somáticos, en los cuales se pudo constatar una conexión vascular entre la raíz y el ápice (Figura 42), así como un desarrollo normal una vez retirado los regulador de crecimiento vegetal del medio de cultivo. Con el uso de 4.0 mg/L de ANA también se logró obtener embriones somáticos, los cuales presentaron diversidad de formas en su estructura apical (Figura 44) así como un mayor desarrollo radical (Figura 45). Cabe señalar que las estructuras se desarrollaron envueltas en tejido calloso, lo cual inicialmente complicó la visualización de las estructuras (Figuras 42 y 43).

Contrariamente, embriones somáticos obtenidos mediante el uso de 1.5 mg/L de AIA en combinación con 3.0 mg/L de BA a partir de explante de tallo y hoja presentaron un reducido sistema radical, al inicio de su desarrollo. El tratamiento con 1.5 mg/L de BA generó tejido calloso embriogénico, el cual una vez colocado en medio de cultivo sin reguladores de crecimiento vegetal, registró 159 embriones somáticos la mayor cantidad registrada para esta especie (Figura 46).

**Cuadro 11. Desarrollo de embriones somáticos en medio de cultivo sin reguladores de crecimiento vegetal (RCV) a partir de tejido caloso embriogénico obtenido de distintos tratamientos con RCV y procedente de dos tipos de explantes de *Agave parryi* var. *huachucensis*.**

Tratamiento (mg/L)					TC-Tallo		TC-Hoja		Embriones somáticos
2,4-D	PIC	AIA	ANA	BA	MS	MS+CA	MS	MS+CA	
—	—	—	—	1.5	139	19	0	1	<b>159</b>
—	—	—	—	3.0	72	14	0	7	<b>93</b>
1.5	—	—	—	—	0	0	0	0	<b>0</b>
1.5	—	—	—	1.5	0	0	0	0	<b>0</b>
1.5	—	—	—	3.0	8	1	17	0	<b>26</b>
4.0	—	—	—	—	0	0	0	0	<b>0</b>
4.0	—	—	—	1.5	0	0	0	0	<b>0</b>
4.0	—	—	—	3.0	0	0	0	0	<b>0</b>
—	1.5	—	—	—	0	0	0	0	<b>0</b>
—	1.5	—	—	1.5	0	1	0	0	<b>1</b>
—	1.5	—	—	3.0	0	0	0	0	<b>0</b>
—	4.0	—	—	—	0	0	0	0	<b>0</b>
—	4.0	—	—	1.5	0	0	0	0	<b>0</b>
—	4.0	—	—	3.0	0	0	0	0	<b>0</b>
—	—	1.5	—	—	11	3	0	0	<b>14</b>
—	—	1.5	—	1.5	3	0	0	0	<b>3</b>
—	—	1.5	—	3.0	66	1	11	0	<b>78</b>
—	—	4.0	—	—	37	0	0	0	<b>37</b>
—	—	4.0	—	1.5	4	1	0	0	<b>5</b>
—	—	4.0	—	3.0	2	0	2	0	<b>4</b>
—	—	—	1.5	—	1	0	0	0	<b>1</b>
—	—	—	1.5	1.5	3	0	1	0	<b>4</b>
—	—	—	1.5	3.0	45	24	0	0	<b>69</b>
—	—	—	4.0	—	0	4	0	0	<b>4</b>
—	—	—	4.0	1.5	0	0	0	0	<b>0</b>
—	—	—	4.0	3.0	0	0	0	0	<b>0</b>
Embriones somáticos					391	68	31	8	<b>498</b>
<b>Embriones somáticos (Media)</b>					<b>15.04<sup>A</sup></b>	<b>2.62<sup>B</sup></b>	<b>1.192<sup>B</sup></b>	<b>0.308<sup>B</sup></b>	

N=26. Media de embriones somáticos que no comparte una misma letra es significativamente diferente de acuerdo con la comparación de medias mediante el método de Tukey  $\alpha = 0.05$  (TC) Tejido caloso; (BA) benciladenina; (PIC) picloram, ácido 4-amino-3,5,6-tricloro-2-piridincarboxílico; (AIA) ácido indolacético; (ANA) ácido naftalenacético; (2,4-D) ácido 2,4-diclorofenoxiacético; (MS) medio de cultivo "Murashige y Skoog"; (MS+CA) medio de cultivo MS adicionado con carbón activado.

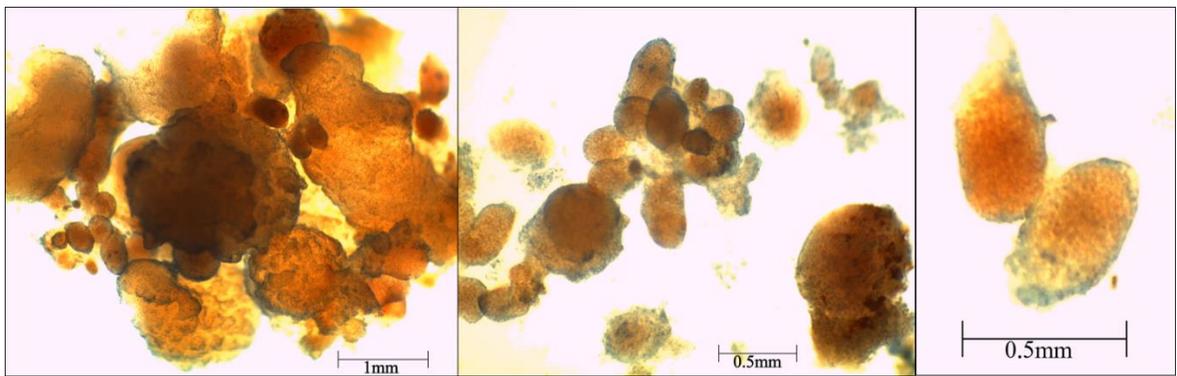


Figura 38. Embriones somáticos en etapa globular de *Agave parryi* var. *huachucensis* inducidos mediante el uso de 4.0 mg/L ácido 2,4-diclorofenoxiacético en combinación con 3.0 mg/L de benciladenina en explante de tallo y visualizado en un estereoscopio óptico.

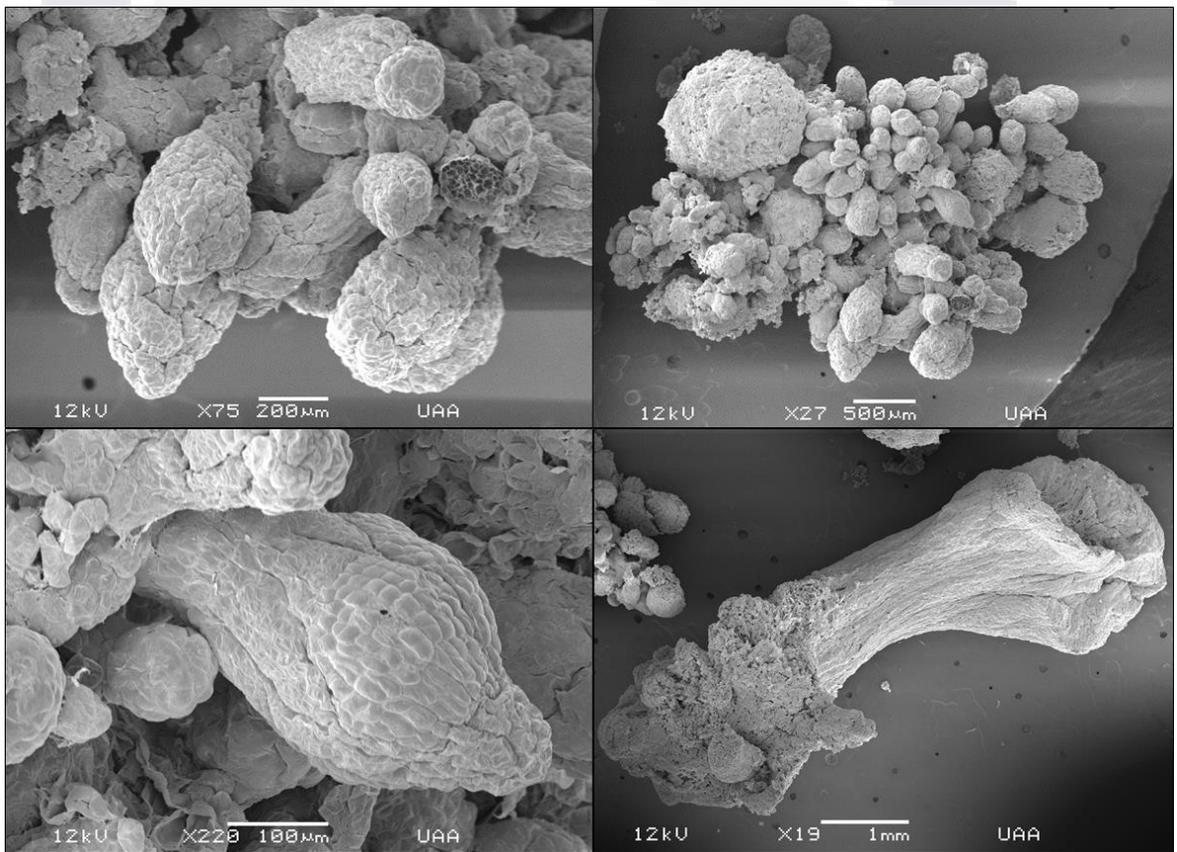


Figura 39. Embriones somáticos de *Agave parryi* var. *huachucensis* inducidos mediante el uso de 4.0 mg/L de ácido 2,4-diclorofenoxiacético en combinación con 3.0 mg/L de benciladenina en explante de tallo y visualizados en un microscopio electrónico de barrido.

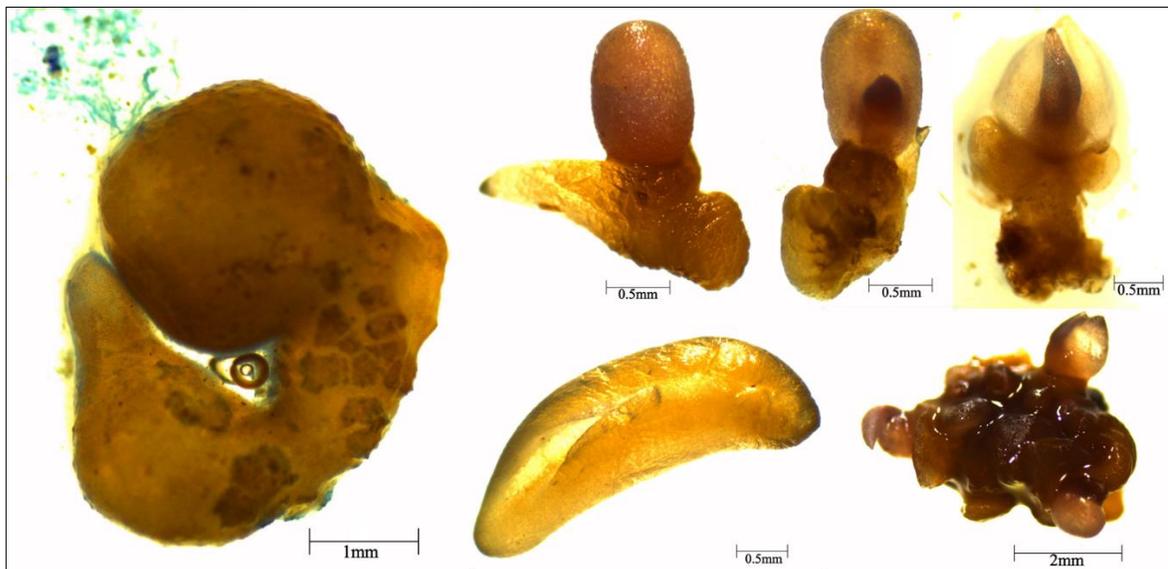
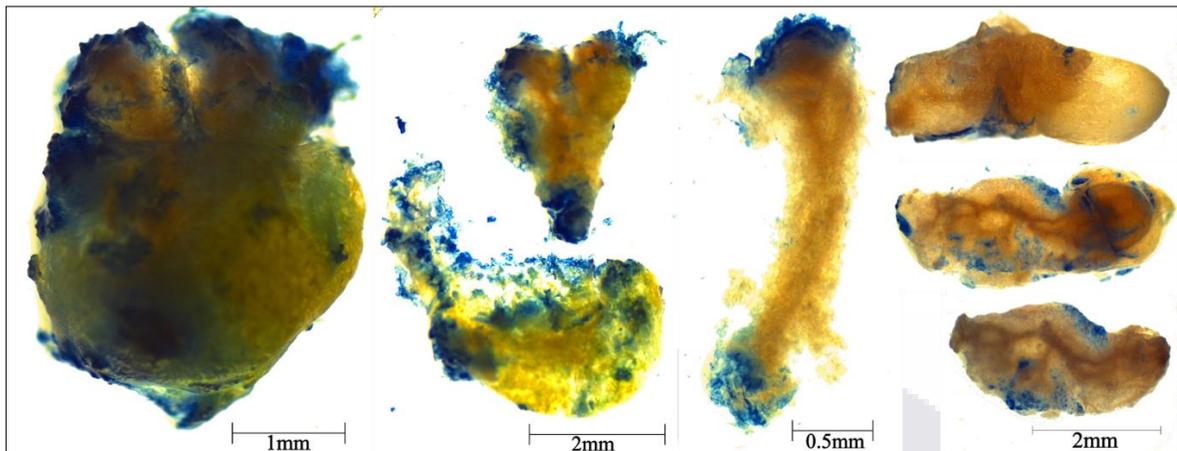


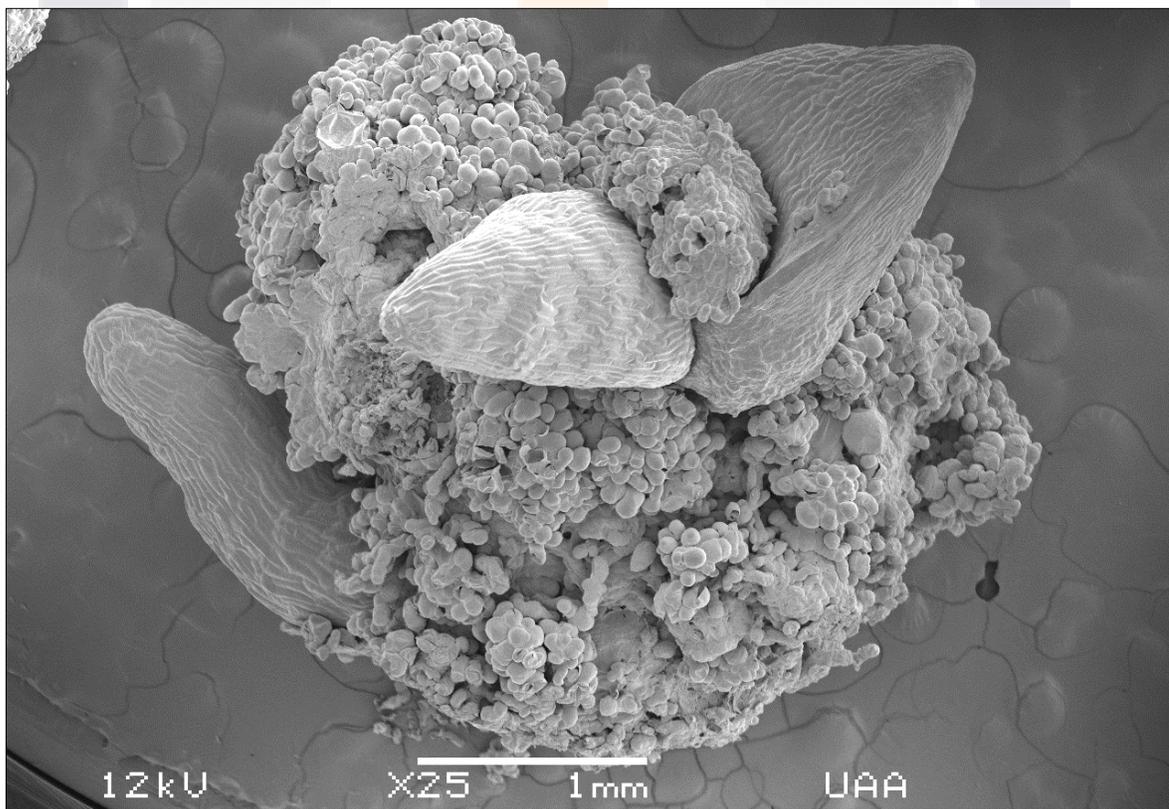
Figura 40. Embriones somáticos de *Agave parryi* var. *huachucensis* obtenidos mediante el uso de 4.0 mg/L ácido 4-amino tricloro piricarboxílico en combinación con 3.0 mg/L de benciladenina en explante de hoja y visualizado en un estereoscopio óptico.



Figura 41. Embriones somáticos de *Agave parryi* var. *huachucensis* obtenidos mediante el uso de 4.0 mg/L de ácido 4-amino tricloro piricarboxílico en combinación con 3.0 mg/L de benciladenina de explante de hoja y visualizados en un microscopio electrónico de barrido.



**Figura 42.** Embriones somáticos de *Agave parryi* var. *huachucensis* inducidos mediante el uso de 1.5 mg/L de ácido naftalenacético en combinación con 3.0 mg/L de benciladenina en explante de tallo y visualizado en un estereoscopio óptico.



**Figura 43.** Embrión somático de *Agave parryi* var. *huachucensis* inducido mediante el uso de 1.5 mg/L de ácido naftalenacético en combinación con 3.0 mg/L de benciladenina en explante de tallo y visualizado en un microscopio electrónico de barrido.

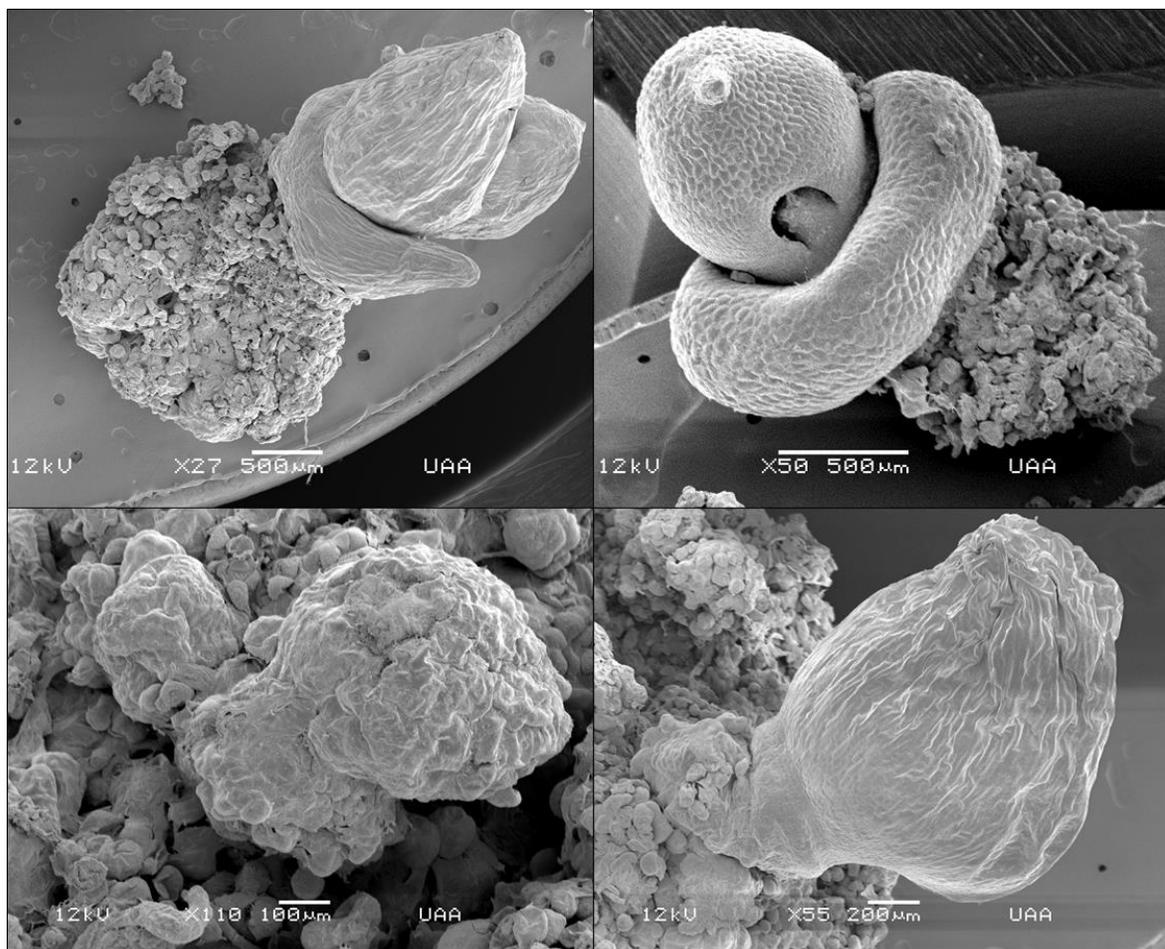


Figura 44. Embriones somáticos de *Agave parryi* var. *huachucensis* inducidos mediante el uso de 4.0 mg/L de ácido naftalenacético en explante de tallo y visualizados en un microscopio electrónico de barrido.

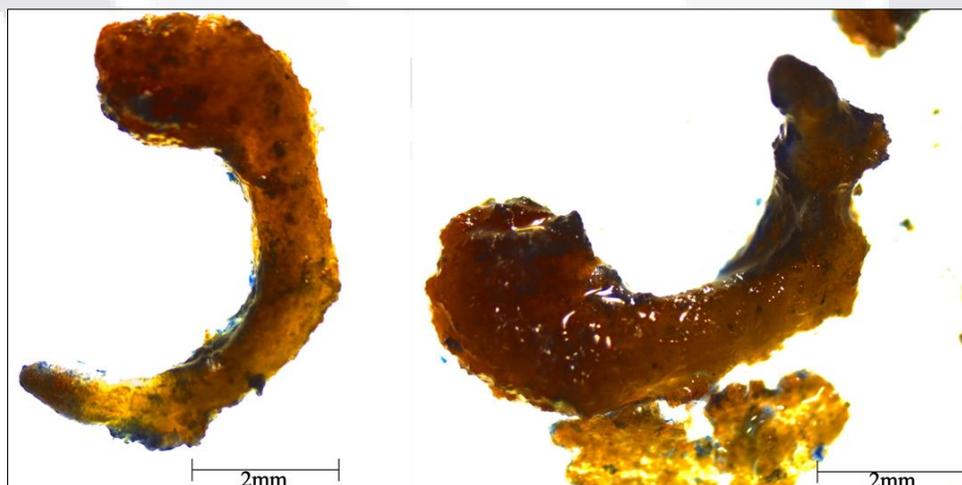
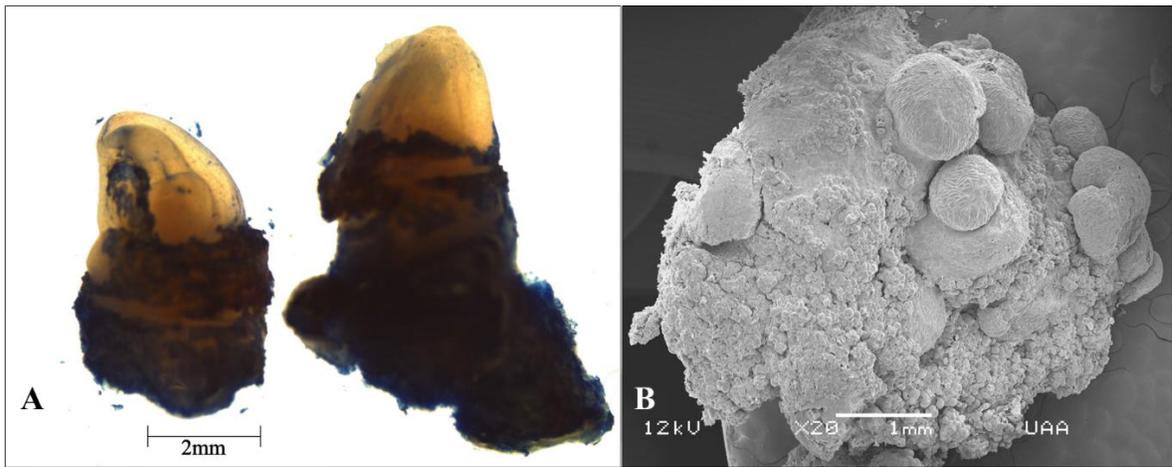


Figura 45. Embriones somáticos de *Agave parryi* var. *huachucensis* inducidos mediante el uso de 4.0 mg/L de ácido naftalenacético en explante de tallo y visualizado en un estereoscopio.



**Figura 46. Embriones somáticos de *Agave parryi* var. *huachucensis* inducidos mediante el uso de 1.5 mg/L de benciladenina en explante de tallo. Visualización en un estereoscopio óptico (A) y en un microscopio electrónico de barrido (B).**

En *Agave wocomahi* se obtuvo un total de 310 embriones somáticos derivados de la etapa de inducción de tejido calloso mediante el uso de AIA en combinación de BA principalmente (Figura 47-B y C). Una vez que se evaluó el medio de cultivo para el desarrollo de embriones somáticos, se obtuvieron 360 embriones somáticos, los cuales no mostraron una diferencia significativa entre los medios evaluados, no obstante, se observa una clara diferencia entre el tipo de explante inicial (Cuadro 12). Observaciones con ayuda de estereoscopio y microscopio electrónico de barrido confirmaron la generación asincrónica y con diferente apariencia de embriones somáticos en varios tratamientos para la inducción de tejido calloso. El efecto del 2,4-D resultó en la generación de embriones somáticos en concentraciones de 1.5 mg/L en combinación con 1.5 mg/L de BA en explante de tallo (Figura 47-A) y con 4.0 mg/L en combinación con 1.5 mg/L de BA en explante de hoja, estos últimos se observaron en una etapa globular y con una notable formación del polo radical y apical (Figuras 48 y 49); el desarrollo embriogénico fue favorecido en explante de tallo con la eliminación del 2,4-D y la adición de carbón activado al medio de cultivo. El efecto de 1.5 mg/L del AIA en combinación con 1.5 (Figura 47-B y 51-A) y 3.0 mg/L de BA generó la mayor generación de embriones somáticos en esta especie en explante de tallo y hoja (Figura 47-C, 50 y 51 B-D), seguido del tratamiento con 3.0 mg/L de BA en explante de tallo, el cual fue favorecido con medio MS sin reguladores de crecimiento vegetal (Figura 47-D y 51-E).

**Cuadro 12. Desarrollo de embriones somáticos en medio de cultivo sin reguladores de crecimiento vegetal (RCV) a partir de tejido caloso embriogénico obtenido de distintos tratamientos con RCV y procedente de dos tipos de explantes de *Agave wocomahi*.**

Tratamiento (mg/L)					TC-Tallo		TC-Hoja		Embriones somáticos
2,4-D	PIC	AIA	ANA	BA	MS	MS+CA	MS	MS+CA	
—	—	—	—	1.5	0	-	-	-	0
—	—	—	—	3	50	0	-	-	50
1.5	—	—	—	—	-	-	0	0	0
1.5	—	—	—	1.5	-	6	0	0	6
1.5	—	—	—	3	-	-	0	0	0
4	—	—	—	—	0	-	0	0	0
4	—	—	—	1.5	0	0	0	8	8
4	—	—	—	3	-	-	0	0	0
—	1.5	—	—	—	0	0	0	0	0
—	1.5	—	—	1.5	0	0	0	0	0
—	1.5	—	—	3	0	0	0	0	0
—	4	—	—	—	0	0	0	0	0
—	4	—	—	1.5	0	0	0	0	0
—	4	—	—	3	0	0	0	0	0
—	—	1.5	—	—	-	-	-	0	0
—	—	1.5	—	1.5	83	80	4	0	167
—	—	1.5	—	3	24	82	-	20	126
—	—	4	—	—	-	-	-	-	0
—	—	4	—	1.5	-	-	0	0	0
—	—	4	—	3	-	-	3	0	3
—	—	—	1.5	—	0	0	-	-	0
—	—	—	1.5	1.5	0	0	-	0	0
—	—	—	1.5	3	0	0	-	0	0
—	—	—	4	—	-	0	0	0	0
—	—	—	4	1.5	-	0	0	0	0
—	—	—	4	3	-	0	-	-	0
<b>Embriones somáticos</b>					<b>157</b>	<b>168</b>	<b>7</b>	<b>28</b>	<b>360</b>
<b>Embriones somáticos (Media)</b>					<b>6.04<sup>A</sup></b>	<b>6.46<sup>A</sup></b>	<b>0.261<sup>A</sup></b>	<b>1.077<sup>A</sup></b>	

N=26. Media de embriones somáticos que no comparten una misma letra es significativamente diferente de acuerdo con la comparación de medias mediante el método de Tukey.  $\alpha = 0.05$

(TC) Tejido caloso; (BA) benciladenina; (PIC) picloram, ácido 4-amino-3,5,6-tricloro-2-piridincarboxílico; (AIA) ácido indolacético; (ANA) ácido naftalenacético; (2,4-D) ácido 2,4-diclorofenoxiacético; (MS) medio de cultivo "Murashige y Skoog"; (MS+CA) medio de cultivo MS adicionado con carbón activado.



**Figura 47. Embriogénesis somática en *Agave wocomahi*, a partir de explante de tallo.** Tratamiento con 1.5 mg/L de ácido 2,4-diclorofenoxiacético en combinación con 1.5 mg/L de (BA) benciladenina (**A**); tratamiento con 1.5 mg/L de (AIA) ácido indolacético en combinación con 1.5 mg/L de BA (**B**); tratamiento con 1.5 mg/L de AIA en combinación con 3.0 mg/L de BA (**C**); tratamiento con 3.0 mg/L de BA (**D**).

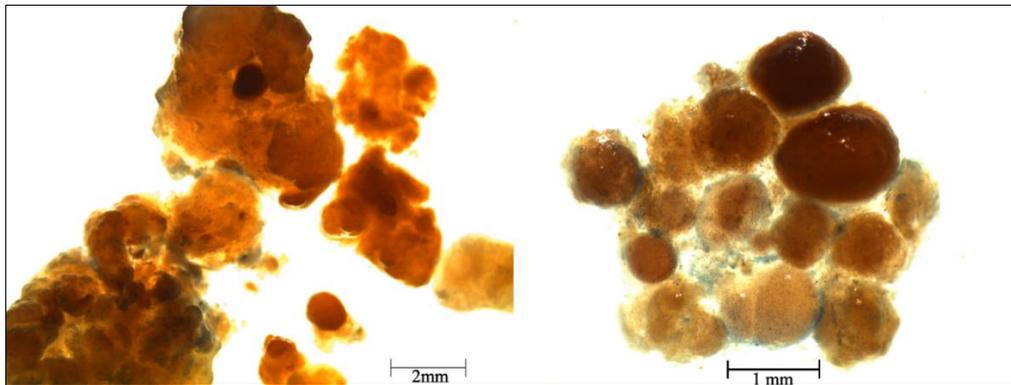


Figura 48. Embriones somáticos de *Agave wocomahi* obtenidos mediante el uso de 4.0 mg/L de 2,4-D en combinación con 1.5 mg/L de benciladenina en explante de hoja y visualizados en un estereoscopio óptico.

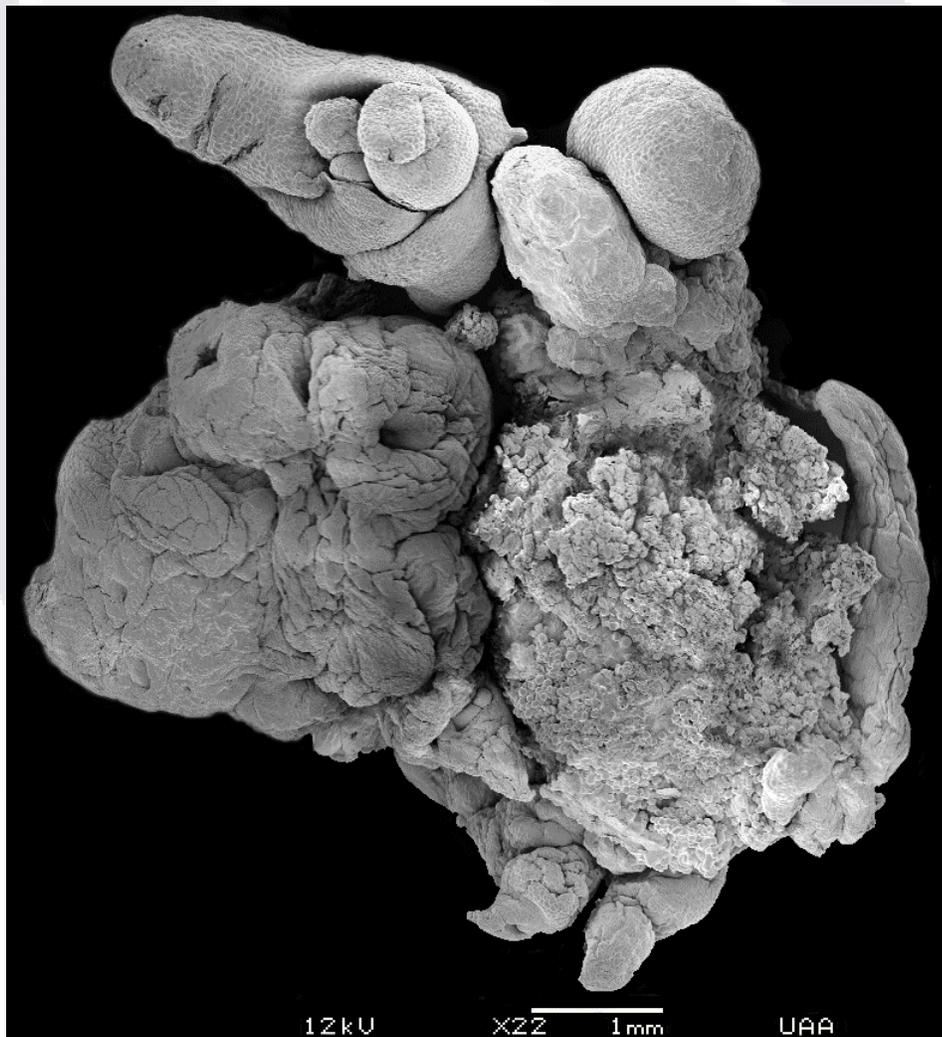
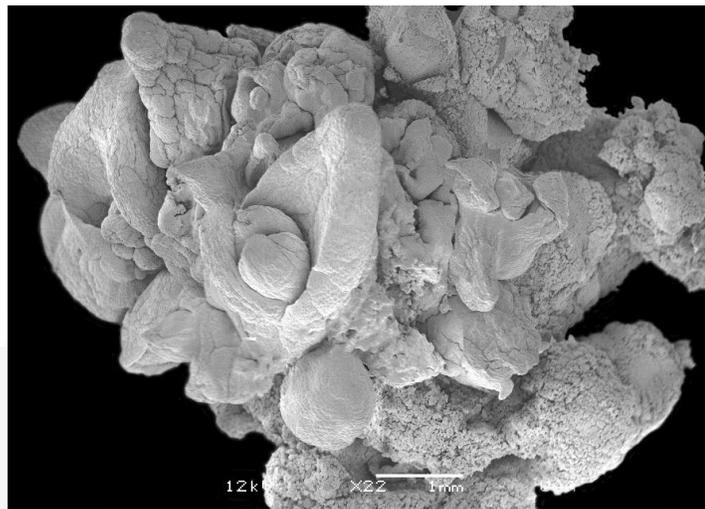
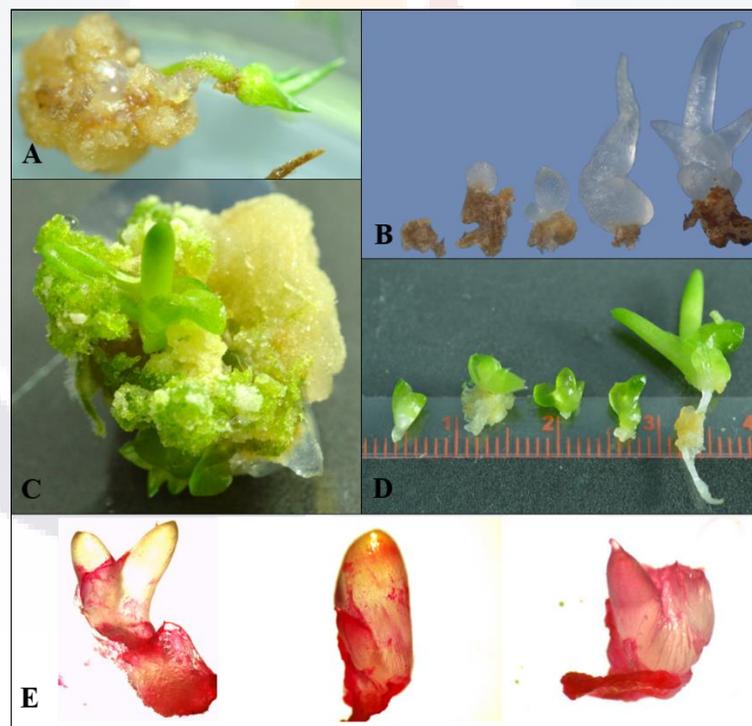


Figura 49. Embriones somáticos de *Agave wocomahi* obtenidos mediante el uso de 4.0 mg/L de ácido 2,4-diclorofenoxiacético en combinación con 1.5 mg/L de benciladenina en explante de hoja y visualizados en un microscopio electrónico de barrido.



**Figura 50.** Embriones somáticos de *Agave wocomahi* obtenidos mediante el uso de 1.5 mg/L de ácido indolacético en combinación con 3.0 mg/L de benciladenina en explante de hoja y visualizados en un microscopio electrónico de barrido.



**Figura 51.** Embriones somáticos a partir de explantes de *Agave wocomahi*. Embriogénesis somática indirecta inducida con 1.5 mg/L de (AIA) ácido indolacético en combinación con 1.5 mg/L de (BA) benciladenina en explante de hoja (A); etapas de la embriogénesis somática (de izquierda a derecha), callo embriogénico, embrión globular, embrión coleoptilar, embrión escutelar y embrión maduro (B); embriogénesis somática indirecta inducida con 1.5 mg/L de AIA en combinación con 3.0 mg/L de BA en explante de tallo (C y D); y embriones somáticos obtenido a partir de tejido calloso inducido con 3.0 mg/L de BA en explante de tallo (E).

**Adaptación de embriones somáticos de *Agave wocomahi* y *Agave parryi* var. *huachucensis* a condiciones *ex vitro*.**

Para *Agave wocomahi* de un total de 74 embriones somáticos (Figura 52-A y 53), 72 fueron adaptados exitosamente generando un 97.3 % de supervivencia; y para *A. parryi* var. *huachucensis* de un total de 48 embriones somáticos, 29 fueron adaptados *ex vitro* resultando un 60.4% de supervivencia (Figuras 52-B y 54).



**Figura 52. Embriones somáticos previo a la adaptación a condiciones *ex vitro*. *Agave wocomahi* (A) y *Agave parryi* var. *huachucensis* (B).**



**Figura 53. Plántulas provenientes de embriones somáticos de *Agave wocomahi* establecidos bajo condiciones *ex vitro*.**



**Figura 54. Plántulas provenientes de embriones somáticos de *Agave parryi* var. *huachucensis* establecidos bajo condiciones *ex vitro*.**

### **Evaluación de variación somaclonal**

Se obtuvo ADN a partir de tejido de hoja de plántulas control y de diferentes muestras de embriones somáticos correspondientes a *Agave wocomahi* y *A. parryi* var. *huachucensis*, así como de un control externo correspondiente a tejido de hoja de planta de frijol (*Phaseolus vulgaris* L). En el análisis electroforético se visualizó un fragmento íntegro de ADN de 20-25 Kb en todas las muestras, también se aprecian dos fragmentos aproximadamente de entre los 1500 a 1000 pb correspondientes al ARN ribosomal (Anexo C). En general se obtuvo un rango de concentraciones entre 115 y 530 ng/ $\mu$ L y un rendimiento de ADN de entre 171.6 y 791 ng/mg; en ambos casos resultaron muestras con diferencia estadísticamente significativa. Todas las muestras de ADN refieren una pureza de entre 1.7 y 2.1 de acuerdo con la relación de absorbancia 260/280 nm, y no se evidenció diferencia estadísticamente significativa. Por otro lado, de acuerdo a la relación de absorbancia 260/230nm se obtuvo un rango de pureza de entre 0.7 y 2.8, resultado que mostró diferencia estadísticamente significativa (Cuadro 13 y Anexos D-G). Cabe destacar que los datos correspondientes al embrión somático obtenido a partir de tejido de raíz, reflejan los mejores resultados de pureza, concentración y rendimiento de ADN.

La integridad del ADN obtenido fue verificada exitosamente en cada una de las muestras de embrión somático mediante una amplificación por PCR de una región altamente conservada de ADN en el cloroplasto (Anexo H).

**Cuadro 13. Comparación de resultados en la extracción de ADN de *Agave wocomahi* y *A. parryi* var. *huachucensis* a partir de distintas muestras de tejido de hoja.**

Muestra	Absorbancia (nm)						Pureza (corregida)		Concentración (ng µl <sup>-1</sup> ) (corregida)	Rendimiento de ADN (ng mg <sup>-1</sup> ) (corregido) *						
	230	260	280	320	Corrección		260/280 nm	260/230 nm								
					260-320	280-320										
<i>Agave parryi</i>	Control	1	0.068	0.062	0.042	0.012	0.05	0.03	1.7	0.7	125		186.6			
		2	0.124	0.167	0.099	0.02	0.147	0.079	1.9	a	1.2	bc	367.5	abc	548.5	bc
		3	0.088	0.124	0.073	0.008	0.116	0.065	1.8		1.3		290		432.8	
	ES-H(1)	1	0.111	0.156	0.093	0.013	0.143	0.08	1.8		1.3		357.5		533.6	
		2	0.109	0.166	0.1	0.018	0.148	0.082	1.8	a	1.4	bc	370	ab	552.2	abc
		3	0.105	0.141	0.083	0.009	0.132	0.074	1.8		1.3		330		492.5	
	ES-T(1)	1	0.076	0.095	0.06	0.014	0.081	0.046	1.8		1.1		202.5		302.2	
		2	0.081	0.091	0.057	0.009	0.082	0.048	1.7	a	1.0	bc	205	bc	306.0	bc
		3	0.08	0.097	0.061	0.012	0.085	0.049	1.7		1.1		212.5		317.2	
	ES-T(2)	1	0.062	0.065	0.043	0.014	0.051	0.029	1.8		0.8		127.5		190.3	
		2	0.083	0.104	0.064	0.01	0.094	0.054	1.7	a	1.1	bc	235	bc	350.7	c
		3	0.071	0.087	0.056	0.015	0.072	0.041	1.8		1.0		180		268.7	
	ES-T(3)	1	0.072	0.077	0.05	0.011	0.066	0.039	1.7		0.9		165		246.3	
		2	0.058	0.054	0.036	0.008	0.046	0.028	1.6	a	0.8	c	115	c	171.6	c
		3	0.063	0.058	0.038	0.01	0.048	0.028	1.7		0.8		120		179.1	
<i>A. wocomahi</i>	Control	1	0.07	0.089	0.054	0.015	0.074	0.039	1.9		1.1		185		276.1	
		2	0.055	0.091	0.058	0.011	0.08	0.047	1.7	a	1.5	bc	200	bc	298.5	bc
		3	0.08	0.105	0.063	0.014	0.091	0.049	1.9		1.1		227.5		339.6	
	ES-H(2)	1	0.067	0.12	0.064	0	0.12	0.064	1.9		1.8		300		447.8	
		2	0.053	0.149	0.078	0	0.149	0.078	1.9	a	2.8	ab	372.5	abc	556.0	abc
		3	0.044	0.095	0.045	0	0.095	0.045	2.1		2.2		237.5		354.5	
	ES-R(1)	1	0.08	0.137	0.072	0	0.137	0.072	1.9		1.7		342.5		511.2	
		2	0.084	0.214	0.111	0.002	0.212	0.109	1.9	a	2.5	abc	530	a	791.0	ab
		3	0.068	0.148	0.073	0	0.148	0.073	2.0		2.2		370		552.2	
	ES-T(4)	1	0.055	0.075	0.047	0.011	0.064	0.036	1.8		1.2		160		238.8	
		2	0.075	0.097	0.06	0.014	0.083	0.046	1.8	a	1.1	bc	207.5	bc	309.7	c
		3	0.056	0.067	0.04	0.012	0.055	0.028	2.0		1.0		137.5		205.2	
	ES-T(5)	1	0.055	0.07	0.04	0	0.07	0.04	1.8		1.3		175		261.2	
		2	0.055	0.064	0.033	0	0.064	0.033	1.9	a	1.2	bc	160	bc	238.8	bc
		3	0.061	0.116	0.054	0	0.116	0.054	2.1		1.9		290		432.8	
Frijol	1	0.079	0.16	0.093	0.014	0.146	0.079	1.8		1.8		365		776.6		
	2	0.02	0.088	0.047	0	0.088	0.047	1.9	a	4.4	a	220	ab	468.1	a	
	3	0.071	0.18	0.088	0	0.18	0.088	2.0		2.5		450		957.4		

\*Tejido inicial por muestra *Agave* = 67 mg, *Frijol* = 47 mg.

Letras iguales por columna no son estadísticamente diferentes (Tukey, P≤0.05) de acuerdo a promedio de las medias

**CONTROL:** Muestra de plántula bajo condiciones *in vitro* correspondiente a la línea clonal A; **ES-H1:** Embrión somático (ES) obtenido mediante el uso de 1.5 mg/L de ácido indolacético (AIA) en combinación con 1.5 de benciladenina (BA) en explante de hoja y procedente de condiciones *in vitro*; **ES-T1:** ES obtenido mediante el uso de 4.0 mg/L de AIA en combinación con 3.0 de BA en explante de hoja y establecido bajo condiciones *ex vitro*; **ES-T2:** ES obtenido mediante el uso de 1.5 mg/L de ácido 2,4-diclorofenoxiacético en combinación con 3.0 de BA en explante de tallo y establecido bajo condiciones *in vitro*; **ES-T3:** ES obtenido mediante el uso de 1.5 mg/L de ácido 4-amino-3,5,6-tricloro-2-piridincarboxílico en combinación con 1.5 de BA en explante de tallo y establecido bajo condiciones *in vitro*; **ES-H2:** ES obtenido mediante el uso de 4.0 mg/L de AIA en combinación con 3.0 de BA en explante de hoja y establecido bajo condiciones *in vitro*; **ES-R1:** ES obtenido mediante el uso de 1.5 mg/L de AIA en combinación con 1.5 de BA en explante de raíz y establecido bajo condiciones *in vitro*; **ES-T4:** ES obtenido mediante el uso de 1.5 de BA en explante de tallo y establecido bajo condiciones *ex vitro*; y **ES-T5:** ES obtenido mediante el uso de 1.5 mg/L de AIA en combinación con 3.0 de BA en explante de tallo y establecido bajo condiciones *in vitro*.

Posteriormente se obtuvo la amplificación de distintos fragmentos genómicos como respuesta al uso de cada uno de los marcadores moleculares de tipo ISSR (Anexos I-M). Se determinó el tamaño aproximado de cada uno de los fragmentos obtenidos, utilizando un marcador de peso molecular como referencia, lo cual arrojó un rango de tamaños entre los 2000 a 250 pb. El patrón de fragmentos permitió generar una matriz binaria correspondiente a la presencia o ausencia en cada una de las muestras analizadas (Anexos N y Ñ). Basado en la matriz binaria se determinó la presencia de un total de 71 fragmentos amplificados en ambas especies de agaves, de las cuales 42 fueron polimórficas; cabe señalar que considerando la muestra de control externo, se incrementó a un total de 88 fragmentos amplificados, de las cuales 76 resultaron polimórficos. Específicamente, el porcentaje de polimorfismo resultó mayor en *Agave wocomahi* con 30.19 % en comparación con 14.29 % correspondiente al *A. parryi* var. *huachucensis* (Cuadro 14).

El análisis de similitud mediante el índice de Jaccard logró detectar la variación somaclonal presente entre diferentes muestras de embriones somáticos correspondientes a la misma especie de agave, así como entre diferentes especies de agaves (Cuadro 15). Esto se corroboró apoyado en un dendrograma de agrupación jerárquica UPGMA, el cual agrupa los embriones somáticos correspondientes al *Agave wocomahi* con respecto al *A. parryi* var. *huachucensis* y ambos grupos con respecto a un grupo externo correspondiente a frijol (Figura 55).

**Cuadro 14. Análisis de polimorfismos a partir de fragmentos de ADN amplificados mediante el uso de ISSR's en embriones somáticos de *Agave parryi* var. *huachucensis* y *A. wocomahi*.**

Agrupación de embriones somáticos	ISSR	Total de fragmentos	Fragmentos polimórficos	Fragmentos monomórficos	Polimorfismo (%)
<i>Agave parryi</i> var. <i>huachucensis</i>	34	14	0	14	0
	36	13	0	13	0
	811	7	3	4	42.85
	845	10	1	9	10
	853	12	4	8	33.33
	<b>Total</b>		<b>56</b>	<b>8</b>	<b>48</b>
<i>Agave wocomahi</i>	34	15	3	12	20
	36	10	1	9	10
	811	9	7	2	77.77
	845	10	4	6	40
	853	9	1	8	11.11
	<b>Total</b>		<b>53</b>	<b>16</b>	<b>37</b>

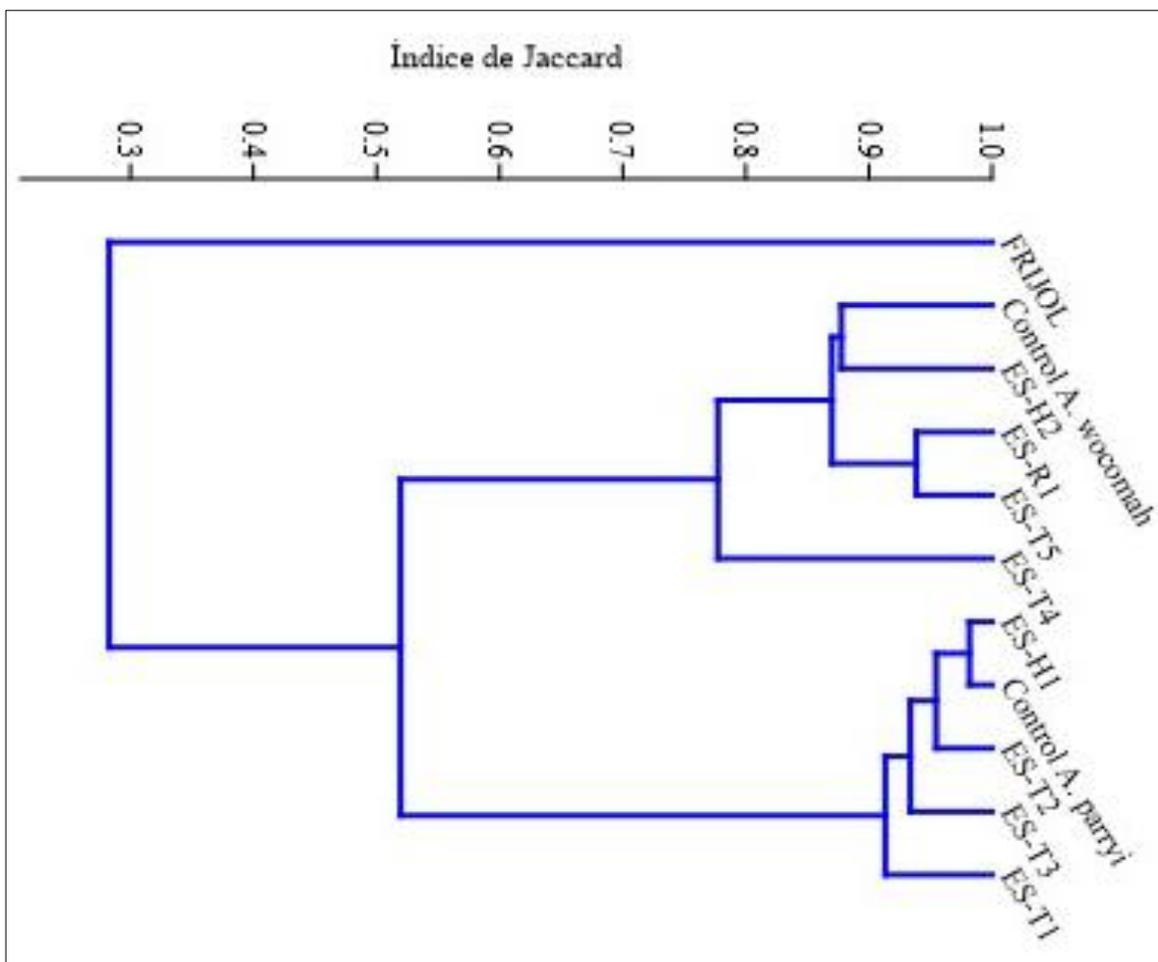
	34	20	12	8	60
<i>Agave parryi</i> var.	36	13	4	9	30.76
<i>huachucensis</i>	811	10	9	1	90
y	845	14	9	5	64.28
<i>Agave wocomahi</i>	853	14	8	6	57.14
<b>Total</b>	<b>71</b>	<b>42</b>	<b>29</b>	<b>59.15</b>	
	34	22	20	2	90.9
	36	18	11	7	61.11
General*	811	11	11	0	100
	845	19	18	1	94.73
	853	18	16	2	88.88
<b>Total</b>	<b>88</b>	<b>76</b>	<b>12</b>	<b>86.36</b>	

**Muestras analizadas de *Agave parryi* var. *huachucensis*, CONTROL:** Plántula bajo condiciones *in vitro* correspondiente a la línea clonal A; ES-T1: Embrión somático (ES) obtenido mediante el uso de 4.0 mg/L de ácido indolacético (AIA) en combinación con 3.0 mg/L de benciladenina (BA) en explante de tallo y establecido bajo condiciones *ex vitro*; ES-H1: ES obtenido mediante el uso de 1.5 mg/L de AIA en combinación con 1.5 mg/L de BA en explante de hoja y procedente de condiciones *in vitro*; ES-T2: ES obtenido mediante el uso de 1.5 mg/L de ácido 2,4-diclorofenoxiacético en combinación con 3.0 mg/L de BA en explante de tallo y establecido bajo condiciones *in vitro*; ES-T3: ES obtenido mediante el uso de 1.5 mg/L de ácido 4-amino-3,5,6-tricloro-2-piridincarboxílico en combinación con 1.5 mg/L de BA en explante de tallo y establecido bajo condiciones *in vitro*. **Muestras analizadas de *Agave wocomahi*, CONTROL:** Plántula bajo condiciones *in vitro* correspondiente a la línea clonal A; ES-T4: ES obtenido mediante el uso de 1.5 mg/L de BA en explante de tallo y establecido bajo condiciones *ex vitro*; ES-R1: ES obtenido mediante el uso de 1.5 mg/L de AIA en combinación con 1.5 mg/L de BA en explante de raíz y establecido bajo condiciones *in vitro*; ES-H2: ES obtenido mediante el uso de 4.0 mg/L de AIA en combinación con 3.0 mg/L de BA en explante de hoja y establecido bajo condiciones *in vitro*; y ES-T5: ES obtenido mediante el uso de 1.5 mg/L de AIA en combinación con 3.0 mg/L de BA en explante de tallo y establecido bajo condiciones *in vitro*. \* Muestras analizadas correspondientes a *Agave parryi* var. *huachucensis*, *A. wocomahi* y *Phaseolus vulgaris* (Frijol) como control externo.

**Cuadro 15. Análisis de similitud en fragmentos de ADN obtenidos a partir de embriones somáticos de *Agave parryi* var. *huachucensis* y *A. wocomahi* mediante el uso del índice de Jaccard.**

MUESTRA	<i>Agave parryi</i> var. <i>huachucensis</i>					<i>Agave wocomahi</i>					FRIJOL
	CONTROL	ES-T1	ES-H1	ES-T2	ES-T3	CONTROL	ES-T4	ES-R1	ES-H2	ES-T5	
<i>Agave parryi</i> var. <i>huachucensis</i>	CONTROL	1									
	ES-T1	0.944	1								
	ES-H1	0.982	0.927	1							
	ES-T2	0.945	0.891	0.964	1						
	ES-T3	0.945	0.891	0.929	0.927	1					
<i>Agave wocomahi</i>	CONTROL	0.571	0.600	0.563	0.556	0.556	1				
	ES-T4	0.470	0.492	0.463	0.477	0.455	0.760	1			
	ES-R1	0.537	0.563	0.529	0.522	0.522	0.880	0.769	1		
	ES-H2	0.507	0.531	0.500	0.493	0.493	0.878	0.765	0.882	1	
	ES-T5	0.515	0.540	0.507	0.523	0.500	0.857	0.816	0.939	0.860	1
FRIJOL	0.295	0.289	0.291	0.282	0.282	0.278	0.268	0.297	0.270	0.274	1

**Valor del índice de Jaccard más cercano a 1.0 significa mayor similitud.** CONTROL: Muestra de plántula bajo condiciones *in vitro* correspondiente a la línea clonal A; ES-T1: Embrión somático (ES) obtenido mediante el uso de 4.0 mg/L de ácido indolacético (AIA) en combinación con 3.0 mg/L de benciladenina (BA) en explante de tallo y establecido bajo condiciones *ex vitro*; ES-H1: ES obtenido mediante el uso de 1.5 mg/L de AIA en combinación con 1.5 mg/L de BA en explante de hoja y procedente de condiciones *in vitro*; ES-T2: ES obtenido mediante el uso de 1.5 mg/L de ácido 2,4-diclorofenoxiacético en combinación con 3.0 mg/L de BA en explante de tallo y establecido bajo condiciones *in vitro*; ES-T3: ES obtenido mediante el uso de 1.5 mg/L de ácido 4-amino-3,5,6-tricloro-2-piridincarboxílico en combinación con 1.5 mg/L de BA en explante de tallo y establecido bajo condiciones *in vitro*; ES-T4: ES obtenido mediante el uso de 1.5 mg/L de BA en explante de tallo y establecido bajo condiciones *ex vitro*; ES-R1: ES obtenido mediante el uso de 1.5 mg/L de AIA en combinación con 1.5 mg/L de BA en explante de raíz y establecido bajo condiciones *in vitro*; ES-H2: ES obtenido mediante el uso de 4.0 mg/L de AIA en combinación con 3.0 mg/L de BA en explante de hoja y establecido bajo condiciones *in vitro*; y ES-T5: ES obtenido mediante el uso de 1.5 mg/L de AIA en combinación con 3.0 mg/L de BA en explante de tallo y establecido bajo condiciones *in vitro*.



**Figura 55. Dendrograma de similitud genética en muestras de embriones somáticos de *Agave parryi* var. *huachucensis* y *A. wocomahi* generado mediante el uso del algoritmo de agrupación de UPGMA. Control:** Muestra de plántula bajo condiciones *in vitro* correspondiente a la línea clonal A; *ES-T1*: Embrión somático (ES) obtenido mediante el uso de 4.0 mg/L de ácido indolacético (AIA) en combinación con 3.0 mg/L de benciladenina (BA) en explante de tallo y establecido bajo condiciones *ex vitro*; *ES-H1*: ES obtenido mediante el uso de 1.5 mg/L de AIA en combinación con 1.5 mg/L de BA en explante de hoja y procedente de condiciones *in vitro*; *ES-T2*: ES obtenido mediante el uso de 1.5 mg/L de ácido 2,4-diclorofenoxiacético en combinación con 3.0 mg/L de BA en explante de tallo y establecido bajo condiciones *in vitro*; *ES-T3*: ES obtenido mediante el uso de 1.5 mg/L de ácido 4-amino-3,5,6-tricloro-2-piridincarboxílico en combinación con 1.5 mg/L de BA en explante de tallo y establecido bajo condiciones *in vitro*; *ES-T4*: ES obtenido mediante el uso de 1.5 mg/L de BA en explante de tallo y establecido bajo condiciones *ex vitro*; *ES-R1*: ES obtenido mediante el uso de 1.5 mg/L de AIA en combinación con 1.5 mg/L de BA en explante de raíz y establecido bajo condiciones *in vitro*; *ES-H2*: ES obtenido mediante el uso de 4.0 mg/L de AIA en combinación con 3.0 mg/L de BA en explante de hoja y establecido bajo condiciones *in vitro*; y *ES-T5*: ES obtenido mediante el uso de 1.5 mg/L de AIA en combinación con 3.0 mg/L de BA en explante de tallo y establecido bajo condiciones *in vitro*.

## DISCUSIÓN

La obtención y multiplicación de material vegetal bajo condiciones *in vitro*, es un paso necesario para evaluar la inducción de tejido calloso por medio de diferentes tratamientos; es por esto que mediante el uso de 1.0 mg/L de BA, se generaron brotes basales de tres diferentes clonas correspondientes a cada una de las especies de agave que fueron evaluadas (Cuadro 3, Figura 6). De acuerdo con Wybouw y De Rybel (2019), es muy bien conocido el efecto de las citocininas para la inducción de brotes, además de que este tipo de reguladores de crecimiento vegetal son ampliamente utilizados en gran variedad de especies vegetales, incluidos los agaves (Domínguez-Rosales *et al.*, 2008-b). En las cinco especies de agaves se logró obtener material vegetal suficiente para los tratamientos correspondientes a la inducción de tejido calloso. Cabe mencionar que para cada especie de agave se eligió el material vegetal correspondiente a una sola línea clónica para su uso en experimentos posteriores, lo cual fue de suma relevancia para el análisis de la variación somaclonal.

En *Agave salmiana* var. *xamini* se obtuvieron ocho brotes por explante, un resultado favorable si es comparado con *Agave salmiana* var. *crassispina* (Ramírez-Malagón *et al.*, 2008) donde se reportó la generación de 5.9 brotes por explante en tratamientos de BA en combinación con IBA y cuyo trabajo es el único que especifica la variedad utilizada. En el caso de *Agave americana* var. *comiteco*, se obtuvieron 5.6 brotes por explante, una menor cantidad de brotes con respecto a lo obtenido por Miguel-Luna *et al.* (2014) en *Agave americana* var. *oaxacensis* quienes reportaron 21 brotes por explante al aplicar 6 mg/L de BA. Para *Agave horrida* var. *perotensis* se obtuvo la mayor respuesta con 34 brotes por explante, un resultado positivo si se compara con lo reportado por Sánchez-Islas y Portillo (2014) quienes, mediante la adición de 9 % de sacarosa obtuvieron hasta ocho brotes en un explante. Estos mismos autores reportaron la nula generación de brotes en la especie de *Agave parryi*, mientras que en el presente trabajo se obtuvo 3.3 brotes por explante para *A. parryi* var. *huachucensis*, lo cual, al igual que con *Agave wocomahi* con 11.7 brotes por explante, son los primeros reportes de inducción de brotes *in vitro*, hasta nuestro conocimiento. Cabe mencionar que el número de brotes generados por explante en *Agave wocomahi* está por encima del rango de entre 4.7 y 6.9 brotes por explante reportado por Domínguez-Rosales *et al.* (2008-a) para otras cinco especies de agaves tratadas con la misma concentración de BA. Es importante mencionar, que los datos anteriores son resultados preliminares, los cuales son necesarios corroborar con un mayor número de explantes y recomendablemente con diferentes concentraciones de BA.

De manera general, la inducción de tejido calloso en cada una de las especies de agave resultó diversa en cuanto al tipo de tejido calloso, lo cual fue determinado por los diferentes reguladores de crecimiento vegetal, así como el tipo de explante utilizado. Debido a lo anterior, se clasificó el tejido calloso basado en el trabajo realizado por Ikeuchi *et al.* (2013), quienes describen cinco diferentes tipos de tejido calloso: tejido calloso compacto, tejido calloso friable, tejido calloso con raíz, tejido calloso con brotes y tejido calloso embriogénico (Figuras 18 y 23). Además, se consideró un tejido calloso tipo nodular, con el objetivo de describir a un tejido calloso con presencia de formas semiesféricas, de consistencia blanda, el cual ha sido reportado en estudios previos con especies de agaves (Álvarez-Aragón *et al.*, 2020).

En cuanto a la eficiencia de inducción de callo se observó un rango de respuesta general entre 35 a 74 %. En todas las especies de agave la eficiencia de inducción de callo, así como la presencia de callo por explante fue favorecida en tejido de tallo, seguido del explante de hoja y raíz; estas diferencias pueden deberse a la cantidad de células meristemáticas y parenquimatosas presentes en el explante de tallo, ya que de acuerdo con Mostafa *et al.* (2020) estas células están relacionadas con una mayor inducción de la división celular en el tejido calloso. Como una excepción, en *Agave horrida* var. *perotensis* se observó una mayor respuesta en explante de raíz que en hoja con 25 y 21 %, respectivamente. Lo anterior resalta la importancia que tiene la elección del tipo de explante inicial en cada especie vegetal cuando se tiene por objetivo una mayor inducción y generación de tejido calloso.

También de manera general se observó una relación recíproca entre una mayor presencia de oxidación, y una menor eficiencia de inducción de callo en los explantes utilizados de las cinco especies de agaves, principalmente en tejido de raíz y hoja. Posiblemente, este efecto podría suprimirse con la adición de antioxidantes al medio de inducción de callo, lo cual además de reducir la presencia de oxidación podría promover mayor eficiencia en la inducción de tejido calloso. Esto se reportó por Alharby *et al.* (2016), quienes obtuvieron un incremento en el crecimiento de tejido calloso mediante la adición de nanopartículas de óxido de zinc como agente antioxidante en jitomate (*Solanum lycopersicum*, Solanaceae).

El color de tejido calloso se encuentra mayormente asociada a los diferentes tratamientos con los reguladores de crecimiento vegetal. Por ejemplo, el tejido calloso inducido con PIC y 2,4-D tuvo un color predominantemente amarillo en las cinco especies de agaves, posiblemente debido a la

degradación de clorofila, efecto producido por este regulador de crecimiento vegetal (Chin *et al.*, 2017). Con el uso del ANA predominó el tejido calloso con tonos cafés claros y con el AIA así como la BA se mostró en su mayoría un tejido blanco a veces con presencia de tonos tenues de verde o café.

El tipo de tejido calloso fue una respuesta muy variable en las cinco especies de agave. Sin embargo, se puede considerar de manera presuntiva, que la generación de algunos tipos de tejido callosos se encuentra asociados al tipo de regulador de crecimiento vegetal utilizado. Por ejemplo, el PIC generó en su mayoría tejido calloso de tipo nodular, el ANA tejido calloso con raíz y el 2,4-D tejido calloso compacto. Para el caso del AIA y BA se observó en su mayoría, tejido calloso de tipo compacto, friable y con presencia de brotes; cabe señalar que con el uso de estos 2 reguladores de crecimiento vegetal, prácticamente fue nula la respuesta en la generación de tejido calloso en explante de raíz, con excepción en la especie *Agave parryi* var. *huachucensis*, donde se logró una eficiencia en la inducción de callo en explante de raíz del 73 y 7.5 % con el AIA y la BA, respectivamente. Esta diferencia en las respuestas del tipo de tejido calloso en las cinco especies de agaves sometidas a los diferentes reguladores de crecimiento vegetal, posiblemente se deba a la diferente susceptibilidad a distintos tipos de auxinas no solo en cada especie (Cancino-García *et al.*, 2020), sino también en diferentes tejidos de una misma especie, tal como se observó en el *Agave parryi* var. *huachucensis*. Además de la susceptibilidad a distintos tipos de auxina, también puede estar implicada la concentración de las auxinas en las respuestas de cada especie de agave, tal como se observó en la diferencia de eficiencia en la inducción de tejido calloso ya que en general, las concentraciones menores o iguales de auxinas con respecto a la BA promueven una mayor inducción de tejido calloso, con excepción en *Agave horrida* var. *perotensis* donde las concentraciones solas de auxina promueven la mayor inducción de tejido calloso. También, en otros estudios se han reportado respuestas similares, tales como el de Arzate-Fernández y Mejía-Franco (2011), quienes encontraron que las concentraciones bajas de citocininas en el medio de cultivo, particularmente BA, favorecen la inducción y crecimiento de callo en *A. angustifolia*. Por otro lado, dependiendo de la finalidad del estudio, pueden considerarse otro tipo de respuestas, como la obtención de metabolitos secundarios de interés. Por ejemplo, Chaâbani *et al.* (2015) reportaron que el uso de concentraciones mayores de 2,4-D con respecto a BA, puede ser adecuado para inducir la calidad más que la cantidad de compuestos bioactivos en el cultivo de callo de hoja en *Crataegus azarolus* (Rosaceae); lo anterior se debe a que la proporción y el tipo de reguladores de crecimiento vegetal son factores cruciales para la estimulación de vías biosintéticas.

Desde el punto de vista del efecto de los reguladores de crecimiento vegetal, el ANA generó mayor eficiencia de inducción de callo en *Agave americana* var. *comiteco*, *Agave horrida* var. *perotensis* y *Agave salmiana* var. *xamini*. En el caso de *Agave wocomahi* y *Agave parryi* var. *huachucensis*, el ANA fue el segundo y tercer regulador de crecimiento vegetal con mejor respuesta a la inducción de tejido calloso, respectivamente. En general, el efecto del ANA en las cinco especies de agave fue la generación de tejido calloso con raíz, en una coloración predominantemente blanca con una menor tonalidad de amarillo y café; con abundante presencia de callo por explante, principalmente en tallo seguido de hoja y raíz (Figura 10-G a K y Figura 17-E a G). El resultado sugiere que existe una conservada influencia de esta auxina sintética en el desarrollo de tejido calloso con raíz en agaves, el cual ha sido reportado en *Agave fourcroydes* (Monja-Mio y Robert, 2013) y *Agave sisalana* (Nikam, 1997). Por otro lado, también se logró inducir tejido calloso embriogénico en *Agave salmiana* var. *xamini*, *Agave horrida* var. *perotensis* y *Agave parryi* var. *huachucensis*, así como el subsecuente desarrollo de embriones somáticos, lo cual ha sido reportado en *Agave salmiana* (Flores-Benítez *et al.*, 2007) y en *Agave vera-cruz* (Tejavathi *et al.*, 2007). Además, también es de considerar la capacidad del ANA de inducir organogénesis, tal como se describe para *Agave tequilana* (Valenzuela-Sánchez *et al.*, 2006) y *Agave arizonica* (Powers and Backhaus, 1989). Sumado a lo anterior, el uso de esta auxina puede ser una opción promisoriosa en el cultivo de tejido calloso y raíces pilosas para la obtención de metabolitos secundarios de interés (Li and Wang, 2020; Baek *et al.*, 2020; Contreras-Ovalle *et al.*, 2019).

El PIC fue otro regulador de crecimiento vegetal que reflejó un resultado persistente en las cinco especies de agaves. En *Agave wocomahi* el uso de del PIC resultó en la mayor eficiencia en la inducción de callo, mientras que en *Agave americana* var. *comiteco*, *Agave salmiana* var. *xamini*, *Agave horrida* var. *perotensis* y *Agave parryi* var. *huachucensis* fue el segundo regulador de crecimiento vegetal que generó mayor eficiencia de inducción de callo. En general, la respuesta al PIC se caracterizó por la generación de tejido calloso nodular en color amarillo claro, principalmente en explante de tallo. Los autores Chin *et al.*, (2017) sugieren el uso de PIC como inductor de callo embriogénico en diversas especies vegetales, como una opción en sustitución de 2,4-D con el fin de evitar problemas que se presentan por este regulador de crecimiento vegetal, principalmente por anomalías en la embriogénesis somática. En agaves, el PIC ha sido poco explorado; únicamente Monja-Mio y Robert (2013) han reportado su uso para la generación de embriogénesis directa en *Agave fourcroydes*, lo que permite considerarlo como una alternativa para su aplicación en el desarrollo de protocolos para la embriogénesis somática en las cinco especies de agaves.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Uno de los reguladores de crecimiento vegetal ampliamente utilizados en una gran variedad de plantas para inducir tejido calloso, es el 2,4-D, el cual es una auxina sintética (García *et al.*, 2019). Particularmente, en el género *Agave* es el regulador de crecimiento vegetal más utilizado para la inducción de tejido calloso (Cancino-García *et al.*, 2020; Arzate-Fernández *et al.*, 2016; Tejavathi *et al.*, 2007; Sri Andrijany *et al.*, 1998; Powers and Backhaus, 1989; Groenewald *et al.*, 1977). No obstante, este regulador de crecimiento vegetal mostró una moderada eficiencia de inducción de tejido calloso en las cinco especies de agaves evaluadas en el presente trabajo. Con excepción del *A. wocomahi*, el cual desarrolló tejido calloso nodular, en los 4 restantes agaves predominó el tejido calloso tipo compacto mediante el uso del 2,4-D, cuyo color fue amarillo con una menor tonalidad de blanco y café, lo cual difiere parcialmente con lo obtenido por Arzate-Fernández y Mejía-Franco (2011), quienes obtuvieron tejido calloso “duro” en color blanco-amarillo perlado y otros “suaves y friables” en color blanco cremoso en *Agave angustifolia* mediante el uso de distintas concentraciones de 2,4-D. Esto posiblemente se deba a la diferencia en genotipos así como en explantes utilizados, ya que estos autores utilizaron embriones cigóticos como explantes para la inducción de tejido calloso. Por otro lado, el tejido calloso obtenido con 2,4-D mostró facilidad para su subcultivo, lo cual sumado a que es considerando un inductor efectivo de callo embriogénico (Arzate-Fernández y Mejía-Franco, 2011), se sugiere que pueda ser una opción viable para el desarrollo de protocolos para la embriogénesis somática, cuya respuesta se presentó en el *Agave salmiana* var. *xamini*, *Agave wocomahi* y *Agave parryi* var. *huachucensis*, no obstante, debe considerarse que esta auxina puede estar relacionada con la presencia de anomalías en los embriones somáticos (García *et al.*, 2019).

Con respecto al AIA, en *Agave parryi* var. *huachucensis* desarrolló la mayor eficiencia de inducción de tejido calloso, mientras que en los cuatro agaves restantes mostró una escasa eficiencia de inducción de tejido calloso. En general, se presentó un tejido calloso compacto seguido de un tejido calloso friable, en un color blanco con tono café. No obstante, a pesar de que AIA ha sido la más estudiada en plantas (Kasahara, 2016), ha sido escasamente utilizada en la inducción de tejido calloso en especies de agaves; solo Nikam (1997) ha reportado la obtención de tejido calloso con el uso de este regulador de crecimiento vegetal y posteriormente la generación de brotes en *Agave sisalana*. En el presente trabajo encontramos diversas respuestas morfogénicas mediante el uso del AIA en las cinco especies de agaves, tales como la inducción directa de brotes en explante de tallo, hoja y raíz; inducción directa de raíces en explante de hoja; inducción indirecta de brotes en explante de tallo y hoja; inducción indirecta de raíces en explante de tallo, hoja y raíz; posible embriogénesis somática

directa en explante de hoja y posible embriogenesis somática indirecta en explante de tallo y hoja. Particularmente en *Agave parryi* var. *huachucensis*, esta auxina posee una gran influencia en la inducción de tejido calloso, así como en su posterior morfogénesis, no solo en cantidad sino también en variedad de respuestas morfogénicas. Desde un punto de vista fisiológico, esto resulta de gran interés, ya que evidencia las diferentes respuestas en estas cinco especies de agave al estímulo de un mismo regulador de crecimiento vegetal. Lo anterior sugiere que hay distintos mecanismos morfogénicos presentes no solo en especies distintas de un mismo género, sino incluso en distintos tejidos de una misma planta. Esto coincide con lo propuesto por Cancino-García *et al.* (2020), quienes mencionan que deben existir diferentes mecanismos de inducción de tejido calloso entre especies de agaves, lo cual puede estar relacionado también con variaciones en los niveles endógenos de auxinas y citocininas.

Adicionalmente, se evaluó el efecto de dos concentraciones de BA, donde con excepción de *Agave parryi* var. *huachucensis*, de manera general resultó una escasa eficiencia de inducción de tejido calloso. Cabe señalar que el estímulo de este regulador de crecimiento vegetal fue prácticamente nulo en el explante de raíz en las cinco especies de agaves, mientras que en explante de tallo se obtuvo directamente la generación de brotes a partir de meristemos basales (Figura 10-A y B; Figura 17-A; Figura 22-A y Figura 27-A), tal como se ha reportado en otras especies de agaves (Domínguez-Rosales *et al.*, 2008-a; Ramírez-Malagón *et al.*, 2008); además, en *Agave horrida* var. *perotensis*, *Agave wocomahi* y *Agave parryi* var. *huachucensis* se observó la inducción de brotes adventicios a partir de explante de hoja (Figura 10-D y E; Figura 17-B; Figura 22-B; Figura 27-B y C), una respuesta poco reportada en especies de agave. Esto es de peculiar interés, debido a la mayor disposición de explantes de hoja en comparación con explantes de tallo, circunstancia que limita en gran medida la obtención de plántulas en periodos cortos de tiempo bajo cultivos *in vitro*. Lo anterior abre la posibilidad de establecer protocolos para la micropropagación de las cinco especies de agave mediante la multiplicación de meristemos basales a partir de explantes de tallo o brotes adventicios a partir de explante de hoja.

También, aunque en menor proporción, mediante el uso de la BA se generó tejido calloso con brotes, los cuales presentaron dos apariencias: una en consistencia dura en color blanco y otra suave en color blanco traslúcido (Figura 17-C y D, y 27-D). Este tipo de tejido calloso con brotes es considerado como una respuesta típica atribuida a la función de las citocininas (Wybouw y De Rybel, 2019). Cabe mencionar, que en el tejido calloso con brotes, cuya consistencia fue suave en color

blanco translúcido, se generaron también estructuras parecidas a embriones somáticos, lo cual sugiere la presencia de ambos tipos de tejido calloso en un solo tipo de explante. Sumado a lo anterior, tanto en tejido calloso proveniente de tallo así como de hoja, se obtuvo la generación de embriones somáticos. Esto aunque poco común, también ha sido reportado en otras especies vegetales como *Sapindus mukorossi* (Sapindaceae) (Singh *et al.*, 2015), donde reportan una inducción de tejido calloso y posteriormente embriogénesis somática mediante el uso de BA. Las evidencias anteriores nos permiten sugerir, que es necesario ampliar el estudio con distintos tipos y concentraciones de citocininas, con el objetivo de establecer protocolos alternativos en la inducción de tejido calloso y la subsecuente organogénesis o embriogénesis somática en estas cinco especies de agaves.

Durante la inducción y el mantenimiento de tejido calloso, embriones somáticos fueron observados en las cinco especies de agaves, la mayoría de ellos presentes en *Agave horrida* var. *perotensis* y *Agave wocomahi*. En *Agave americana* var. *comiteco* y *Agave salmiana* var. *xamini*, la generación de embriones somáticos fue escasa ya que únicamente se observaron 20 y 25 embriones somáticos, respectivamente, la mayoría de ellos se observaron en tratamientos con BA en combinación con AIA y ANA. Estos resultados son los primeros reportes de embriogénesis somática para el caso de *Agave americana* var. *comiteco* (Figura 34). En el caso de *Agave salmiana* var. *xamini*, existe un reporte previo en la obtención de embriones somáticos en *Agave salmiana* (Flores-Benitez *et al.*, 2007) mediante el uso de BA en combinación con ANA, sin embargo, además de no especificar la variedad del agave, estos autores tampoco especifican el número de embriones somáticos obtenidos por explante. Lo anterior sugiere que es recomendable reportar una metodología para la embriogénesis somática mediante el uso y combinación de la BA y el ANA con el fin de determinar la eficiencia en la generación de embriones somáticos. En el caso de *Agave horrida* var. *perotensis* se obtuvo un total de 267 embriones somáticos (Figura 37), de los cuales 176 maduraron mediante el uso del AIA en combinación con la BA. Al igual que el *Agave americana* var. *comiteco*, en *Agave horrida* var. *perotensis* no existen reportes previos de embriogénesis somática, por lo que es recomendable continuar con el análisis de tratamientos en ambas especies, con el fin de incrementar y determinar la eficiencia en la generación de embriones somáticos.

En *Agave wocomahi* y *Agave parryi* var. *huachucensis* se observó un total de 310 y 136 embriones somáticos, respectivamente, en diferentes etapas de desarrollo, esto en callo generado a partir de explantes de tallo y hoja tratados con BA sola, o combinada con AIA, y con solo 2,4-D y ANA. Al transferir el tejido calloso a medio basal carente de reguladores de crecimiento vegetal, solo

o adicionado con carbón activado, se obtuvo un total de 360 embriones somáticos para *Agave wocomahi* (Figura 47) y 498 en *Agave parryi* var. *huachucensis*. Cabe mencionar que en ambas especies, el mayor número de embriones somáticos se obtuvo a partir de tejido calloso procedente de explante de tallo y que la adición de carbón activado al medio basal carente de reguladores de crecimiento vegetal, no mostró diferencia significativa en *Agave wocomahi*, pero sí en *Agave parryi* var. *huachucensis*. La mayor eficiencia observada en esta vía de regeneración en *Agave wocomahi* fue cuando fragmentos de callo generado en explantes de tallo sometidos a 1.5 mg/L de AIA con 3.0 mg/L de BA (Figura 50), fueron transferidos a medio basal con carbón activado donde se obtuvo un promedio de 16.4 plantas por fragmento de callo (Figura 47-C; Figura 51-C y D) y cuando fragmentos de callo de *Agave parryi* var. *huachucensis* generado en explantes de tallo sometidos a 1.5 mg/L de BA, fueron transferidos a medio basal donde se obtuvo un total de 13.9 plantas por fragmento de callo. En ambas especies, no existen reportes previos de embriogénesis somática, pero en otras especies como *Agave angustifolia* reportaron la obtención de hasta 34 embriones somáticos por explante (Reyes-Díaz *et al.*, 2017) así también, en esta misma especie, Arzate-Fernández y Mejía-Franco (2011) mencionaron la generación de un total de 216 embriones somáticos mediante el uso de 3.0 mg/L de 2,4-D en combinación de 1.0 mg/L de BA. Sin embargo, estos últimos autores no precisan el número promedio de plantas obtenidas por porción de tejido calloso, por lo que sus valores no son comparables de forma directa con la eficiencia reportada en este trabajo para *Agave wocomahi* y *Agave parryi* var. *huachucensis*.

La generación de embriones somáticos se registró de manera asincrónica en explante de tallo, principalmente, pero también en hoja y raíz, como respuesta a los reguladores de crecimiento vegetal evaluados. Los tratamientos cuya combinación de BA con AIA fueron donde se observaron mayor cantidad de embriones somáticos, excepto en *Agave parryi* var. *huachucensis*, el cual presentó mayor cantidad en los tratamientos con únicamente BA.

La morfología de los embriones somáticos fue diversa, principalmente en el desarrollo de la raíz, ya que se observó que con concentraciones solas o mayores de BA con respecto al AIA se presentó menor desarrollo de raíz en comparación con la parte apical del embrión, esto fue evidente en *Agave parryi* var. *huachucensis* y *Agave wocomahi* (Figura 46 y Figura 51-E), similar al desarrollo descrito por Delgado-Aceves *et al.* (2021) en *Agave tequilana*, así como lo observado en la germinación de semillas de agave sometidas a diferentes concentraciones de BA con AIA (Anexo O), también coincide con lo reportado por Miguel-Luna *et al.* (2014), quienes mencionan que la BA

inhibe las raíces en brotes adventicios en *Agave americana* var. *oaxacensis*. Por otro lado, concentraciones mayores o iguales de AIA con respecto a la BA presentaron un desarrollo de raíz aparentemente normal, tal como se observó en *Agave horrida* var. *perotensis* y *Agave wocomahi* (Figura 37-A y B, y Figura 51-A). Cabe mencionar que en *Agave americana* var. *comiteco*, los embriones somáticos obtenidos mediante 4.0 mg/L de AIA en combinación con 1.5 mg/L de BA presentaron una morfología inicial que se caracterizó por un tejido de consistencia dura en color blanco (Figura 34-A y B), muy similar a lo reportado en *Agave angustifolia* por Reyes-Díaz *et al.* (2017) y Arzate-Fernández y Mejía-Franco (2011). De acuerdo con Kasahara (2016) el AIA es la auxina más estudiada en plantas, no obstante, hasta nuestro conocimiento, este regulador de crecimiento vegetal no ha sido utilizado en especies de agaves para la generación de embriones somáticos, por lo que este trabajo sería el primer reporte de la obtención de embriogénesis somática en especies del género *Agave* mediante el uso de AIA en combinación con BA.

En tratamientos con ANA solo o en combinación con BA, los embriones somáticos mostraron un polo radical y uno apical bien definido, lo cual se observó en *Agave salmiana* var. *xamini*, *Agave horrida* var. *perotensis* y *Agave parryi* var. *huachucensis* (Figuras 35 y 36, Figura 37-G y H, y Figuras 42-45). La obtención de embriones somáticos mediante el uso de esta auxina solo ha sido reportado en *Agave salmiana* (Flores-Benítez *et al.*, 2007), sin embargo, no se especificó el número de embriones somáticos obtenidos por explante.

Otro regulador de crecimiento vegetal que indujo embriogénesis somática en *Agave salmiana* var. *xamini*, *Agave wocomahi* y *Agave parryi* var. *huachucensis* fue el 2,4-D, el cual es la auxina más utilizada para inducir tejido calloso embriogénico en el género *Agave* (Cancino-García *et al.*, 2020), aún cuando García *et al.* (2019), recomiendan el uso de PIC como inductor de callo embriogénico en sustitución del 2,4-D. Esto con la finalidad de evitar los problemas que se presentan con esta auxina, principalmente anomalías en los embriones somáticos, resultado de la alta inducción de variación somaclonal debido al efecto característico del uso del 2,4-D, el cual promueve la hipermetilación del ADN (Viñas and Jiménez, 2011). Cabe señalar, que el efecto del PIC ha sido poco estudiado en agaves; solo en *Agave tequilana* (Delgado-Aceves *et al.*, 2021) y en *Agave fourcroydes* (Monja-Mio and Robert, 2013) han reportado la inducción indirecta y directa, respectivamente, de embriogénesis somática mediante el uso de PIC. Sin embargo, de las cinco especies de agaves estudiadas, solo en *Agave parryi* var. *huachucensis* se logró evidenciar embriones somáticos resultado del efecto del PIC en combinación con BA en tejido calloso proveniente de explante de hoja (Figura 40 y 41), y solo un

embrión somático logró sobrevivir al transferir el tejido calloso proveniente de explante de tallo inducido con 1.5 mg/L de PIC y 1.5 mg/L de BA a medio basal carente de reguladores de crecimiento vegetal y adicionado con carbón activado. Esto sugiere la necesidad de indagar en estrategias dirigidas para el crecimiento y desarrollo de los embriones somáticos obtenidos mediante el uso del PIC.

La obtención de embriones somáticos, a partir de tejido calloso inducido con BA fue lograda en *Agave horrida* var. *perotensis*, *Agave wocomahi* y en mayor medida en *Agave parryi* var. *huachucensis*. El mejor tratamiento para la obtención de embriones somáticos en *Agave wocomahi* fue cuando el tejido calloso tipo suave-friable inducido con 3.0 mg/L de BA, y procedente de explantes de tallo (Figura 47-D y Figura 51-E) fue colocado en medio de cultivo sin reguladores de crecimiento vegetal, donde se obtuvieron 50 embriones somáticos; mientras en *Agave parryi* var. *huachucensis* el tejido calloso inducido en el tratamiento con 1.5 mg/L de BA (Figura 46) generó 159 embriones somáticos una vez traspasado a medio sin regulador de crecimiento vegetal. Esta respuesta, aunque poco común, ha sido reportado en otras especies vegetales como *Agave marmorata* (Álvarez-Aragón *et al.*, 2020) y *Agave sisalana* (Nikam *et al.*, 2003). Lo anterior sugiere ampliar el estudio con distintos tipos y concentraciones de citocininas con el objetivo de establecer protocolos alternativos para la embriogénesis somática en estas cinco especies de agaves.

Una de las complicaciones que se presentan durante el desarrollo de protocolos para la embriogénesis somática es la distinción entre material embriogénico del no embriogénico; por ello, existen técnicas que permiten evidenciar la generación de embriones somáticos, como la doble tinción con acetocarmín y azul de Evans (Gupta y Holmstrom, 2005). Mediante el uso de esta técnica se logró visualizar embriones somáticos de *Agave salmiana* var. *xamini*, *Agave wocomahi* y *Agave parryi* var. *huachucensis*, en distintos estadios del desarrollo. En *Agave parryi* var. *huachucensis* y *Agave wocomahi* se observaron embriones somáticos en estado globular (Figura 38 y 48), en los cuales se aprecian una alta concentración de ácidos nucleicos y proteínas del citoplasma, teñidas en color rojo, en contraste con el resto de tejido calloso, el cual se visualiza en color azul por la acción del colorante azul de Evans (Gupta y Holmstrom, 2005). También, se observó embriones somáticos bien definidos con una parte apical y una raíz, tanto en *Agave salmiana* var. *xamini* como en *Agave parryi* var. *huachucensis* (Figura 35 y 42), en este último se logró apreciar una continuidad vascular en toda la estructura del embrión somático.

Otra característica que nos permite la distinción de embriones somáticos es su morfología, caracterizada por un polo apical y un polo radicular bien definido, lo cual también pudo ser visualizada directamente mediante el uso de un estereoscopio óptico en *Agave parryi* var. *huachucensis* y *Agave wocomahi* (Figuras 40, 45 y 51-D). También, en ambas especies se lograron apreciar distintas morfologías de embriones somáticos (Figuras 40, 44, 49 y 50), así como las etapas globular, escutelar y coleoptilar (Figura 51-B), características de plantas monocotiledóneas (Quiroz-Figueroa *et al.*, 2006), lo cual ha sido reportado parcialmente en embriogénesis somática de *Agave angustifolia* (Arzate-Fernández y Mejía-Franco, 2011) y en *Coffea arabica* (Riviello-Cogco *et al.*, 2021). Adicionalmente, también se evidenció en *Agave salmiana* var. *xamini* (Figura 36), *Agave parryi* var. *huachucensis* (Figuras 39, 41, 43, 44 y 46-B) y *Agave wocomahi* (Figuras 49 y 50), la generación de embriones somáticos mediante imágenes obtenidas con un microscopio electrónico de barrido (MEB), cuya herramienta ha sido utilizada para demostrar la obtención de embriones somáticos en otras especies vegetales como en *Althaea officinalis* (Naz *et al.*, 2017). Estas imágenes, además de confirmar la generación de embriones somáticos, permitieron visualizar en *Agave parryi* var. *huachucensis* diferentes etapas embriogénicas, así como distintas apariencias que pueden presentar estas estructuras embriogénicas.

Además de las técnicas y herramientas mencionadas anteriormente utilizadas para evidenciar la obtención de embriones somáticos en especies de agaves, es altamente recomendable a manera de complemento, la aplicación de estudios histológicos completos a lo largo de todas las etapas de desarrollo de los embriones somáticos. Cabe señalar que la evidencia de la presencia de diferentes etapas del desarrollo de los embriones somáticos, así como su capacidad de desarrollarse en plantas completas con sus polos apical y radical bien diferenciados, indican que ocurrió la embriogénesis somática en las diferentes especies de agaves mencionadas en este estudio.

Las plantas generadas a partir de embriones somáticos (Figura 52) alcanzaron una supervivencia *ex vitro* de 97.3 y 60.4 % *ex vitro*, en *Agave wocomahi* y *Agave parryi* var. *huachucensis*, respectivamente (Figuras 53 y 54). La totalidad de estas plantas mostraron un desarrollo normal, similar al de las plantas generadas a partir de meristemos basales, cuya tasa de supervivencia fue de 100%. Estos resultados reflejan que la vía de regeneración por esta presunta embriogénesis somática no limita la posibilidad de supervivencia *ex vitro* y desarrollo inicial normal de las plantas generadas, lo cual coincide con lo observado en otras especies de agave (Arzate-Fernández *et al.*, 2016; Rodríguez-Garay, 2016).

El uso de los marcadores moleculares ISSR demostró la presencia de variación somaclonal en embriones somáticos obtenidos de manera indirecta y bajo condiciones *in vitro* a partir de diferentes explantes de *Agave parryi* var. *huachucensis* y *Agave wocomahi*. Se obtuvo un total de 71 fragmentos amplificados entre ambos agaves con un porcentaje de polimorfismo del 59.15 % (Cuadro 14) poco menos comparado con 70 % reportado por Vega-Ramos *et al.* (2022). Cabe señalar que estos autores utilizaron seis marcadores moleculares de tipo ISSR en cuatro diferentes especies de agaves, por lo que es de esperarse que fuera mayor la variación genética detectada.

El índice de similitud de Jaccard demostró la variación somaclonal presente no solo entre las dos especies de agaves con un rango entre 0.463 y 0.6, sino también entre diferentes embriones somáticos de una misma especie (Cuadro 15). El *Agave wocomahi* presentó mayor variación somaclonal con un rango entre 0.76 y 0.939, respecto al rango entre 0.891 y 0.982 en *Agave parryi* var. *huachuensis*. Si bien, en ambos agaves los valores del índice de Jaccard son muy cercanos a 1, lo que indica que son muy similares; se esperaría que los valores fueran iguales respecto a su control, dado que provienen de una sola línea clónica. Lo anterior sugiere que esta variación genética puede deberse a la acumulación de diferentes tipos de mutaciones, durante el proceso de la embriogénesis somática indirecta e incluso durante el proceso de adaptación o desarrollo bajo condiciones *ex vitro* de la planta generada por medio de embriogénesis somática. Esto último se sugiere debido a que las muestras de ADN de embriones somáticos procedentes de condiciones *ex vitro* fueron las que presentaron menor similitud con las muestras control en ambos agaves. Por otro lado, cabe señalar que el tipo de reproducción del agave también puede estar implicado en una mayor variación genética (Dávila *et al.*, 2007), lo anterior también lo sugiere Vega-Ramos *et al.* (2022), quienes encontraron una menor relación genética en *Agave potatorum*, el cual se reproduce únicamente por semilla, con respecto a tres especies de agaves cuya reproducción es más frecuente por medio de hijuelos. Lo anterior es similar a lo encontrado en *Agave wocomahi* el cual es una especie que se reproduce únicamente por reproducción sexual.

De acuerdo con el dendrograma de similitud genética, es posible diferenciar la variación genética entre las dos especies de agaves ya que se agrupan de manera separada (Figura 55). Esto demuestra que los marcadores moleculares de tipo ISSR son eficientes para demostrar variación genética en *Agave wocomahi* y *Agave parryi* var. *huachucensis*, tal como ha sido evidenciada en otras

especies como *Agave tequilana*, *Agave angustifolia*, *Agave potatorum*, *Agave karwinskii* y *Agave cocui* (Vega-Ramos *et al.*, 2022; Dávila *et al.*, 2007).



## CONCLUSIÓN

Se reportó por vez primera la inducción y caracterización de diferentes tipos de tejido calloso en explante de tallo, hoja y raíz de *Agave americana* var. *comiteco*, *Agave salmiana* var. *xamini*, *Agave horrida* var. *perotensis*, *Agave parryi* var. *huachucensis* y *Agave wocomahi*. En algunos casos, se obtuvo una posterior morfogénesis, lo que dependió principalmente del tipo y concentración de reguladores de crecimiento vegetal, así como del tipo de explante. También se obtuvo la inducción de brotes a partir de yemas basales en las cinco especies de agaves, lo cual solo se tenía registrado previamente para *A. horrida* var. *perotensis*.

Embriones somáticos fueron generados en las cinco especies de agaves. En *Agave americana* var. *comiteco*, *Agave salmiana* var. *xamini* y *Agave horrida* var. *perotensis*, se observaron embriones somáticos principalmente en tratamientos con BA en combinación con AIA. Estos resultados son los primeros reportes de embriogénesis somática para el caso de *Agave americana* var. *comiteco* y *Agave horrida* var. *perotensis*.

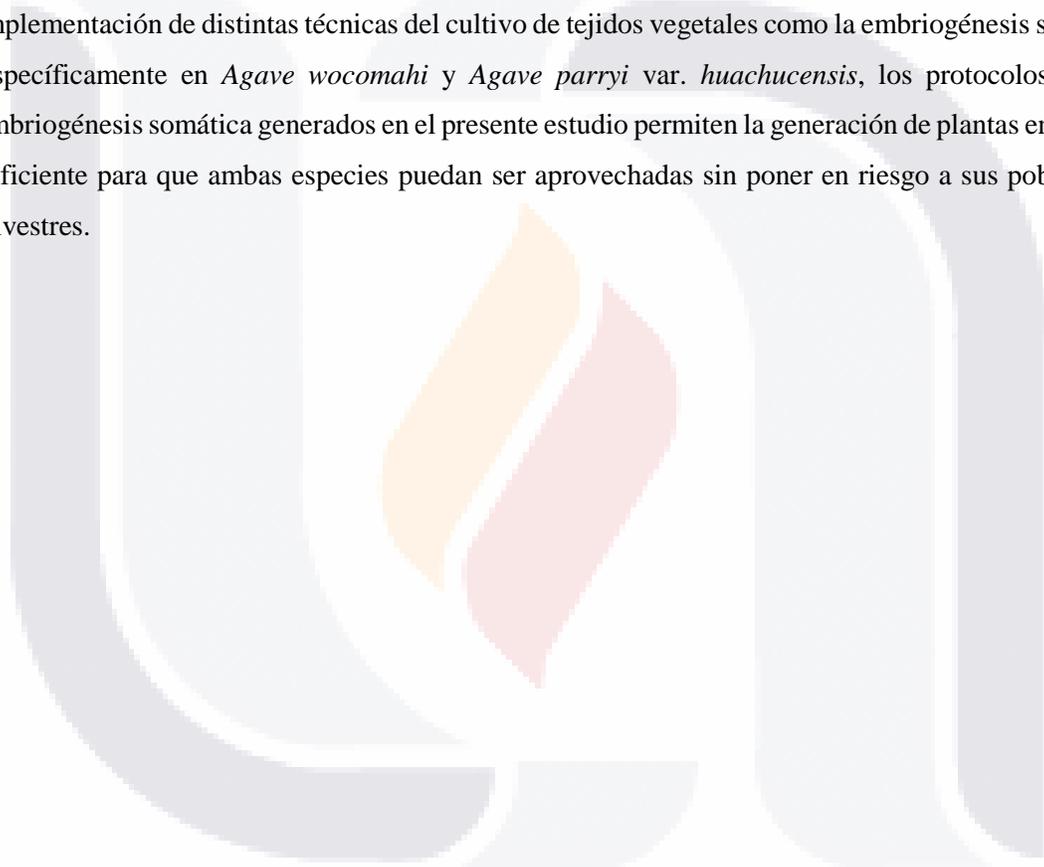
En *Agave wocomahi* se obtuvieron embriones somáticos bajo el efecto del AIA, 2,4-D y BA, y en *Agave parryi* var. *huachucensis* bajo el efecto de todos los reguladores de crecimiento vegetal probados. En ambas especies el uso de explante de tallo fue el que mostró mejores resultados, mediante la inducción de tejido calloso embriogénico con 1.5 mg/L de AIA en combinación de 3.0 mg/L de BA en *Agave wocomahi* y con 1.5 mg/L de BA en *Agave parryi* var. *huachucensis*. En ambas especies, los embriones somáticos generados en el tejido calloso se convirtieron en plantas completas al transferirlas a un medio basal sin reguladores de crecimiento vegetal. Las plantas generadas *in vitro* originadas por embriogénesis somática fueron capaces de adaptarse a las condiciones externas y desarrollarse en suelo de manera normal.

Hasta nuestro conocimiento, este es el primer reporte de la obtención de embriogénesis somática en *Agave wocomahi* y *Agave parryi* var. *huachucensis* a partir de explante de tallo y hoja, así como la inducción de esta respuesta morfogénica mediante el uso de AIA en combinación con BA en especies del género *Agave*.

También se comprobó la eficiencia de cinco marcadores moleculares de tipo ISSR para determinar no solo la presencia de variación genética entre el *Agave wocomahi* y *Agave parryi* var.

*huachucensis*, sino también la variación somaclonal presente en cada una de las dos especies. Cabe mencionar que el proceso de embriogénesis somática propició diferentes grados de la variación somaclonal en ambas especies. Los embriones somáticos de *Agave parryi* var. *huachucensis* reflejaron menor variación somaclonal con respecto a los embriones somáticos del *Agave wocomahi*.

Nuestros resultados, además de permitir anticipar el tipo de respuesta morfogénica *in vitro* en cinco diferentes especies de agaves, también contribuyen con nuevas estrategias biotecnológicas orientadas a la protección, conservación o aprovechamiento sustentable, por medio de la implementación de distintas técnicas del cultivo de tejidos vegetales como la embriogénesis somática. Específicamente en *Agave wocomahi* y *Agave parryi* var. *huachucensis*, los protocolos para la embriogénesis somática generados en el presente estudio permiten la generación de plantas en número suficiente para que ambas especies puedan ser aprovechadas sin poner en riesgo a sus poblaciones silvestres.



## REFERENCIAS

- Aguirre-Dugua X. and L. E. Eguiarte (2013) Genetic diversity, conservation and sustainable use of wild *Agave cupreata* and *Agave potatorum* extracted for mezcal production in México. *Journal of Arid Environments*, 90:36-44. <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2012.10.018>
- Alfaro-Rojas G., Legaria-Solano J. P. y J. E. Rodríguez-Pérez (2007) Diversidad genética en poblaciones de agaves pulqueros (*Agave* spp.) del nororiente del Estado de México. *Revista Fitotecnica Mexicana*, 30(1):1-12. <https://doi.org/10.35196/rfm.2007.1.1>
- Alharby H. F., Metwali E. M. R., Fuller M. P. and A. Y. Aldhebiani (2016) Impact of application of zinc oxide nanoparticles on callus induction, plant regeneration, element content and antioxidant enzyme activity in tomato (*Solanum lycopersicum* Mill.) under salt stress. *Archives of Biological Sciences*, 68(4):723-35. DOI: 10.2298/ABS151105017A
- Álvarez-Aragón C., Arzate-Fernández A., Martínez-Martínez S. e I. Martínez-Velasco (2020) Regeneración de plantas de *Agave marmorata* Roehl vía embriogénesis somática. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 23:36-49. <http://hdl.handle.net/20.500.11799/109495>
- Álvarez-Ríos G. D., Pacheco-Torres F., Figueredo-Urbina C. J. and A. Casas (2020) Management, morphological and genetic diversity of domesticated agaves in Michoacán, México. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 16:3. <https://doi-org.dibpxy.uaa.mx/10.1186/s13002-020-0353-9>
- Andrijany V. S., Indrayanto G. and L. A. Soehono (1998) Simultaneous effect of calcium, magnesium, copper and cobalt ions on saponin steroids content in callus cultures of *Agave amaniensis*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 55:103-108. <https://doi.org/10.1023/A:1006119600153>
- Ángeles-Espino A., Valencia-Botín A. J., Virgen-Calleros G., Ramírez-Serrano C., Paredes-Gutiérrez L. y S. Hurtado-De la Peña (2013) Determinación de la dosis letal (DL<sub>50</sub>) con Co<sup>60</sup> en vitroplántulas de *Agave tequilana* var. Azul. *Revista Fitotecnica Mexicana*, 36(4):381-386. <https://doi.org/10.35196/rfm.2013.4.381>
- APG III (2009) An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 161:105-121. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2009.00996.x>
- APG IV (2016) An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 181:1-20. <https://doi.org/10.1111/boj.12385>

- Aragón C. F. (2014) Evolución de las estrategias vitales en plantas: desde Cole hasta la actual ecología de especies invasoras. *Ecosistemas*, 23(3):6-12. Doi: 10.7818/ECOS.2014.23-3.02
- Arakaki M., Christin P. A., Nyffeler R., Lendel A., Eggli U., Ogburn R. M., Spriggs E., Moore M. J. and E. J. Edwards (2011) Contemporaneous and recent radiations of the world's major succulent plant lineages. *Proceeding of the National Academy of Science*, 108(20):8379-8384. <https://doi.org/10.1073/pnas.1100628108>
- Arizaga S., Ezcurra E., Peters E., Ramirez de Arellano F. and E. Vega (2000) Pollination ecology of *Agave macroacantha* (Agavaceae) in a mexican tropical desert. II. The role of pollinators. *American Journal of Botany*, 87(7):1011-1017. <https://doi.org/10.2307/2657000>
- Arzate-Fernández A. M. y R. Mejía-Franco (2011) Capacidad embriogénica de callos inducidos en ejes embrionarios cigóticos de *Agave angustifolia* Haw. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 34(2):101-106. <https://doi.org/10.35196/rfm.2011.2.101>
- Arzate-Fernández A. M., Piña-Escutia J. L., Norman-Mondragón T. H., Reyes-Díaz J. I., Guevara-Suárez K. L. and L. M. Vázquez-García (2016) Regeneración de agave mezcalero (*Agave angustifolia* HAW.) a partir de embriones somáticos encapsulados. *Revista fitotecnia mexicana*, 39(4):359-366. DOI:10.35196/rfm.2016.4.359-366
- Atak C. and Ö. Celik (2009) Micropropagation of *Anthurium andraeanum* from leaf explants. *Pakistan Journal of Botany*, 41(3):1155-1161.
- Azofeifa-Delgado Á. (2006) Uso de marcadores moleculares en plantas: aplicaciones en frutales del trópico. *Agronomía Mesoamericana*, 17(2):221-242. DOI:10.15517/am.v17i2.5163
- Baek S., Ho T., Lee H., Jung G., Eun-Kim Y., Jeong C. and S. Park (2020) Enhanced biosynthesis of triterpenoids in *Centella asiatica* hairy root culture by precursor feeding and elicitation. *Plant Biotechnology Reports*, 14:45–53. <https://doi.org/10.1007/s11816-019-00573-w>
- Bahre C. J. and D. E. Bradbury (1980) Manufacture of Mescal in Sonora, México. *Economic Botany*, 34(4):391-400. <https://doi.org/10.1007/BF02858316>
- Barraza-Morales A., Sánchez-Teyer F. L., Robert M., Esqueda M. y A. Gardea (2006) Variabilidad genética en *Agave angustifolia* Haw. de la Sierra Sonorense, México, determinada con marcadores AFLP. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 29(1):1-8.
- Benderradji L., Brini F., Kellou K., Ykhlef N., Djekoun A., Masmoudi K. and H. Bouzerzour (2012) Callus induction, proliferation, and plantlets regeneration of two bread wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes under saline and heat stress conditions. *International Scholarly Research Network Agronomy*, 1-8. DOI:10.5402/2012/367851

- Binh T. L., Muoi L. T., Oanh H. T. K., Thang T. D. and D. T. Phong (1990) Rapid propagation of agave by *in vitro* tissue culture. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 23:67-70. <https://doi.org/10.1007/BF00116091>
- Biswas M. K., Dutt M., Roy U. K., Islam R. and M. Hossain (2009) Development and evaluation of *in vitro* somaclonal variation in strawberry for improved horticultural traits. *Scientia Horticulturae*, 122:409-416. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2009.06.002>
- Bogler D. J., Pires J. C. and J. Francisco-Ortega (2006) Phylogeny of Agavaceae based on ndhF, rbcL, and its sequences. *Aliso: A Journal of Systematic and Evolutionary Botany*, 22(1):313-328. DOI:10.5642/aliso.20062201.26
- Cancino-García V. J., Ramírez-Prado J. H. and C. De-la-Peña (2020) Auxin perception in *Agave* is dependent on the species' auxin response factors. *Scientific Reports*, 10:3860. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60865-y>
- Carneiro F. S., Domingos-Queiroz S. R. O., Rodrigues-Passos A., Neves-do-Nascimento M. e K. Souza-dos-Santos (2014) Embriogênese somática em *Agave sisalana* perrine: indução, caracterização anatômica e regeneração. *Pesquisa Agropecuária Tropical Goiânia*, 44:294-303. <https://doi.org/10.1590/S1983-40632014000300005>
- Carnahan S. D., Van Devender T. R., Reina-Guerrero A. L., Anderson J. L., Sánchez-Escalante J. J. and G. Molina-Padilla (2018) Preliminary flora and vegetation of the sierra La Elenita-La Mariquita sky island complex, Sonora, México. *The Plant Press The Arizona Native Plant Society*, 41(2):6-13.
- Castillo Q. D., Villarreal Q. J. A. y A. Cano P. (2006) Identificación taxonómica de las especies del género *Agave* bajo cultivo en el sureste de Coahuila. INIFAP-CIRNE. Campo Experimental Saltillo. Coahuila, México. *Folleto Técnico*, número 26:34 p.
- Cervantes-Ramírez M. C. (2002) Plantas de importancia económica de las zonas áridas y semiáridas de México. Temas selectos de geografía de México. I. Textos monográficos: 5. Economía. DR © Instituto de Geografía, UNAM, México, 155pp.
- Chaâbani G., Tabart J., Kevers C., Dommes J., Khan M. I., Zaoui S., Chebchoub L., Lachaâl and N. Karray-Bouraoi (2015) Effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid combined to 6-Benzylaminopurine on callus induction, total phenolic and ascorbic acid production, and antioxidant activities in leaf tissue cultures of *Crataegus azarolus* L. var. aronia. *Acta Physiologiae Plantarum*, 37:16. <https://doi.org/10.1007/s11738-014-1769-4>

- Chandra K. and A. Pandey (2017) Apomixis: A boon to plant breeding. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(12):2619-2626. DOI: <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.612.303>
- Chávez-Ortiz L. I., Morales-Domínguez J. F., Rodríguez-Sahagún A. y E. Pérez-Molphe-Balch (2021) *In vitro* propagation of *Agave guiengola* Gentry using semisolid medium and temporary immersion bioreactors. *Phyton International Journal of Experimental Botany*, 90(3):1003-1013. <http://dx.doi.org/10.32604/phyton.2021.012862>
- Chavre B. W. (2020) Positive and negative role of biotechnology in human life: a review. *International Journal of Researches in Biosciences, Agriculture and Technology*, 8(2):107-113. DOI:10.29369/ijrbat.2020.02.i.0022
- Chen S., Chai M., Jia Y., Gao Z., Zhang L. and M. Gu (2011) *In vitro* selection of salt tolerant variants following <sup>60</sup>Co gamma irradiation of long-term callus cultures of *Zoysia matrella* [L.] Merr. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 107(3):493-500. <https://doi.org/10.1007/s11240-011-9999-2>
- Chengalrayan K., Abouzid A. and M. Gallo-Meagher (2005) *In vitro* regeneration of plants from sugarcane seed-derived callus. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 41:477-482. <https://doi.org/10.1079/IVP2005655>
- Chin C. K., Lee Z. H., Subramaniam S. and B. L. Chew (2017) Effect of Plant Growth Regulators and Melatonin on Callus Induction of White Eggplant (*Solanum melongena*). *Malaysian Applied Biology*, 46(4):131-135.
- Colunga-García M. P., Coello-Coello J., Eguiarte L. E. and D. Piñero (1999) Isozymatic variation and phylogenetic relationships between henequén (*Agave fourcroydes*) and its wild ancestor *A. angustifolia* (Agavaceae). *American Journal of Botany*, 86:115-123. <https://doi.org/10.2307/2656960>
- Colunga-García M. P., Larqué S. A., Eguiarte L. E. y D. Zizumbo-Villarreal (2007) El futuro de lo ancestral. En P. Colunga-García, L. Eguiarte, A. Larqué S. y D. Zizumbo-Villarreal (Ed.) *En lo ancestral hay futuro: del tequila, los mezcales y otros agaves*. CICY-CONACYT-CONABIO-INE, México, 395-402pp.
- Contreras-Ovalle N. I., Jáuregui-Rincón J., Santos-Díaz M. S. y E. Pérez-Molphe-Balch (2019) Efecto del medio de cultivo en la producción de betalainas en raíces transformadas de cuatro especies de cactáceas. *Agrociencia*, 53(5):681-696.

- Cortleven A., Leuendorf J. E., Frank M., Pezzetta D., Bolt S. and T. Schmölling (2019) Cytokinin action in response to abiotic and biotic stresses in plants. *Plant, cell & environment*, 42(3):998–1018. <https://doi.org/10.1111/pce.13494>
- Cuevas-Figueroa X. M. y E. P. Flores-Berrios (2006) Distancias genéticas entre *Agave tequilana* Weber var. Azul y especies y variedades afines. *Scientia-CUCBA*, 8(2):231-249.
- Das T. (1992) Micropropagation of *Agave sisalana*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 31:253-255. <https://doi.org/10.1007/BF00036233>
- Dávila M., Castillo M. A. y H. Laurentin (2007) Uso de marcadores moleculares ISSR para inferir las relaciones genéticas y la variabilidad intraespecífico en *Agave*. *Revista Facultad de Agronomía (Maracay)*, 33:93-111.
- De la Torre-Espinosa Z., De Dios E. Á., Sánchez-Teyer F. and E. Castano (2020) AteqTERT expression and specific tissue activity in a 2-year-old complete plant in *Agave tequilana* in field conditions. *Brazilian Journal of Botany*, 43:869–881. <https://doi-org.dibpxy.uaa.mx/10.1007/s40415-020-00642-3>
- Delgado-Aceves L., González-Arno M. T., Santacruz-Ruvalcaba F., Folgado R. and L. Portillo (2021) Indirect somatic embryogenesis and cryopreservation of *Agave tequilana* Weber cultivar ‘Chato’. *Plants*, 10:249. <https://doi.org/10.3390/plants10020249>
- Demey J. R., Gamez E., Molina S. and D. Infante (2004) Comparative study of the discriminating capacity of AFLP and ISTR markers for genetic analysis of *Agave fourcroydes*. *Plant Molecular Biology Report*, 22, 29–35. <https://doi.org/10.1007/BF02773346>
- Díaz-Martínez M., Nava-Cedillo A., Guzmán-López J. A., Escobar-Guzmán R. and J. Simpson (2012) Polymorphism and methylation patterns in *Agave tequilana* Weber var. ‘Azul’ plants propagated asexually by three different methods. *Plant Science*, 185–186:321-330. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2012.01.004>
- Domínguez-Rosales M. S., Alpuche-Solís A. G., Vasco-Méndez N. L. y E. Pérez-Molphe-Balch (2008-a) Efecto de citocininas en la propagación *in vitro* de agaves mexicanos. *Revista Fitotecnica Mexicana*, 31(4):317-322. <https://doi.org/10.35196/rfm.2008.4.317>
- Domínguez-Rosales M. S., González-Jiménez M. L. Rosales-Gómez C., Quiñones-Valles C., Delgadillo-Díaz de León S., Mireles-Ordaz J. y E. Pérez-Molphe-Balch (2008-b) El cultivo *in vitro* como herramienta para el aprovechamiento, mejoramiento y conservación de especies del género *Agave*. *Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes*, 41:53-62.

- Dubrovna O. V. and A. V. Bovol (2011) Variability of the Wheat Genome during *In Vitro* Culture. *Cytology and Genetics*, 45(5): 333-340. <https://doi.org/10.3103/S0095452711050033>
- Duncan D. R., Kriz A. L., Paiva R. and J. M. Widholm (2003) Globulin-1 gene expression in regenerable *Zea mays* (maize) callus. *Plant Cell Report*, 21:684-689. DOI: 10.1007/s00299-002-0568-3
- Efferth T. (2019) Biotechnology applications of plant callus cultures. *Engineering*, 5:50-59. <https://doi.org/10.1016/j.eng.2018.11.006>
- Eguiarte L. E., Souza V. y A. Silva-Montellano (2000) Evolución de la familia Agavaceae: Filogenia, biología reproductiva y genética de poblaciones. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 66:131-151. DOI:10.17129/botsoci.1618
- Enríquez del Valle J. R., Carrillo-Castañeda G. y J. L. Rodríguez de la O. (2005) Sales inorgánicas y ácido indolbutírico en el enraizado *in vitro* de brotes de *Agave angustifolia*. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 28:175-178. DOI:10.35196/rfm.2005.2.175
- Escalante A., D. R. López-Soto, J. E. Velázquez-Gutiérrez, M. Giles-Gómez, F. Bolívar and A. López-Munguía (2016) Pulque, a Traditional Mexican Alcoholic Fermented Beverage: Historical, Microbiological, and Technical Aspects. *Frontiers in Microbiology*, 7:1026. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01026
- Fehér A. (2019) Callus, dedifferentiation, totipotency, somatic embryogenesis: What these terms mean in the era of molecular plant biology? *Frontiers in Plant Science*, 10:536 <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00536>
- Félix-Valdez L. I., Vargas-Ponce O., Cabrera-Toledo D., Casas A., Cibrian-Jaramillo A. and L. De la Cruz-Larios (2016) Effects of traditional management for mescal production on the diversity and genetic structure of *Agave potatorum* (Asparagaceae) in central Mexico. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 63:1255–1271. <https://doi-org.dibpxy.uaa.mx/10.1007/s10722-015-0315-6>
- Ferraiuolo M., Pulito C., Finch-Edmondson M., Korita E., Maidecchi A., Donzelli S., Muti P., Serra M., Sudol M., Strano S. and G. Blandino (2018) *Agave* negatively regulates YAP and TAZ transcriptionally and post-translationally in osteosarcoma cell lines. *Cancer Letters*, 433:18-32. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2018.06.021>
- Figueredo U. C. J., Casas A., Martínez-Díaz Y., Santos-Zea L. and Y. A. Gutiérrez-Urbe (2018) Domestication and saponins contents in a gradient management intensity of agaves: *Agave cupreata*, *A. inaequidens* and *A. hookeri* in central México. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 65:1133-1146. <https://doi.org/10.1007/s10722-017-0601-6>

- Flores-Benítez S., Jiménez-Bremont J. F., Rosales-Mendoza S., Argüello-Astorga G. R., Castillo-Collazo R. and A. G. Alpuche-Solís (2007) Genetic transformation of *Agave salmiana* by *Agrobacterium tumefaciens* and particle bombardment. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 91:215–224. <https://doi.org/10.1007/s11240-007-9287-3>
- Flores-Gómez C. A., Escamilla-Silva E. M., Zhong C., Dale, Costa-Sousa L. and V. Balan (2018) Conversion of lignocellulosic agave residues into liquid biofuels using an AFEX™ –based biorefinery. *Biotechnology for Biofuels*, 11(7):1-18. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0995-6>
- García C., Furtado de Almeida A., Costa M., Britto D., Valle R., Royaert S. and J. P. Marelli (2019) Abnormalities in somatic embryogenesis caused by 2,4-D: an overview. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 137:193–212. <https://doi.org/10.1007/s11240-019-01569-8>
- García-Mendoza A. J. (2011) Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Agavaceae. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, México D. F. *Facículo* 88:1-95.
- García-Mendoza A. y R. Galván (2001) Riqueza de las familias Agavaceae y Nolinaceae en México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, (56):7-24. DOI:10.17129/botsci.1461
- García-Mendoza A. J., Franco-Martínez I. S. y D. Sandoval-Gutiérrez (2019) Cuatro especies nuevas de *Agave* (Asparagaceae, Agavoideae) del sur de México. *Acta Botanica Mexicana*, 126:e1461. DOI: 10.21829/abm126.2019.1461
- García S. M. D. y H. Serrano (2014) El uso del vocablo *Agave* no puede ser utilizado para uso exclusivo de algunos productores. *TecnoAgro® Avances Tecnológicos y Agrícolas*, número 90. Revista en línea [www.tecnoagro.com.mx](http://www.tecnoagro.com.mx)
- Gemmill C.E.C. and E. R. P. Grierson (2021) Inter-Simple Sequence Repeats (ISSR), Microsatellite-Primed Genomic Profiling Using Universal Primers. In: Besse P. (eds) *Molecular Plant Taxonomy*. Methods in Molecular Biology, 2222:249-262. Humana, New York, NY. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0997-2\\_14](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0997-2_14)
- Gentry H. S. (1972) The Agave family in Sonora. *Agriculture Handbook* No. 399. Plant Science Research Division, Agricultural Reserch Service, United States Department of Agriculture, Washington, D. C.
- Gentry H. S. (1982) Agaves of Continental North America. *The University of Arizona Press*. Tucson, Arizona 670 p.
- George E. F., M. A. Hall and GJ. D. Klerk (2008) Plant Tissue Culture Procedure – Background. In: Plant Propagation by Tissue Culture. E. F. George, M. A. Hall and GJ. D. Klerk (eds) 3rd Edition, Springer, Dordrecht 7:1-28. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5005-3\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5005-3_1)

- Gil-Vega K., González-Chavira M., Martínez de la Vega O., Simpson J. and G. Vandemark (2001) Analysis of genetic diversity in *Agave tequilana* var. Azul using RAPD markers. *Euphytica*, 119:335–341. <https://doi.org/10.1023/A:1017553107303>
- Gil-Vega K., Díaz C., Nava-Cedillo A. and J. Simpson (2006) AFLP analysis of *Agave tequilana* varieties. *Plant Science*, 170(4):904-909. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2005.12.014>
- Gil-Vega K. C., Díaz-Quezada C. E., Nava-Cedillo A., García-Mendoza A. y J. Simpson (2007) Análisis AFLP del género *Agave* refleja la clasificación taxonómica basada en caracteres morfológicos y otros métodos moleculares. En P. Colunga-García Marín, L. Eguiarte, A. Larqué S. y D. Zizumbo-Villarreal (Ed.) *En lo ancestral hay futuro: del tequila, los mezcales y otros agaves*. CICY-CONACYT-CONABIO-INE. México, 23-39pp.
- Golubov J., Mandujano M. C., Arizaga S., Martínez-Palacios A. y P. Koleff (2007) Inventarios y Conservación de Agavaceae y Nolinaceae. En P. Colunga-García Marín, L. Eguiarte, A. Larqué S. y D. Zizumbo-Villarreal (Ed.) *En lo ancestral hay futuro: del tequila, los mezcales y otros agaves*. CICY-CONACYT-CONABIO-INE. México, 133-152p.
- Gómez-Ruíz E. P. and T. E. Lacher (2019) Climate change, range shifts, and the disruption of a pollinator-plant complex. *Scientific Reports*, 9:14048. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50059-6>
- González-Elizondo M., Galván-Villanueva R. López-Enriquez I., Reséndiz-Rojas L. y M. S. González-Elizondo. *Agaves-magueyes, lechuguillas y noas del Estado de Durango y sus alrededores*. Primera edición 2009. Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Durango del Instituto Politécnico Nacional – Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Durango, México. 163pp.
- González G., Alemán S. and D. Infante (2003) Asexual genetic variability in *Agave fourcroydes* II: selection among individuals in a clonally propagated population, *Plant Science*, 165(3):595-601. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(03\)00227-9](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(03)00227-9)
- González G., Alemán S., Trujillo R., Keb M., Abreu E., Barredo F., Robert M. L., Ortiz R. y M. T. Cornides (2004) El cultivo *in vitro* como alternativa de la recuperación henequenera (*Agave fourcroydes*). *Biotechnología Aplicada*, 21(1):41-48.
- González-Oramas G., Alemán-García S., Barredo F. y M. L. Robert (2002) Embriogénesis somática en *Agave fourcroydes* Lem. *Biotechnología Vegetal*, 2:3-8.
- Good-Avila S., Souza V., Gaut B. S. and L. E. Eguiarte (2006) Timing and rate of speciation in *Agave* (Agavaceae). *Proceeding of the National Academy of Science*, 103(24):9124-9129. <https://doi.org/10.1073/pnas.0603312103>

- Granados Sánchez D (1993) Cultura y utilización del Maguey. En: Rodríguez-Zárata C. (eds.), Los Agaves de México. Universidad Autónoma de Chapingo. Texcoco. México. 252p.
- Groenewald E. G., Wessels D. C. J. and A. Koeleman (1977) Callus formation and subsequent plant regeneration from seed tissue of an *Agave* species (Agavaceae). *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 21(4):369-373. [https://doi.org/10.1016/S0044-328X\(77\)80105-0](https://doi.org/10.1016/S0044-328X(77)80105-0)
- Gross S. M., Martin J. A., Simpson J., Abraham-Juarez M. J., Wang Z. and A. Visel (2013) De novo transcriptome assembly of drought tolerant CAM plants, *Agave deserti* and *Agave tequilana*. *BMC Genomics*, 14:563. <https://doi-org.dibpxy.uaa.mx/10.1186/1471-2164-14-563>
- Guha S. and I. U. Rao (2010) Culture surface and exogenous putrescine-altered shoot growth pattern in mannitol- and cadmium chloride-pretreated callus of *Cymbidium* Via del Playa “Yvonne”. *In Vitro Cell Development Biology-Plant*, 46:491-498. <https://doi.org/10.1007/s11627-010-9322-7>
- Gunjal S. S. and N. K. Chougule (2022) Development of Eco-Friendly Composite Brake Pad Lining Material by Using Agave Fiber. *IOP Conference Series: Materials, Science and Engineering*, 1248:012103. doi:10.1088/1757-899X/1248/1/012103
- Gupta N., Jain V., Joseph M. and S. Devi (2020) A Review on Micropropagation Culture Method. *Asian Journal of Pharmaceutical Research and Development*, 8(1):86-93. <https://doi.org/https://doi.org/10.22270/ajprd.v8i1.653>
- Gupta P. K. and D. Holmstrom (2005) Double staining technology for distinguishing embryogenic cultures. In: S. M. Jain and P. K. Gupta (eds) Protocol for Somatic Embryogenesis in Woody Plants. *Forestry Sciences*, Springer, Dordrecht, 77:573-575. [https://doi.org/10.1007/1-4020-2985-3\\_45](https://doi.org/10.1007/1-4020-2985-3_45)
- Hammer Ø., Harper D. A. and P. D. Ryan (2001) PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia electronica*, 4(1):9.
- Han D. S., Niimi Y. and S. Kimura (2006) Localization of lily symptomless virus and cucumber mosaic virus in anther- and filament-derived calluses and effect of callus culture duration on virus-free bulblet production in *Lilium* x “Enchantment”. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 87:211-217. <https://doi.org/10.1007/s11240-006-9147-6>
- Hassan N. S., Shaaban L. D., Hashem E. A. and E. E. Seleem (2004) *In vitro* Selection for water stress tolerant callus line of *Helianthus annuus* L. Cv. Myak. *International Journal of Agriculture & Biology*, 6(1):13-18.
- Hazra K. S., Das S. and K. A. Das (2002) Sisal plant regeneration via organogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 70:235-240. <https://doi.org/10.1023/A:1016517617039>

- Hodgson W. C., Salywon A. M. and W. H. Doelle (2018) Hohokam Lost Crop Found: A New *Agave* (Agavaceae) Species Only Known From Large-scale pre-Columbian Agricultural Fields in Southern Arizona. *Systematic Botany*, 43(3):734-740. <https://doi.org/10.1600/036364418X697445>
- Hodgson W., Puente R. and A. Salywon (2020) *Agave parryi*. The IUCN Red List of Threatened Species 2020: e.T115689594A116354283. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2020-1.RLTS.T115689594A116354283>
- Hong S. R. and M. H. Yin. (2012) A simple and efficient protocol for cryopreservation of embryogenic calli of the medicinal plant *Anemarrhena asphodeloides* Bunge by vitrification. *Plant Cell and Tissue Organ Culture*, 109:287–296. <https://doi.org/10.1007/s11240-011-0094-5>
- Huang W. L., Lee C. H. and Y. R. Chen (2012) Levels of endogenous abscisic acid and indole-3-acetic acid influence shoot organogenesis in callus cultures of rice subjected to osmotic stress. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 108:257-263. <https://doi.org/10.1007/s11240-011-0038-0>
- Illsey-Granich C., Gómez-Alarcón T., Rivera-Méndez G., Morales Moreno M. del P., García-Bazán J., Ojeda-Sotelo A., Calzada-Rendón M. y S. Mancilla-Nava (2005) Conservación *in situ* y manejo campesino de magueyes mezcaleros. *Grupo de Estudios Ambientales A.C. Informe final SNIB-CONABIO proyecto No. V028. México D.F.*
- Indrayanto G., Rahayu L., Rahman A. and P. E. Noeraeni (1993) Effect of Calcium, Strontium, and Magnesium Ions on the Formation of Phytosteroids in Callus Cultures of *Agave amanuensis*. *Planta Medica*, 59:97-98. DOI: 10.1055/s-2006-959618
- Infante D., González G., Peraza-Echeverría L. and M. Keb-Llanes (2003) Asexual genetic variability in *Agave fourcroydes*. *Plant Science*, 164(2):223-230. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(02\)00404-1](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(02)00404-1)
- Ikeuchi M., Sugimoto K. and A. Iwase (2013) Plant Callus: Mechanisms of induction and repression. *The Plant Cell*, 25(9):3159-3173. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.116053>
- IPNI (2022). International Plant Names Index. Publicado en Internet <http://www.ipni.org>, The Royal Botanic Gardens, Kew, Harvard University Herbaria & Libraries and Australian National Botanic Gardens =4/11/2022
- Jain S. M. (2001) Tissue culture-derived variation in crop improvement. *Euphytica*, 118:153-166. <https://doi.org/10.1023/A:1004124519479>

- Jain S. M. (2010) Mutagenesis in crop improvement under the climate change. *Romanian Biotechnological Letters*, 15(2):88-106.
- Jiménez-Barron O., García-Sandoval R., Magallón S., García-Mendoza A., Nieto-Sotelo J., Aguirre-Planter E. and L. E. Eguiarte (2020) Phylogeny, Diversification Rate, and Divergence Time of *Agave sensu lato* (Asparagaceae), a Group of Recent Origin in the Process of Diversification. *Frontiers in plant science*, 11:536135. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.536135>
- Jimenez-Sánchez D. E., Calderón-Santoyo M., Herman-Lara E., Gaston-Peña C., Luna-Solano G. and J. A. Ragazzo-Sánchez (2020) Use of native agave fructans as stabilizers on physicochemical properties of spray-dried pineapple juice. *Drying Technology*, 38(3):293-303. DOI: 10.1080/07373937.2019.1565575
- Jones A. M., Zhou Y., Held M. A. and S. C. Davis (2020) Tissue composition of *Agave americana* L. yields greater carbohydrates from enzymatic hydrolysis than advanced bioenergy crops. *Frontiers in Plant Science*, 11:654. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00654>
- Kakimoto T. (2003) Perception and signal transduction of cytokinins. *Annual Review of Plant Biology*, 54:605-627. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.54.031902.134802>
- Karp A. (2002) The new genetic era: Will it help us in managing genetic diversity?. In *Managing Plant Genetic Diversity*. Engels J. M. M., Ramanatha Rao V., Brown A. H. D. and M. T. Jackson (eds). The International Plant Genetic Resources Institute IPGRI 43-45pp. DOI:10.1079/9780851995229.0043
- Kasahara H. (2016) Current aspects of auxin biosynthesis in plants. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 80(1):34-42. DOI: 10.1080/09168451.2015.1086259
- Keb-Llanes M., González G., Chi-Manzanero B. and D. Infante (2002) A rapid and simple method for small-scale DNA extraction in Agavaceae and other tropical plants. *Plant Molecular Biology Reporter*, 20:299a-299e. <https://doi.org/10.1007/BF02782465>
- Klopper R. R., Smith G. F., Figueiredo E. and N. Crouch (2010) Notes on *Agave palmeri* Engelm. (Agavaceae) and its allies in the Ditepalae. *Bradleya*, 28:53-66. DOI:10.25223/brad.n28.2010.a8
- Krishna H., M. Alizadeh, D. Singh, U. Singh, N. Chauhan, M. Eftekhari and R. K. Sadh (2016) Somaclonal variations and their applications in horticultural crops improvement. *3 Biotech*, 6:54. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0389-7>

- Lara-Ávila J. P. y A. G. Alpuche-Solís (2016) Análisis de la diversidad genética de agaves mezcaleros del centro de México. *Revista Fitotécnia Mexicana*, 39(3):323-330. <https://doi.org/10.35196/rfm.2016.3.323-330>
- Leal-Díaz A. M., Noriega L. G., Torre-Villalvazo I., Torres N., Alemán-Escondrillas G., López-Romero P., Sánchez-Tapia M, Aguilar-López M., Furuzawa-Carballeda J., Velázquez-Villegas L. A., Avila-Nava A., Ordaz G., Gutiérrez-Urbe J. A., Serna-Saldivar S. O. and A. R. Tovar (2016) Agumiel concentrado from *Agave salmiana* and its extracted saponins attenuated obesity and hepatic steatosis and increased *Akkermansia muciniphila* in C57BL6 mice. *Scientific Report*, 6:34242. DOI: 10.1038/srep34242
- Lev-Yadun Simcha (2017) How monocarpic is *Agave*?. *Flora*, 230:12-13. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2017.03.002>
- Li Z., Duan S., Kong J., Li S., Li Y. and Y. Zhu (2007) A single genetic locus in chromosome 1 controls conditional browning during the induction of calli from mature seeds of *Oryza sativa* ssp. Indica. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 89:237-245. <https://doi.org/10.1007/s11240-007-9248-x>
- Li C. and M. Wang (2020) Application of hairy root culture for bioactive compounds production in medicinal plants. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 22(5):592-608. DOI: 10.2174/1389201021666200516155146
- Lindsay D. L., Edwards C. E., Jung M. G., Bailey P. and R. F. Lance (2012) Novel microsatellite loci for *Agave parryi* and cross-amplification in *Agave palmeri* (Agavaceae). *American Journal of Botany*, 99:295-297. <https://doi.org/10.3732/ajb.1200033>
- Liu J. H., Nada K., Honda C., Kitashiba H., Wen X. P., Pang X.-M. and T. Moriguchi (2006) Polyamine biosynthesis of apple callus under salt stress: importance of the arginine decarboxylase pathway in stress response. *Journal of Experimental Botany*, 57(11):2589-2599. DOI: 10.1093/jxb/erl018
- Liu Y., Zhang M., Meng Z., Wang B. and M. Chen (2020) Research progress on the roles of cytokinin in plant response to stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(18):6574. doi:10.3390/ijms21186574
- Lu D., Wei W., Zhou W., McGuigan L. D., Ji F., Li X., Xing Y., Zhang Q., Fang K., Cao Q. and L. Qin (2017) Establishment of a somatic embryo regeneration system and expression analysis of somatic embryogenesis-related genes in Chinese chestnut (*Castanea mollissima* Blume). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 130:601-616. <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1250-3>

- Lu S., Wang Z., Peng X., Guo Z., Zhang G. and L. Han (2006) An efficient callus suspension culture system for triploid bermudagrass (*Cynodon transvaalensis* x *C. dactylon*) and somaclonal variations. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 87:77-84. <https://doi.org/10.1007/s11240-006-9138-7>
- Malavert C. and G. Gonzalez (2018) Efecto de la sustitución de un hidrolizado enzimático de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) como medio de cultivo para la propagación *in vitro* de Henequén (*Agave fourcroydes* Lem.) *Ceiba Journal*, 55:38-44 DOI:10.5377/ceiba.v55i1.3559
- Mancilla-Margalli N. A. and M. G. López (2006) Water-Soluble Carbohydrates and Fructan Structure Patterns from *Agave* and *Dasyliroion* Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54:7832–7839. doi: 10.1021/jf060354v
- Mandujano-Bueno A., Pons-Hernández J. L., Paredes-Melesio R. and P. García-Meza (2018) Diversidad genética de maguey (*Agave* spp.) en las sierras y llanuras del norte de Guanajuato. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 9(3):511-523. <https://doi.org/10.29312/remexca.v9i3.1212>
- Martínez-Hernández A., Mena-Espino M. E., Herrera-Estrella A. H. and P. Martínez-Hernández (2010) Construcción de bibliotecas de ADNc y análisis de expresión génica por RT-PCR en agaves. *Revista latinoamericana de química*, 38(1):21-44.
- Martínez-Palacios A., Eguiarte L. E. and G. R. Furnier (1999) Genetic diversity of the endangered endemic *Agave victoriae-reginae* (Agavaceae) in the Chihuahuan Desert. *American Journal Botanical*, 86:1093-1098. <https://doi.org/10.2307/2656971>
- Martínez-Palacios A., Ortega-Larrocea M. P., Chávez V. M. and R. Bye (2003) Somatic embriogénesis and organogenesis of *Agave victoriae-reginae*: Consideration for its Conservation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 74:135-142. <https://doi.org/10.1023/A:1023933123131>
- Matsubayashi Y. and Y. Sakagami (2006) Peptide Hormones in Plants. *Annual Review of Plant Biology*, 57: 649-674. DOI: 10.1146/annurev.arplant.56.032604.144204
- Miguel-Luna M. E., Enríquez-del-Valle J. R., Velasco-Velasco V. A., Villegas-Aparicio Y. y J. C. Carrillo-Rodríguez (2014) Concentración de benciladenina, tipo y dosis de carbohidratos en el medio de cultivo para proliferación de brotes de *Agave americana*. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Cuyo Mendoza, Argentina*, 46(1):97-107.
- Minitab 17 Statistical Software (2010) [Computer software]. State College, PA: Minitab, Inc. ([www.minitab.com](http://www.minitab.com))

- Minnis P. E. and E. S. Plog (1976) A Study of the Site Specific Distribution of *Agave parryi* in East Central Arizona. *KIVA*, 41(3-4):299-308. DOI: 10.1080/00231940.1976.11757854
- Monja-Mio K. and M. Robert (2013) Direct somatic embryogenesis of *Agave fourcroydes* Lem. through thin cell layer culture. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*, 49:541-549. DOI: 10.1007/s11627-013-9535-7
- Monja-Mio K. M. and M. L. Robert (2016) Somatic embryogenesis in *Agave*: An overview. In V. M. Loyola-Vargas and N. Ochoa-Alejo (eds.) *Somatic embryogenesis: Fundamental Aspects and Applications* 283-296 pp. © Springer International Publishing Switzerland. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-33705-0\\_17](https://doi.org/10.1007/978-3-319-33705-0_17)
- Monja-Mio K. M., Quiroz-Moreno A., Herrera-Herrera G., Montero-Muñoz J. L., Sánchez-Teyer F. and M. L. Robert (2018) Analysis of two clonal lines (embryogenic and non-embryogenic) of *Agave fourcroydes* using AFLP and MSAP. *American Journal of Plant Sciences*, 9(4):745-762. DOI: 10.4236/ajps.2018.94059
- Montero-Cortés M., Sáenz L. and I. Córdova (2010) GA<sub>3</sub> stimulates the formation and germination of somatic embryos and the expression of a *KNOTTED*-like homeobox gene of *Cocos nucifera* (L.). *Plant Cell Report*, 29:1049-1059. DOI: 10.1007/s00299-010-0890-0
- Mostafa H. H. A., Wang H., Song J. and X. Li (2020) Effects of genotypes and explants on garlic callus production and endogenous hormones. *Scientific Reports*, 10:4867. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61564-4>
- Murashige T. and F. Skoog (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, 15:473-497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Murray M. G. and W. F. Thompson (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, 8(9):4321-4325. DOI: 10.1093/nar/8.19.4321
- Muscolo A., Panuccio M. R., Sidari M. and S. Nardi (2005) The effects of humic substances on Pinus callus are reversed by 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid. *Journal of Chemical Ecology*, 31(3): 577-590. DOI: 10.1007/s10886-005-2046-1
- Nabhan G., Olmedo J. and M. Pailes (2019) The Huachuca *Agave* as “Mescal de la Mancha”: Translocation without domestication of *Agave parryi* var. *huachucensis* in the sky islands of the U.S. and México. *Desert Plants*, 35(2):25-43.
- Narváez-Suárez A. U., T. Martínez-Saldaña y M. A. Jiménez-Velázquez (2016) El cultivo del maguey pulquero: opción para el desarrollo de comunidades rurales del altiplano mexicano. *Revista de Geografía Agrícola*, 56:33-44. DOI 10.5154/r.rga.2016.56.005

- Nava-Cruz N. Y., Medina-Morales M. A., Martinez J. L., Rodriguez R. and C. N. Aguilar (2015) *Agave* biotechnology: an overview. *Critical Reviews in Biotechnology*, 35(4):546-559. DOI: 10.3109/07388551.2014.923813
- Navarro-Quezada A., González-Chauvet R., Molina-Freaner F. and L. E. Eguiarte (2003) Genetic differentiation in the *Agave deserti* (Agavaceae) complex of the Sonoran desert. *Heredity*, 90:220–227. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800216>
- Naz R, Anis M, and A. A. Alatar (2017) Embling Production in *Althaea officinalis* L., Through Somatic Embryogenesis and Their Appraisal via Histological and Scanning Electron Microscopical Studies. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 182(3):1182-1197. doi: 10.1007/s12010-016-2391-2.
- Ng W. L. and S. G. Tan (2015) Inter-simple sequence repeat (ISSR) markers: Are we doing it right?. *ASM Science Journal*, 9(1):30-39.
- Nishimura A., Ashikari M., Lin S., Takashi T., Angeles E. R., Yamamoto T. and M. Matsuoka (2005) Isolation of a rice regeneration quantitative trait loci gene and its application to transformation systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(33):11940-11944. doi: 10.1073/pnas.0504220102
- Nikam T. (1997) High frequency shoot regeneration in *Agave sisalana*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 51:225–228. <https://doi-org.dibpxy.uaa.mx/10.1023/A:1005976304198>
- Nikam T. D., Bansude M. G. and C. K. A. Kumar (2003) Somatic embryogenesis in sisal (*Agave sisalana* Perr. Ex Engelm). *Plant Cell Report*, 22:188-194. DOI: 10.1007/s00299-003-0675-9
- Nobel P. S. (2003) Environmental biology of agaves and cacti. Cambridge University Press. 275pp.
- Nolan K. E. and R. J. Rose (2010) Plant regeneration – somatic embryogenesis. In M. R. Davey and P. Anthony (Ed.) *Plant Cell Culture. Essential Methods*. (pp. 39-59) Chichester, UK: John Wiley & Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470686522.ch3>
- NOM-059-SEMARNAT-2010. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación. Segunda Sección 30 diciembre 2010 (pp. 1-78). [http://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5420810&fecha=21/12/2015](http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5420810&fecha=21/12/2015)
- Ogburn R. M. and E. J. Edwards (2012) Quantifying succulence: a rapid, physiologically meaningful metric of plant water storage. *Plant Cell and Environment*, 35:1533-1542. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2012.02503.x>

- Orzechowska M., Stepien K., Kaminska T. and D. Siwinska (2013) Chromosome variations in regenerants of *Arabidopsis thaliana* derived from 2- and 6-week-old callus detected using flow cytometry and FISH analyses. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 112:263-273. <https://doi.org/10.1007/s11240-012-0232-8>
- Oseni O. M., Pande V. and T. K. Nailwal (2018) A review on plant tissue culture, a technique for propagation and conservation of endangered plant species. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 7(7):3778-3786. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.707.438>
- Parker K. C., Trapnell D. W., Hamrick J. L., Hodgson W. C. and A. J. Parker (2010) Inferring ancient *Agave* cultivation practices from contemporary genetic patterns. *Molecular Ecology*, 19:1622-1637. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2010.04593.x
- Parker K. C., Trapnell D. W., Hamrick J. L. and W. C. Hodgson (2014) Genetic and morphological contrasts between wild and anthropogenic populations of *Agave parryi* var. huachucensis in south-eastern Arizona. *Annals of botany*, 113(6):939-952. <https://doi.org/10.1093/aob/mcu016>
- Perales-Aguilar L., Santos-Díaz M. S., Gómez-Aguirre Y. A., Ramos-Gómez M. S. y E. Pérez-Molphe-Balch (2020) Análisis *in vitro* de la acumulación de metales pesados en plantas de la familia Asparagaceae tolerantes a la baja disponibilidad de agua. *Nova scientia*, 12(24). <https://doi.org/10.21640/ns.v12i24.2081>
- Pérez-López A. V. and J. Simpson (2020) The Sweet Taste of Adapting to the Desert: Fructan Metabolism in *Agave* Species. *Frontiers in Plant Science* 11:324. doi: 10.3389/fpls.2020.00324
- Pérez-Molphe-Balch E., Esparza-Araiza M. J. y M. E. Pérez-Reyes (2012) Conservación *in vitro* de germoplasma de *Agave* spp. bajo condiciones de crecimiento retardado. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 35(4):279-287. <https://doi.org/10.35196/rfm.2012.4.279>
- Pérez-Molphe, E., Ramírez, R., Núñez, H. y N. Ochoa (1999) Introducción al cultivo de tejidos vegetales, UAA/Fomes. México.
- Piñero D., Caballero-Mellado, Cabrera-Toledo D., Canteros C. E., Casas A., Castañeda-Sortibrán A., et al. (2008). La diversidad genética como instrumento para la conservación y el aprovechamiento de la biodiversidad: estudios en especies mexicanas. Pp. 437-494. En: J. Soberón, G. Halffter y J. Llorente-Bousquets (eds). Conocimiento actual desde la biodiversidad, Capital Natural de México, vol. I CONABIO, D. F. México.

- Portillo L. y F. Santacruz-Ruvalcaba (2006-a) Factibilidad de uso de un nuevo sistema de inmersión temporal (orbitabion ®1) para embriogénesis somática de *Agave tequilana* Weber Cultivar Azul. *Boletín Nakari*, 17:43–48.
- Portillo L. y F. Santacruz-Ruvalcaba (2006-b) Obtención de embrioides de *Agave tequilana* Weber a partir de explantes de raíz. *Zonas Áridas*, 11–19.
- Portillo L., Santacruz-Ruvalcaba F., Gutiérrez-Mora A. and B. Rodríguez-Garay (2007) Somatic embryogenesis in *Agave tequilana* Weber cultivar azul. *In Vitro Cell Development Biology Plant*, 43:569-575. <https://doi.org/10.1007/s11627-007-9046-5>
- Powers D. E. and R. A. Backhaus (1989) In vitro propagation of *Agave arizonica* Gentry & Weber. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 16:57–60. <https://doi.org/10.1007/BF00044072>
- Prado M. J., Gonzalez M. V., Romo S. and M. T. Herrera (2007) Adventitious plant regeneration on leaf explants from adult male kiwifruit and AFLP analysis of genetic variation. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 88:1-10. <https://doi.org/10.1007/s11240-006-9116-0>
- Priyanka V. Kumar R. Dhaliwal I. and P. Kaushik (2021) Germplasm conservation: Instrumental in agricultural biodiversity—A review. *Sustainability*, 13:6743. <https://doi.org/10.3390/su13126743>
- Quero C. A. R., Enríquez Q. J. F., Morales N. C. R. y L. Miranda J. (2010) Apomixis y su importancia en la selección y mejoramiento de gramíneas forrajeras tropicales. Revisión. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 1(1):25-42.
- Ram M., Prasad K. V., Kaur C., Singh S. K., Arora A. and S. Kumar (2011) Induction of anthocyanin pigments in callus cultures of *Rosa hybrid* L. in response to sucrose and ammoniacal nitrogen levels. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 104: 171-179. <https://doi.org/10.1007/s11240-010-9814-5>
- Ramawat K. G. and M. R. Ahuja (2016) Fiber Plants: An Overview. In: *Fiber Plants: Biology, Biotechnology and Applications*. K. G. Ramawat and M. R. Ahuja (eds). Springer International Publishing Switzerland, 3-15pp. DOI: 10.1007/978-3-319-44570-0
- Ramírez-Malagón R., Borodanenko A., Pérez-Moreno L., Salas-Araiza M. D., Nuñez-Palenius H. G. and N. Ochoa-Alejo (2008) *In vitro* propagation of three *Agave* species used for liquor distillation and three for landscape. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 94:201-207. <https://doi.org/10.1007/s11240-008-9405-x>
- Ramos-Parra M., Ulín-Montejo F., Aguilar-Nieto J. A., Solís-Trápala I. L. y J. B. Fierro-Carbajal (2010) Modelación y estimación del volumen de tejido vegetal *in vitro* de *Strombocactus disciformis* basada en mediciones no intrusivas. *Universidad y Ciencia*. 26(2): 195-203.

- Reyes-Castro S., Valencia-Posadas M., Gutiérrez-Arenas D. A., De la Luz Ruiz G. M., Gutiérrez-Chávez A. J., Isidró-Pérez M. F. y H. G. Núñez-Palenius (2022) Uso del ensilado de *Agave tequilana* weber cv. azul en la alimentación de ovinos en crecimiento. *Brazilian Journal of Animal and Environmental Research*, 5(2):2137-2148. DOI: 10.34188/bjaerv5n2-053
- Reyes-Díaz J. I., Arzate-Fernández A. M., Piña-Escutia J. L. and L. M. Vázquez-García (2017) Media culture factors affecting somatic embryogenesis in *Agave angustifolia* Haw. *Industrial Crops & Products*, 108:81-85. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.06.021>
- Riviello-Cogco E., Robledo-Paz A., Gutiérrez-Espinosa M. A., Suárez-Espinosa J. y J. O. Mascorro-Gallardo (2021) Maduración y germinación de embriones somáticos de *Coffea arabica* cv. colombia. *Revista Fitotécnica Mexicana*, 44(2): 161-171. DOI: 10.35196/rfm.2021.2.161
- Robert M. L., Herrera J. L., Contreras F. and K. N. Scorer (1987) *In vitro* propagation of *Agave fourcroydes* Lem. (Henequen). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 8:37-48. <https://doi.org/10.1007/BF00040731>
- Rocha M., Good-Ávila S. V., Molina-Freaner F., Arita H. T., Castillo A., García-Mendoza A., Silva-Montellano A., Gaut B. S., Souza V. and L. E. Eguiarte (2006) Pollination biology and adaptative radiation of Agavaceae, with special emphasis on the genus *Agave*. *Aliso: A Journal of Systematic and Evolutionary Botany*, 22(1):329-344.
- Rocha M. M. G., González A. G. y X. Aguirre (2014) ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD) y regiones intermedias entre secuencias simples repetidas. *En: Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos*. A. Cornejo R., A. Serrato D., B. Rendón A., M. G. Rocha M. (comps.). Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático, Universidad Autónoma Metropolitana. México, D. F., 101-125pp.
- Rodríguez-Garay B. (2016) Somatic embryogenesis in *Agave* spp.. *In: V. M. Loyola-Vargas and N. Ochoa-Alejo. (eds) Somatic embryogenesis: Fundamental Aspects and Applications. © Springer International Publishing Switzerland, 267-282. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-33705-0\\_16](https://doi.org/10.1007/978-3-319-33705-0_16)*
- Rodríguez-Garay B., Gutiérrez-Mora A. and B. Acosta-Dueñas (1996) Somatic embryogenesis of *Agave victoria-reginae* Moore. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 46:85-87. <https://doi.org/10.1007/BF00039700>
- Rodríguez-Sahagún A., Acevedo-Hernández G., Rodríguez-Domínguez J. M. Rodríguez-Garay B., Cervantes-Martínez J. and O. A. Castellanos-Hernández (2011) Effect of light quality and

- culture medium on somatic embryogenesis of *Agave tequilana* Weber var. Azul. *Plant Cell Tissue and Organ*, 104:271–275. <https://doi.org/10.1007/s11240-010-9815-4>
- Roll C. M., Hodgson W. C. and A. M. Salywon (2021) Notes on a hybrid colony of *Agave parryi* var. *huachucensis* x *Agave palmeri* (Agavaceae) in southeastern Arizona. *Phytoneuron*, 25:1–7.
- Romanov G. A., Lomin S. N. and T. Schmülling (2018) Cytokinin signaling: from the ER or from the PM? That is the question! *New Phytologist*, 218(1):41-53. [doi.org/10.1111/nph.14991](https://doi.org/10.1111/nph.14991)
- Sáenz L., Azpeitia A., Chuc-Armendariz B., Chan J. L., Vedeil J. L., Hoher V. and C. Oropeza (2006) Morphological and histological changes during somatic embryo formation from coconut plumule explants. *In Vitro Cell Development Biology-Plant*, 42:19-25. <https://doi.org/10.1079/IVP2005728>
- SAGARPA. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (2017) Planeación Agrícola Nacional 2017-2030 *Agave* tequilero y mezcalero mexicano. Ciudad de México. [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/257066/Potencial-Agave\\_Tequilero\\_y\\_Mezcalero.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/257066/Potencial-Agave_Tequilero_y_Mezcalero.pdf)
- Sakakibara H. (2021) Cytokinin biosynthesis and transport for systemic nitrogen signaling. *The Plant Journal*, 105(2):421-430. [doi.org/10.1111/tbj.15011](https://doi.org/10.1111/tbj.15011)
- Sánchez-Chiang N. y V. M. Jiménez (2009) Técnicas moleculares para la detección de variantes somaclonales. *Agronomía Mesoamericana*, 20(1): 135-151. DOI:10.15517/am.v20i1.4989
- Sánchez-Escalante J. J., Van Devender T. R. and A. L. Reina-Guerrero (2018) Preliminary flora of the sierra la Púrica, Sonora, México. *The Plant Press The Arizona Native Plant Society*, 41(2):24-32.
- Sánchez-Islas A. V. y L. Portillo (2014) Proliferación de brotes axilares en tres especies de *Agave*: Efecto de sacarosa. *Boletín Nakari*, 25(3):47-49.
- Sánchez-Teyer F., Moreno-Salazar S., Esqueda M., Barraza A. and M. L. Robert (2009) Genetic variability of wild *Agave angustifolia* populations based on AFLP: A basic study for conservation. *Journal of Arid Environments*, 73(6–7):611-616. <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2009.01.008>
- Santacruz-Ruvalcaba F., Gutiérrez-Pulido H. and B. Rodríguez-Garay (1999) Efficient *in vitro* propagation of *Agave parrasana* Berger. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 56:163-167. DOI:10.1023/A:1006232911778
- Santacruz-Ruvalcaba F., Torres-Morán M. I. y L. Portillo (2008) Micropropagación de *Agave tequilana* Weber cv. Azul: Problemas y perspectivas. *Scientia-CUCBA*, 10(1-2):7-20.

- Santacruz-Ruvalcaba F. and L. Portillo (2009) Thin cell suspension layer as a new methodology for somatic embryogenesis in *Agave tequilana* Weber cultivar azul. *Industrial Crops and Products*, 29(2–3):609-614. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2008.12.001>
- Sena G., Wang X., Liu H. Y., Hofhuis H. and K. D. Birnbaum (2009) Organ regeneration does not require a functional stem cell niche in plants. *Nature*, 457: 1150-1153. DOI: 10.1038/nature07597
- Shibli R. A. and K. Al-Juboory (2002) Comparative responses of “Nabali” olive microshoot, callus and suspension cell cultures to salinity and water deficit. *Journal of Plant Nutrition*, 25(1):61-74. <https://doi.org/10.1081/PLN-100108780>
- Shrivastava V., Savarimuthu A., Patil M., Sarkar P., Hadole S. and S. Dasgupta (2021) Gametic embryogenesis and callogenesis in isolated microspore culture of *Jatropha curcas* L. a recalcitrant bioenergy crop. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 144:359–370. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01959-3>
- Silos-Espino H., González-Cortés N., Carrillo-López A., Guevara-Lara F., Valverde-González M. E. and O. Paredes-López (2007) Chemical composition and *in vitro* propagation of *Agave salmiana* ‘Gentry’. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 82:355-359. DOI:10.1080/14620316.2007.11512242
- Singh R., Rai M. K. and N. Kumari (2015) Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Sapindus mukorossi* Gaertn. from leaf-derived callus induced with 6-benzylaminopurine. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 177:498–510. <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1758-0>
- Song L., Ding W., Shen J., Zhang Z., Bi Y. and L. Zhang (2008) Nitric oxide mediates abscisic acid induced thermotolerance in the calluses from two ecotypes of reed under heat stress. *Plant Science*, 175:826-832. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2008.08.005>
- Sri Andrijany V., Indrayanto G. and L. Adi Soehono (1999) Simultaneous effect of calcium, magnesium, copper and cobalt ions on sapogenin steroids content in callus cultures of *Agave amaniensis*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 55:103–108. <https://doi.org/10.1023/A:1006119600153>
- Starr Greg (2012) *Agaves: Living sculptures for landscapes and containers*. Timber Press, Inc. Portland, London.
- Stevens P. F. (2001) Angiosperm Phylogeny Website. Version 14, July 2017. [www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/](http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/).

- Tejavathi D. H., Rajanna M. D., Sowmya R. and K. Gayathamma (2007) Induction of somatic embryos from cultures of *Agave vera-cruz* Mill. *In Vitro Cellular & Development Biology-Plant*, 43:423–428. <https://doi.org/10.1007/s11627-007-9088-8>
- Thiede J. (2020) *Agave* AGAVACEAE. In: Egli U., Nyffeler R. (eds) *Monocotyledons. Illustrated Handbook of Succulent Plants*. Springer, Berlin, Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-662-56486-8\\_111](https://doi.org/10.1007/978-3-662-56486-8_111)
- Torres-Morán M. I., Morales-Rivera M. M., De la Cruz-Larios L. y A. R. Villalobos-Arámbula (2006) Identificación de polimorfismo entre hijuelos y plantas micropropagadas de *Agave tequilana* y *Agave cocui* usando ISTRs. *scientia-CUCBA*, 8(2):203-206.
- Torres-Morán M. I., Escoto-Delgadillo M., Molina-Moret S., Rivera-Molina D. M., Velasco-Ramírez A. P., Infante D. and L. Portillo (2010) Assessment of genetic fidelity among *Agave tequilana* plants propagated asexually via rhizomes versus *in vitro* culture. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 103:403–409. <https://doi-org.dibpxy.uaa.mx/10.1007/s11240-010-9777-6>
- Twaij B. M., Jazar Z. H. and M. N. Hasan (2020) Trends in the use of tissue culture, applications and future aspects. *International Journal of Plant Biology*, 11(1). <https://doi.org/10.4081/pb.2020.8385>
- Us-Camas R., Castillo-Castro E., Aguilar-Espinosa M., Limones-Briones V., Rivera-Madrid R., Robert-Díaz M. L. and C. De-la-Peña (2017) Assessment of molecular and epigenetic changes in the albinism of *Agave angustifolia* Haw. *Plant Science*, (263):156-167. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2017.07.010>.
- Valenzuela-Sánchez K. K., Juárez-Hernández R. E., Cruz-Hernández A., Olalde-Portugal V., Valverde M. E. and O. Paredes-López (2006) Plant regeneration of *Agave tequilana* by indirect organogenesis. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 42:336–340. <https://doi-org.dibpxy.uaa.mx/10.1079/IVP2006788>
- Van Devender T. R., Carnahan S. D., Ferguson G. M., Makings E. and J. J. Sánchez-Escalante (2018) Preliminary flora in the madrean archipelago, Sonora, México. *The Plant Press The Arizona Native Plant Society*, 41(2):1-5.
- Vasil I. K. (2008) A history of plant biotechnology: from the cell theory of Schleiden and Schwann to biotech crops. *Plant Cell Reports*, 27:1423-1440. <https://doi.org/10.1007/s00299-008-0571-4>
- Vázquez-García J. A., Cházaro B. M. J., Hernández V. G., Vargas-Rodríguez Y. L. y M. P. Zamora T. (2007) Taxonomía del género *Agave* en el occidente de México: Una panorámica preliminar. *En: Vázquez-García J. A., Cházaro B. M. J., Hernández Vera G., Berrios E. F. Y.*

- y L. Vargas-Rodríguez (eds.) *Agaves del occidente de México*. Serie Fronteras de Biodiversidad, 3. Universidad de Guadalajara-CUCBA, México, 38-82pp.
- Vega-Ramos K. L., Gutierrez-Coronado M. A., y J. F. Gómez-Leyva (2022) Marcadores moleculares ISSR para identificación de hijuelos de agaves. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 45(1):75-81. DOI:10.35196/rfm.2022.1.75
- Villaseñor J. L. (2016) Checklist of the native vascular plants of México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 87:559-902. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rmb.2016.06.017>
- Viñas M. y V. M. Jiménez (2011) Factores que influyen en la embriogénesis somática *in vitro* de palmas (Arecaceae). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 13(2):229-242.
- Von Arnold S., Sabala I., Bozhkov P., Dyachok J. and L. Filonova (2002) Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 69:233-249. <https://doi.org/10.1023/A:1015673200621>
- Wattendorff J. and P. J. Holloway (1982) Studies on the ultrastructure and histochemistry of plant cuticles: Isolated cuticular membrane preparations of *Agave americana* L. and the effects of various extraction procedures. *Annals of Botany*, 49(6):769-804. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a086306>
- Wybouw B. and B. De Rybel (2019) Cytokinin – A developing story. *Trends in Plant Science*, 24(2):177-185. DOI: 10.1016/j.tplants.2018.10.012
- Xu J., Liu B., Liu X., Gao H. and X. Deng (2011) Carotenoids synthesized in citrus callus of different genotypes. *Acta Physiologiae Plantarum*, 33:745-753. <https://doi.org/10.1007/s11738-010-0599-2> <https://doi.org/10.1007/s11738-010-0599-2>
- Yépez L., De García E. y C. Gímenez (2001) Genotipos promisorios en *Agave cocui* Trelease: Avances metodológicos en la selección de plantas madre para la propagación *in vitro*. *Croizatia*, 2:195-217.
- Yeung E. C. (2012) The study of *in vitro* development in plants: General approaches and photography. In: Víctor M. Loyola-Vargas and Neftalí Ochoa-Alejo (eds.), © Springer Science+Business Media, LLC. *Plant Cell Culture Protocols, Methods in Molecular Biology*, 877:95-108. DOI 10.1007/978-1-61779-818-4\_8
- Yin M. H. and S. R. Hong (2010) A simple cryopreservation protocol of *Dioscorea bulbifera* L. embryogenic calli by encapsulation-vitrification. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 101: 349-358. <https://doi.org/10.1007/s11240-010-9695-7>

Zažímalová E., Křeček P., Skůpa P., Hoyerová K. and J. Petrášek (2007) Polar transport of the plant hormone auxin – the role of PIN-FORMED (PIN) proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64:1621-1637. doi: 10.1007/s00018-007-6566-4

Zhang Y., Chen X., Du Z., Zhang W., Devkota A. R., Chen Z., Chen C., Sun W. and M. Chen (2020) A proposed method for simultaneous measurement of cuticular transpiration from different leaf surfaces in *Camellia sinensis*. *Frontiers in Plant Science*, 11:420. doi: 10.3389/fpls.2020.00420



**ANEXOS**



**ANEXO A**

**Buffer de lisis para extracción de ADN en hojas de agave**

<b>Compuesto</b>	<b>10 ml</b>	<b>25 ml</b>	<b>50 ml</b>
H <sub>2</sub> O libre de nucleasas (Sigma-Aldrich®).	1.8	4.5	9.0
Tris-base (Phyto Technologies Laboratories™) 1 M a pH 8.0	1.0	2.5	5.0
EDTA sal disódica (J. T. Baker®) 0.5 M a pH 8.0	0.4	1.0	2.0
NaCl (J. T. Baker®) 5 M	2.8	7.0	14.0
CTAB (Sigma-Aldrich®) al 5%	4.0	10.0	20.0
β-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich®)	0.02	0.075	0.15

**EDTA sal disódica (J.T. Baker®) 0.5M a un pH 8.0**

Para 500ml

Agregar 93.05 g de EDTA sal disódica (J.T. Baker®) en 400ml de H<sub>2</sub>O desionizada y ajustar con Hidróxido de Sodio (J.T. Baker®) a un pH 8.0. Aforar a 500ml con H<sub>2</sub>O desionizada y esterilizar en autoclave a una temperatura de 124°C, con una presión de 1.3 kg/cm<sup>2</sup> durante 20 minutos.

**Tris-base (Phyto Technologies Laboratories™) 1M a pH 8.0**

Para 500ml

Agregar 60.57 g de Tris-base (Phyto Technologies Laboratories™) en 400ml de H<sub>2</sub>O desionizada. Aforar a 500ml con H<sub>2</sub>O desionizada y esterilizar en autoclave a una temperatura de 124°C, con una presión de 1.3 kg/cm<sup>2</sup> durante 20 minutos.

**ANEXO B**

**Buffer TAE (Tris-Acetato-EDTA) para 500 mL**

Compuesto	Concentración 50 X (mL)	Molaridad
Tris-base (Phyto Technologies Laboratories™) 2 M	350	50 mM
Ácido acético glacial (J. T. Baker®)	28.55	1 M
EDTA sal disódica (J.T. Baker®) 0.5 M pH 8.0	50	2 M
H <sub>2</sub> O desionizada	71.45	-

**EDTA sal disódica (J.T. Baker®) 0.5 M a un pH 8.0**

Para 500 mL

Agregar 93.05 g de EDTA sal disódica (J.T. Baker®) en 400 mL de H<sub>2</sub>O desionizada y ajustar con Hidróxido de Sodio (J.T. Baker®) a un pH 8.0. Aforar a 500 mL con H<sub>2</sub>O desionizada y esterilizar en autoclave a una temperatura de 124 °C, con una presión de 1.3 kg/cm<sup>2</sup> durante 20 minutos.

**Tris-base (Phyto Technologies Laboratories™) 2 M**

Para 500 mL

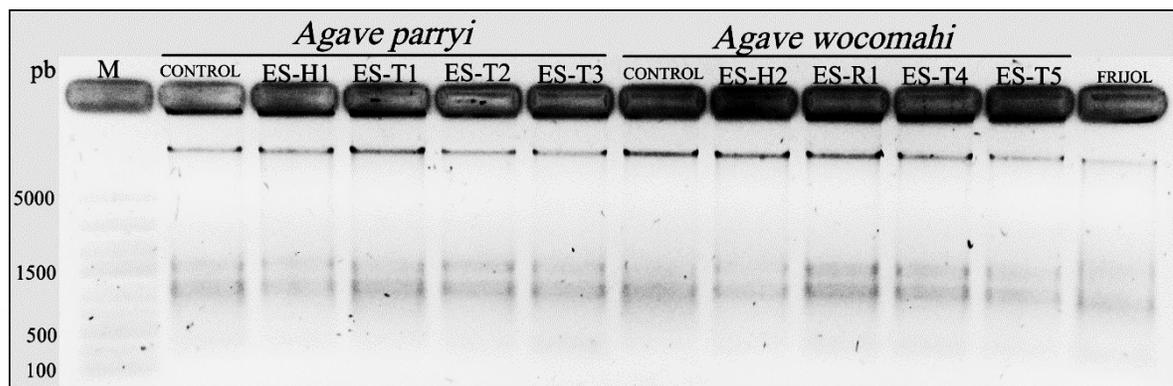
Agregar 121.14 g de Tris-base (Phyto Technologies Laboratories™) en 400 mL de H<sub>2</sub>O desionizada. Aforar a 500 mL con H<sub>2</sub>O desionizada y esterilizar en autoclave a una temperatura de 124 °C, con una presión de 1.3 kg/cm<sup>2</sup> durante 20 minutos.

**TAE 1 X**

Para 1000 mL

Agregar 20 mL de TAE 50 X en 980 mL de H<sub>2</sub>O desionizada

## ANEXO C



**Visualización de electroforesis en gel de agarosa al 1 % de ADN de hoja de *Agave parryi* var. *huachucensis* y *Agave wocomahi*.** M: Marcador de peso molecular 100-5000 pb; CONTROL: Muestra de plántula bajo condiciones *in vitro* correspondiente a la línea clonal A; ES-H1: Embrión somático (ES) obtenido mediante el uso de 1.5 mg/L de ácido indolacético (AIA) en combinación con 1.5 mg/L de benciladenina (BA) en explante de hoja y procedente de condiciones *in vitro*; ES-T1: ES obtenido mediante el uso de 4.0 mg/L de AIA en combinación con 3.0 mg/L de BA en explante de tallo y establecido bajo condiciones *ex vitro*; ES-T2: ES obtenido mediante el uso de 1.5 mg/L de ácido 2,4-diclorofenoxiacético en combinación con 3.0 mg/L de BA en explante de tallo y establecido bajo condiciones *in vitro*; ES-T3: ES obtenido mediante el uso de 1.5 mg/L de ácido 4-amino-3,5,6-tricloro-2-piridincarboxílico en combinación con 1.5 mg/L de BA en explante de tallo y establecido bajo condiciones *in vitro*; ES-H2: ES obtenido mediante el uso de 4.0 mg/L de AIA en combinación con 3.0 mg/L de BA en explante de hoja y establecido bajo condiciones *in vitro*; ES-R1: ES obtenido mediante el uso de 1.5 mg/L de AIA en combinación con 1.5 mg/L de BA en explante de raíz y establecido bajo condiciones *in vitro*; ES-T4: ES obtenido mediante el uso de 1.5 mg/L de BA en explante de tallo y establecido bajo condiciones *ex vitro*; y ES-T5: ES obtenido mediante el uso de 1.5 mg/L de AIA en combinación con 3.0 mg/L de BA en explante de tallo y establecido bajo condiciones *in vitro*.

## ANEXO D

**Análisis de varianza ANOVA unidireccional de la concentración de ADN (ng/ $\mu$ L) en muestras de embriones somáticos de *Agave parryi* var. *huachucensis* y *Agave wocomahi*.**

<b>Hipótesis nula</b> = Todas las medias son iguales					
<b>Hipótesis alterna</b> = Por lo menos una media es diferente					
<b>Nivel de significancia</b> $\alpha = 0.05$					
Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.					
<b>Factor</b> = Muestra					
<b>Niveles</b> = 11					
<b>Valores</b> = <i>A. parryi</i> (Control, ES-H1, ES-T1, ES-T2, ES-T3); <i>A. wocomahi</i> (Control, ES-H2, ES-R1, ES-T4, ES-T5) y Frijol					
Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados ajustada	Cuadrados medios ajustados	Valor F	Valor p
Muestra	10	240462	24046	4.85	0.001
Error	22	109150	4961		
Total	32	349612			
Muestra	Media	Desviación Estandar	Intervalo de confianza 95%		
<i>Agave parryi</i>	Control	260.8	123.9	( 176.5, 345.2)	
	ES-H1	353.5	20.5	( 268.2, 436.8)	
	ES-T1	206.67	5.2	(122.33, 291.00)	
	ES-T2	180.8	53.8	( 96.5, 265.2)	
	ES-T3	133.3	27.5	( 49.0, 217.7)	
<i>A. wocomahi</i>	Control	204.2	21.6	( 119.8, 288.5)	
	ES-H2	303.3	67.6	( 219.0, 387.7)	
	ES-R1	414.2	101.3	( 329.8, 498.5)	
	ES-T4	168.3	35.7	( 84.0, 252.7)	
	ES-T5	208.3	71.1	( 124.0, 292.7)	
<i>Frijol</i>	345	116.3	( 260.7, 429.3)		
<i>N</i> =3. Desviación estandar agrupada = 70.4369; $R^2 = 68.78\%$					

## ANEXO E

**Análisis de varianza ANOVA unidireccional del rendimiento de ADN (ng/mg) en muestras de embriones somáticos de *Agave parryi* var. *huachucensis* y *Agave wocomahi*.**

<b>Hipótesis nula</b> = Todas las medias son iguales					
<b>Hipótesis alterna</b> = Por lo menos una media es diferente					
<b>Nivel de significancia</b> $\alpha = 0.05$					
Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.					
<b>Factor</b> = Muestra					
<b>Niveles</b> = 11					
<b>Valores</b> = <i>A. parryi</i> (Control, ES-H1, ES-T1, ES-T2, ES-T3); <i>A. wocomahi</i> (Control, ES-H2, ES-R1, ES-T4, ES-T5) y Frijol					
Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados ajustada	Cuadrados medios ajustados	Valor F	Valor p
Muestra	10	848121	84812	6.11	0.000
Error	22	305345	13879		
Total	32	1153466			
Muestra	Media	Desviación Estandar	Intervalo de confianza 95%		
<i>Agave parryi</i>	Control	389	185	(248, 530)	
	ES-H1	526.1	30.5	(385.1, 667.2)	
	ES-T1	308.46	7.77	(167.40, 449.52)	
	ES-T2	269.9	80.2	(128.8, 411.0)	
	ES-T3	199	41.1	(57.9, 340.1)	
<i>A. wocomahi</i>	Control	304.7	32.2	(163.7, 445.8)	
	ES-H2	452.7	100.8	(311.7, 593.8)	
	ES-R1	618.2	151.1	(477.1, 759.2)	
	ES-T4	251.2	53.3	(110.2, 392.3)	
	ES-T5	310.9	106.2	(169.9, 452.0)	
<i>Frijol</i>	734	247	(593, 875)		
$N=3$ . Desviación estandar agrupada = 117.811; $R^2 = 73.53\%$					

## ANEXO F

**Análisis de varianza ANOVA unidireccional de la pureza de ADN (Relación 260/280 nm) en muestras de embriones somáticos de *Agave parryi* var. *huachucensis* y *Agave wocomahi*.**

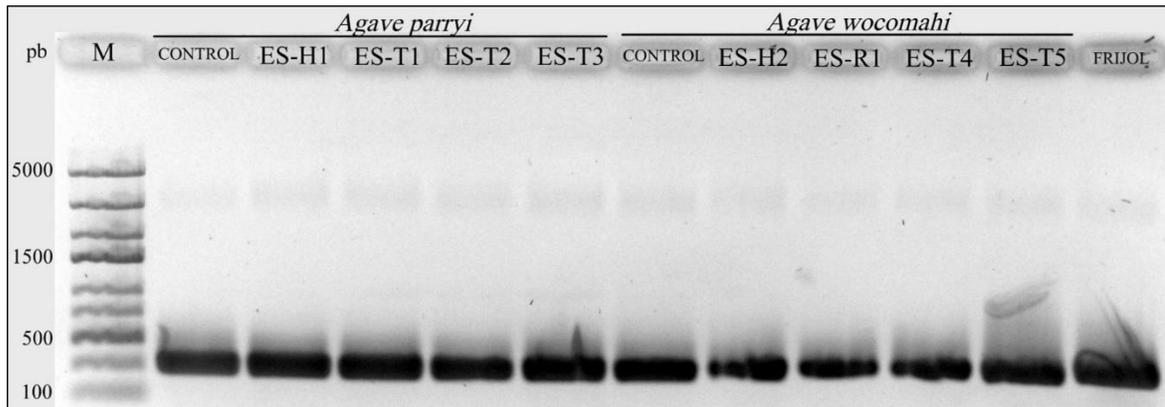
<b>Hipótesis nula</b> = Todas las medias son iguales					
<b>Hipótesis alterna</b> = Por lo menos una media es diferente					
<b>Nivel de significancia</b> $\alpha = 0.05$					
Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.					
<b>Factor</b> = Muestra					
<b>Niveles</b> = 11					
<b>Valores</b> = <i>A. parryi</i> (Control, ES-H1, ES-T1, ES-T2, ES-T3); <i>A. wocomahi</i> (Control, ES-H2, ES-R1, ES-T4, ES-T5) y Frijol					
Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados ajustada	Cuadrados medios ajustados	Valor F	Valor p
Muestra	10	0.2957	0.029571	3.12	0.012
Error	22	0.2082	0.009465		
Total	32	0.5039			
Muestra	Media	Desviación Estandar	Intervalo de confianza 95%		
<i>Agave parryi</i>	Control	1.7707	0.0978	(1.6542, 1.8872)	
	ES-H1	1.79205	0.01126	(1.67557, 1.90854)	
	ES-T1	1.7346	0.0263	(1.6181, 1.8511)	
	ES-T2	1.75182	0.00968	(1.63533, 1.86830)	
	ES-T3	1.6832	0.0366	(1.5667, 1.7996)	
<i>A. wocomahi</i>	Control	1.8189	0.1031	(1.7024, 1.9354)	
	ES-H2	1.9655	0.1274	(1.8490, 2.0819)	
	ES-R1	1.9584	0.0634	(1.8419, 2.0749)	
	ES-T4	1.8488	0.1009	(1.7323, 1.9653)	
	ES-T5	1.946	0.199	(1.829, 2.062)	
<i>Frijol</i>	1.922	0.1076	(1.8055, 2.0385)		
<i>N</i> =3. Desviación estandar agrupada = 0.972858; $R^2 = 58.68\%$					

## ANEXO G

**Análisis de varianza ANOVA unidireccional de la pureza de ADN (Relación 260/230 nm) en muestras de embriones somáticos de *Agave parryi* var. *huachucensis* y *Agave wocomahi*.**

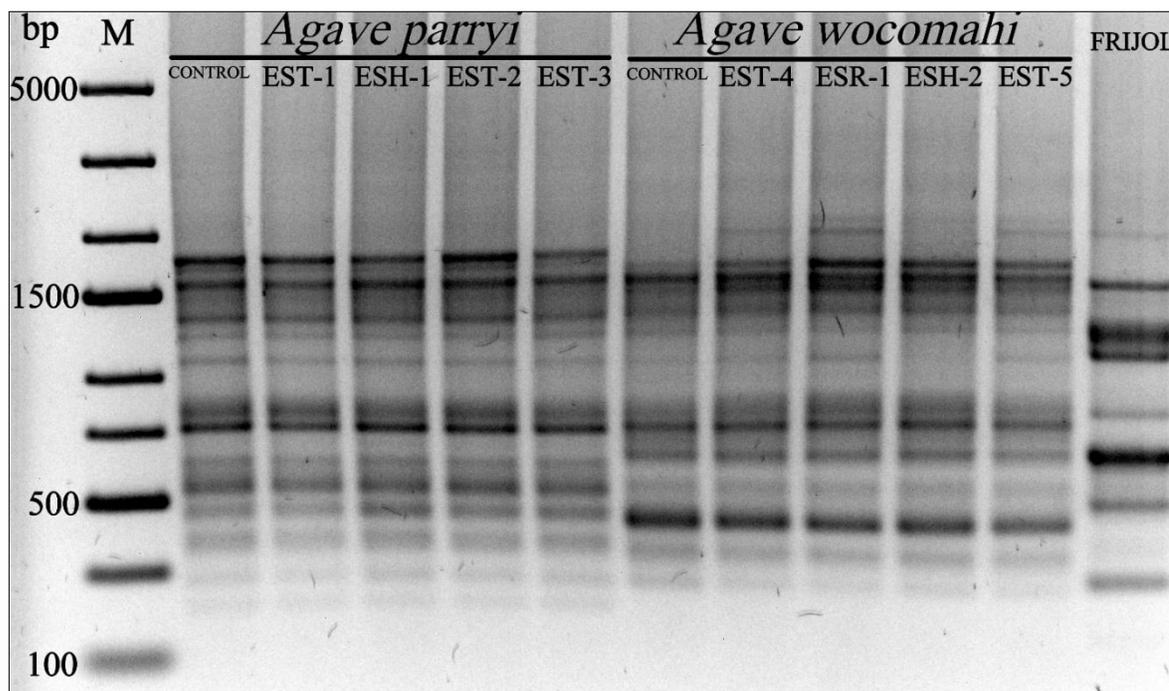
<b>Hipótesis nula</b> = Todas las medias son iguales					
<b>Hipótesis alterna</b> = Por lo menos una media es diferente					
<b>Nivel de significancia</b> $\alpha = 0.05$					
Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.					
<b>Factor</b> = Muestra					
<b>Niveles</b> = 11					
<b>Valores</b> = <i>A. parryi</i> (Control, ES-H1, ES-T1, ES-T2, ES-T3); <i>A. wocomahi</i> (Control, ES-H2, ES-R1, ES-T4, ES-T5) y Frijol					
Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados ajustada	Cuadrados medios ajustados	Valor F	Valor p
Muestra	10	13.216	1.3216	5.78	0.000
Error	22	5.032	0.2287		
Total	32	18.247			
Muestra	Media	Desviación Estandar	Intervalo de confianza 95%		
<i>Agave parryi</i>	Control	1.08	0.306	(0.507, 1.652)	
	ES-H1	1.3011	0.0515	(0.7285, 1.8737)	
	ES-T1	1.0469	0.03	(0.4743, 1.6195)	
	ES-T2	0.9897	0.1564	(0.4171, 1.5623)	
	ES-T3	0.8239	0.0818	(0.2513, 1.3965)	
<i>A. wocomahi</i>	Control	1.216	0.21	(0.644, 1.789)	
	ES-H2	2.254	0.517	(1.681, 2.826)	
	ES-R1	2.138	0.407	(1.565, 2.710)	
	ES-T4	1.0841	0.0928	(0.5115, 1.6568)	
	ES-T5	1.446	0.398	(0.873, 2.019)	
<i>Frijol</i>	1.32	1.32	(2.355, 3.500)		
$N=3$ . Desviación estandar agrupada = 0.478234; $R^2 = 72.43$					

## ANEXO H



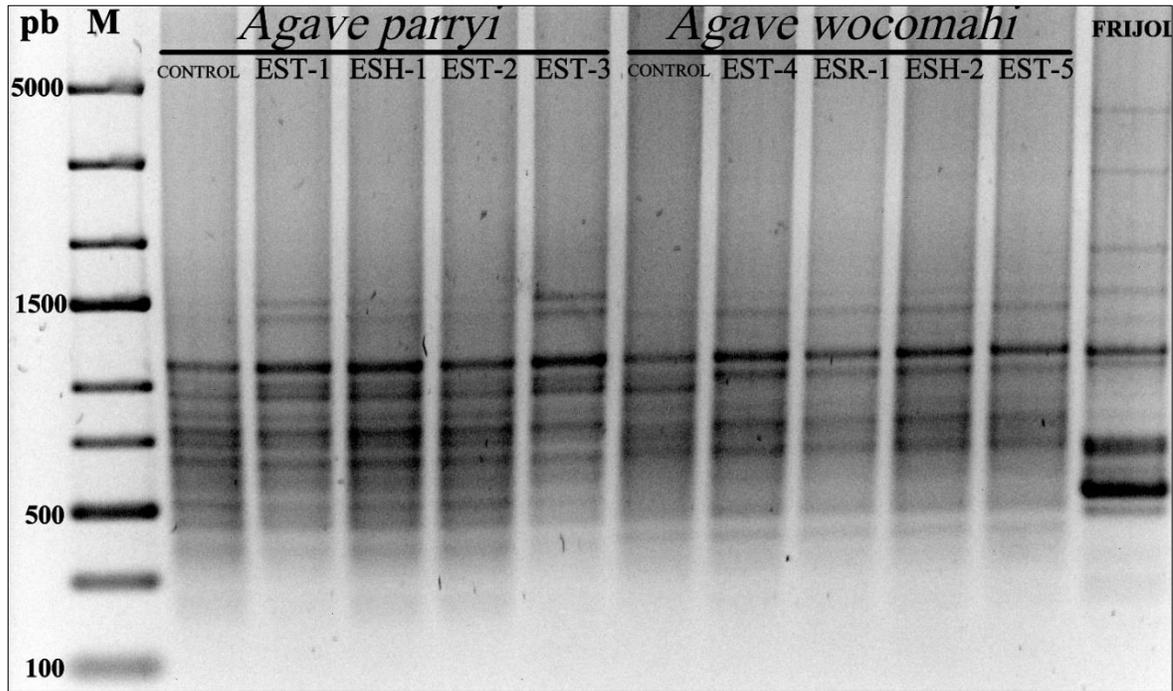
**Amplificación de un fragmento de 297 pb correspondiente a una región altamente conservada de ADN en el cloroplasto, en muestras de ADN (50 ng) de embriones somáticos de *Agave parryi* var. *huachucensis* y *Agave wocomahi*.** *M*: Marcador de peso molecular 100-5000 pb; *CONTROL*: Muestra de plántula bajo condiciones *in vitro* correspondiente a la línea clonal A; *ES-H1*: Embrión somático (ES) obtenido mediante el uso de 1.5 mg/L de ácido indolacético (AIA) en combinación con 1.5 mg/L de benciladenina (BA) en explante de hoja y procedente de condiciones *in vitro*; *ES-T1*: ES obtenido mediante el uso de 4.0 mg/L de AIA en combinación con 3.0 mg/L de BA en explante de tallo y establecido bajo condiciones *ex vitro*; *ES-T2*: ES obtenido mediante el uso de 1.5 mg/L de ácido 2,4-diclorofenoxiacético en combinación con 3.0 mg/L de BA en explante de tallo y establecido bajo condiciones *in vitro*; *ES-T3*: ES obtenido mediante el uso de 1.5 mg/L de ácido 4-amino-3,5,6-tricloro-2-piridincarboxílico en combinación con 1.5 mg/L de BA en explante de tallo y establecido bajo condiciones *in vitro*; *ES-H2*: ES obtenido mediante el uso de 4.0 mg/L de AIA en combinación con 3.0 mg/L de BA en explante de hoja y establecido bajo condiciones *in vitro*; *ES-R1*: ES obtenido mediante el uso de 1.5 mg/L de AIA en combinación con 1.5 mg/L de BA en explante de raíz y establecido bajo condiciones *in vitro*; *ES-T4*: ES obtenido mediante el uso de 1.5 mg/L de BA en explante de tallo y establecido bajo condiciones *ex vitro*; y *ES-T5*: ES obtenido mediante el uso de 1.5 mg/L de AIA en combinación con 3.0 mg/L de BA en explante de tallo y establecido bajo condiciones *in vitro*.

**ANEXO I**



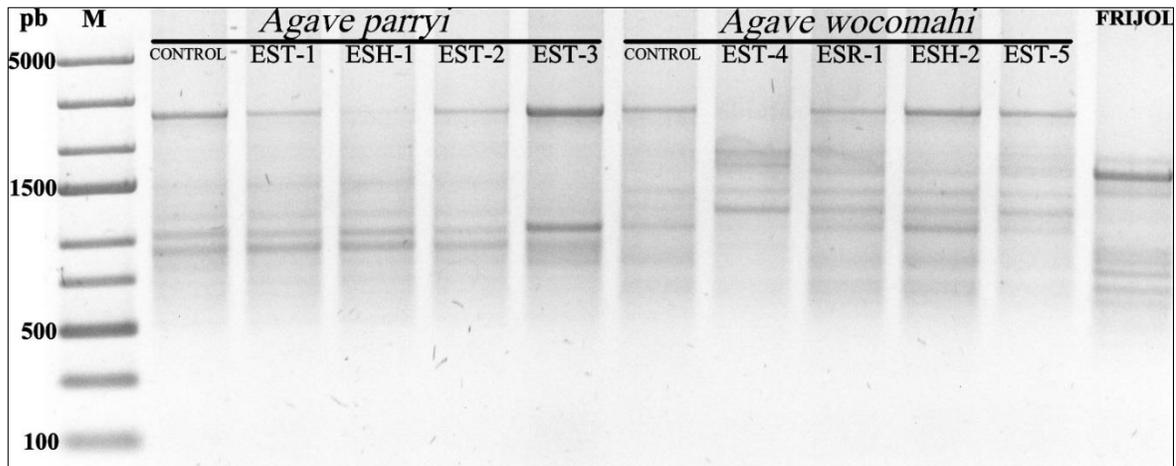
**Visualización de fragmentos amplificados por medio de técnica de PCR mediante el uso del ISSR 34 y ADN (50 ng) de embriones somáticos de *Agave parryi* var. *huachucensis* y *Agave wocomahi*; separado en gel de agarosa al 1.5 %. M:** Marcador de peso molecular 100-5000 pb; **CONTROL:** Muestra de plántula bajo condiciones *in vitro* correspondiente a la línea clonal A; **ES-T1:** ES obtenido mediante el uso de 4.0 mg/L de ácido indolacético (AIA) en combinación con 3.0 mg/L de benciladenina (BA) en explante de tallo y establecido bajo condiciones *ex vitro*; **ES-H1:** Embrión somático (ES) obtenido mediante el uso de 1.5 mg/L de AIA en combinación con 1.5 mg/L de BA en explante de hoja y procedente de condiciones *in vitro*; **ES-T2:** ES obtenido mediante el uso de 1.5 mg/L de ácido 2,4-diclorofenoxiacético en combinación con 3.0 mg/L de BA en explante de tallo y establecido bajo condiciones *in vitro*; **ES-T3:** ES obtenido mediante el uso de 1.5 mg/L de ácido 4-amino-3,5,6-tricloro-2-piridincarboxílico en combinación con 1.5 mg/L de BA en explante de tallo y establecido bajo condiciones *in vitro*; **ES-T4:** ES obtenido mediante el uso de 1.5 mg/L de BA en explante de tallo y establecido bajo condiciones *ex vitro*; **ES-R1:** ES obtenido mediante el uso de 1.5 mg/L de AIA en combinación con 1.5 mg/L de BA en explante de raíz y establecido bajo condiciones *in vitro*; **ES-H2:** ES obtenido mediante el uso de 4.0 mg/L de AIA en combinación con 3.0 mg/L de BA en explante de hoja y establecido bajo condiciones *in vitro*; y **ES-T5:** ES obtenido mediante el uso de 1.5 mg/L de AIA en combinación con 3.0 mg/L de BA en explante de tallo y establecido bajo condiciones *in vitro*.

## ANEXO J



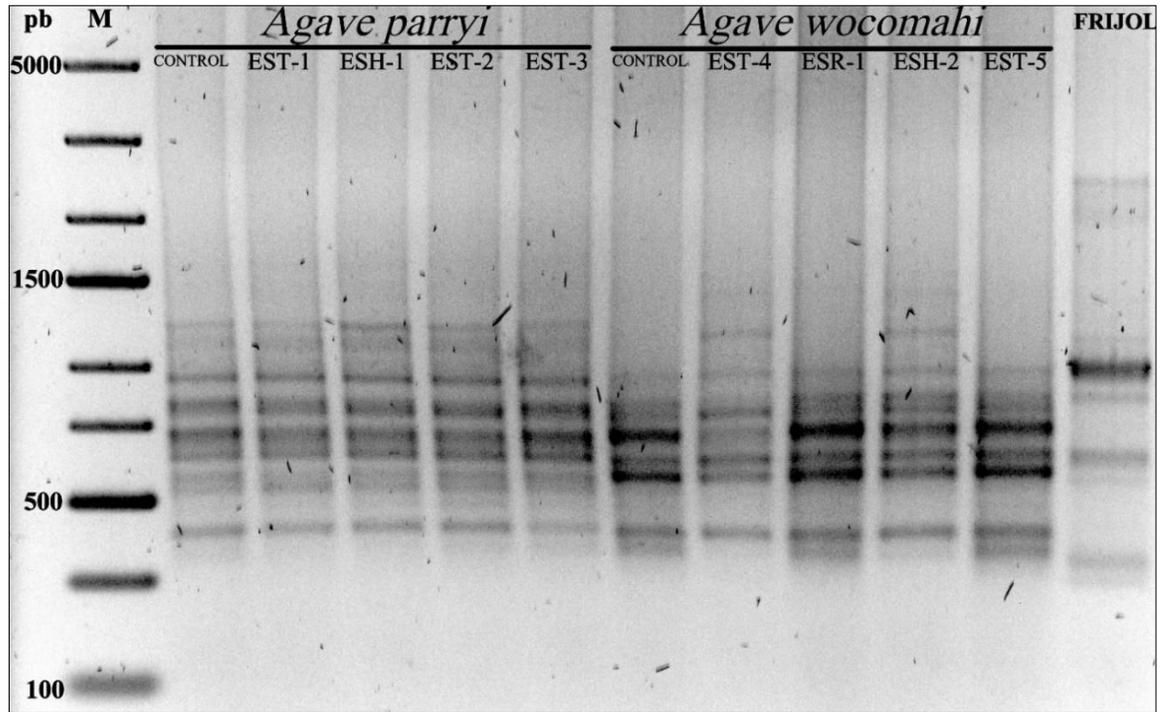
**Visualización de fragmentos amplificados por medio de técnica de PCR mediante el uso del ISSR 36 y ADN (50 ng) de embriones somáticos de *Agave parryi* var. *huachuensis* y *Agave wocomahi*; separado en gel de agarosa al 1.5 %. M:** Marcador de peso molecular 100-5000 pb; **CONTROL:** Muestra de plántula bajo condiciones *in vitro* correspondiente a la línea clonal A; **ES-T1:** ES obtenido mediante el uso de 4.0 mg/L de ácido indolacético (AIA) en combinación con 3.0 mg/L de benciladenina (BA) en explante de tallo y establecido bajo condiciones *ex vitro*; **ES-H1:** Embrión somático (ES) obtenido mediante el uso de 1.5 mg/L de AIA en combinación con 1.5 mg/L de BA en explante de hoja y procedente de condiciones *in vitro*; **ES-T2:** ES obtenido mediante el uso de 1.5 mg/L de ácido 2,4-diclorofenoxiacético en combinación con 3.0 mg/L de BA en explante de tallo y establecido bajo condiciones *in vitro*; **ES-T3:** ES obtenido mediante el uso de 1.5 mg/L de ácido 4-amino-3,5,6-tricloro-2-piridincarboxílico en combinación con 1.5 mg/L de BA en explante de tallo y establecido bajo condiciones *in vitro*; **ES-T4:** ES obtenido mediante el uso de 1.5 mg/L de BA en explante de tallo y establecido bajo condiciones *ex vitro*; **ES-R1:** ES obtenido mediante el uso de 1.5 mg/L de AIA en combinación con 1.5 mg/L de BA en explante de raíz y establecido bajo condiciones *in vitro*; **ES-H2:** ES obtenido mediante el uso de 4.0 mg/L de AIA en combinación con 3.0 mg/L de BA en explante de hoja y establecido bajo condiciones *in vitro*; y **ES-T5:** ES obtenido mediante el uso de 1.5 mg/L de AIA en combinación con 3.0 mg/L de BA en explante de tallo y establecido bajo condiciones *in vitro*.

## ANEXO K



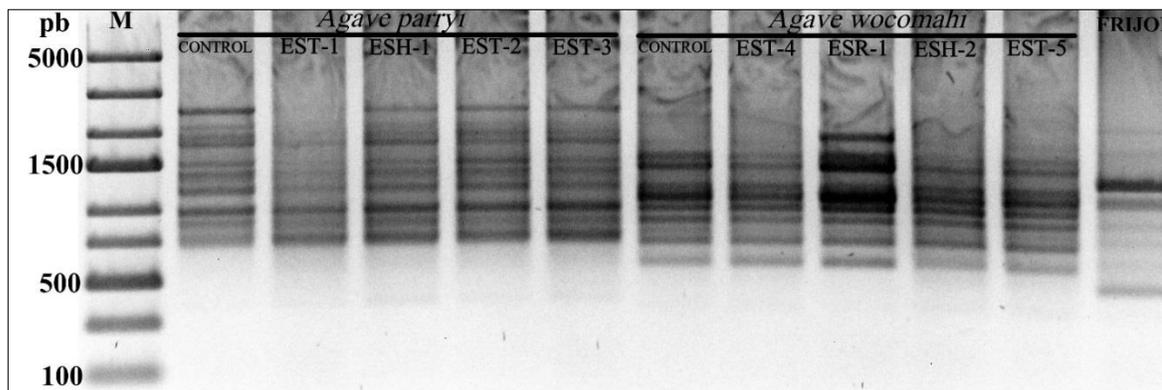
**Visualización de fragmentos amplificados por medio de técnica de PCR mediante el uso del ISSR 811 y ADN (50 ng) de embriones somáticos de *Agave parryi* var. *huachucensis* y *Agave wocomahi*; separado en gel de agarosa al 1.5 %. M:** Marcador de peso molecular 100-5000 pb; **CONTROL:** Muestra de plántula bajo condiciones *in vitro* correspondiente a la línea clonal A; **ES-T1:** ES obtenido mediante el uso de 4.0 mg/L de ácido indolacético (AIA) en combinación con 3.0 mg/L de benciladenina (BA) en explante de tallo y establecido bajo condiciones *ex vitro*; **ES-H1:** Embrión somático (ES) obtenido mediante el uso de 1.5 mg/L de AIA en combinación con 1.5 mg/L de BA en explante de hoja y procedente de condiciones *in vitro*; **ES-T2:** ES obtenido mediante el uso de 1.5 mg/L de ácido 2,4-diclorofenoxiacético en combinación con 3.0 mg/L de BA en explante de tallo y establecido bajo condiciones *in vitro*; **ES-T3:** ES obtenido mediante el uso de 1.5 mg/L de ácido 4-amino-3,5,6-tricloro-2-piridincarboxílico en combinación con 1.5 mg/L de BA en explante de tallo y establecido bajo condiciones *in vitro*; **ES-T4:** ES obtenido mediante el uso de 1.5 mg/L de BA en explante de tallo y establecido bajo condiciones *ex vitro*; **ES-R1:** ES obtenido mediante el uso de 1.5 mg/L de AIA en combinación con 1.5 mg/L de BA en explante de raíz y establecido bajo condiciones *in vitro*; **ES-H2:** ES obtenido mediante el uso de 4.0 mg/L de AIA en combinación con 3.0 mg/L de BA en explante de hoja y establecido bajo condiciones *in vitro*; y **ES-T5:** ES obtenido mediante el uso de 1.5 mg/L de AIA en combinación con 3.0 mg/L de BA en explante de tallo y establecido bajo condiciones *in vitro*.

## ANEXO L



**Visualización de fragmentos amplificados por medio de técnica de PCR mediante el uso del ISSR 845 y ADN (50 ng) de embriones somáticos de *Agave parryi* var. *huachucensis* y *Agave wocomahi*; separado en gel de agarosa al 1.5 %. *M*: Marcador de peso molecular 100-5000 pb; *CONTROL*: Muestra de plántula bajo condiciones *in vitro* correspondiente a la línea clonal A; *ES-T1*: ES obtenido mediante el uso de 4.0 mg/L de ácido indolacético (AIA) en combinación con 3.0 mg/L de benciladenina (BA) en explante de tallo y establecido bajo condiciones *ex vitro*; *ES-H1*: Embrión somático (ES) obtenido mediante el uso de 1.5 mg/L de AIA en combinación con 1.5 mg/L de BA en explante de hoja y procedente de condiciones *in vitro*; *ES-T2*: ES obtenido mediante el uso de 1.5 mg/L de ácido 2,4-diclorofenoxiacético en combinación con 3.0 mg/L de BA en explante de tallo y establecido bajo condiciones *in vitro*; *ES-T3*: ES obtenido mediante el uso de 1.5 mg/L de ácido 4-amino-3,5,6-tricloro-2-piridincarboxílico en combinación con 1.5 mg/L de BA en explante de tallo y establecido bajo condiciones *in vitro*; *ES-T4*: ES obtenido mediante el uso de 1.5 mg/L de BA en explante de tallo y establecido bajo condiciones *ex vitro*; *ES-R1*: ES obtenido mediante el uso de 1.5 mg/L de AIA en combinación con 1.5 mg/L de BA en explante de raíz y establecido bajo condiciones *in vitro*; *ES-H2*: ES obtenido mediante el uso de 4.0 mg/L de AIA en combinación con 3.0 mg/L de BA en explante de hoja y establecido bajo condiciones *in vitro*; y *ES-T5*: ES obtenido mediante el uso de 1.5 mg/L de AIA en combinación con 3.0 mg/L de BA en explante de tallo y establecido bajo condiciones *in vitro*.**

**ANEXO M**



**Visualización de fragmentos amplificados por medio de técnica de PCR mediante el uso del ISSR 853 y ADN (50 ng) de embriones somáticos de *Agave parryi* var. *huachucensis* y *Agave wocomahi*; separado en gel de agarosa al 1.5 %. M:** Marcador de peso molecular 100-5000 pb; **CONTROL:** Muestra de plántula bajo condiciones *in vitro* correspondiente a la línea clonal A; **ES-T1:** ES obtenido mediante el uso de 4.0 mg/L de ácido indolacético (AIA) en combinación con 3.0 mg/L de benciladenina (BA) en explante de tallo y establecido bajo condiciones *ex vitro*; **ES-H1:** Embrión somático (ES) obtenido mediante el uso de 1.5 mg/L de AIA en combinación con 1.5 mg/L de BA en explante de hoja y procedente de condiciones *in vitro*; **ES-T2:** ES obtenido mediante el uso de 1.5 mg/L de ácido 2,4-diclorofenoxiacético en combinación con 3.0 mg/L de BA en explante de tallo y establecido bajo condiciones *in vitro*; **ES-T3:** ES obtenido mediante el uso de 1.5 mg/L de ácido 4-amino-3,5,6-tricloro-2-piridincarboxílico en combinación con 1.5 mg/L de BA en explante de tallo y establecido bajo condiciones *in vitro*; **ES-T4:** ES obtenido mediante el uso de 1.5 mg/L de BA en explante de tallo y establecido bajo condiciones *ex vitro*; **ES-R1:** ES obtenido mediante el uso de 1.5 mg/L de AIA en combinación con 1.5 mg/L de BA en explante de raíz y establecido bajo condiciones *in vitro*; **ES-H2:** ES obtenido mediante el uso de 4.0 mg/L de AIA en combinación con 3.0 mg/L de BA en explante de hoja y establecido bajo condiciones *in vitro*; y **ES-T5:** ES obtenido mediante el uso de 1.5 mg/L de AIA en combinación con 3.0 mg/L de BA en explante de tallo y establecido bajo condiciones *in vitro*.

**ANEXO N**

**Matriz binaria de fragmentos amplificados por PCR mediante el uso de ISSR 34 y 36 en diferentes muestras de embriones somáticos de *Agave parryi* var. *huachucensis* y *Agave wocomahi*.**

Banda	Tamaño banda (pb) aproximado	<i>Agave parryi</i> var. <i>Huachucensis</i>					<i>Agave wocomahi</i>					Frijol
		Control	ES-T1	ES-H1	ES-T2	ES-T3	Control	ES-T4	ES-R1	ES-H2	ES-T5	
ISSR-34	2000	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0
	1900	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1
	1750	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
	1700	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
	1600	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
	1500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	1450	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0
	1350	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
	1250	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
	1200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	1100	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
	800	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	750	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
	670	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
	650	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
	550	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
	475	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1
	450	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0
	370	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
	350	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0
280	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
250	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	
ISSR-36	4500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	2800	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	1900	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	1500	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	1450	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
	1300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	1100	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	1000	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	900	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
	800	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	780	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
	750	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	600	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	550	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
	500	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1
	450	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	400	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	350	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0

**ANEXO Ñ**

**Matriz binaria de fragmentos amplificados por PCR mediante el uso de ISST 811, 845 y 853 en diferentes muestras de embriones somáticos de *Agave parryi* var. *huachucensis* y *Agave wocomahi*.**

Banda	Tamaño banda (pb) aproximado	<i>Agave parryi</i> var. <i>Huachucensis</i>					<i>Agave wocomahi</i>					Frijol
		Control	ES-T1	ES-H1	ES-T2	ES-T3	Control	ES-T4	ES-R1	ES-H2	ES-T5	
ISSR-811	2700	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0
	1900	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0
	1800	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
	1700	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
	1500	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
	1200	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
	1000	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0
	900	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1
	800	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1
	700	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1
600	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
ISSR-845	2500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	2000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	1450	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
	1250	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
	1200	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
	1150	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1
	900	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	850	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
	800	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0
	700	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
	650	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
	600	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	550	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
	500	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1
	490	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
	400	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
	370	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0
320	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
290	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
ISSR-853	2500	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0
	2050	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0
	1950	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1
	1750	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0
	1600	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	1500	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
	1400	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
	1300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	1250	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
	1100	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
	900	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
	850	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0
	800	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	750	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	600	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
	490	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	350	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1
300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	

ANEXO O



Germinación de semillas de *Agave potatorum* bajo diferentes tratamientos de BA y AIA.