



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES**

Centro de Ciencias Básicas

Departamento de Química

Doctorado en Ciencias Biológicas

**MICROPROPAGACIÓN DE AGAVES EMPLEANDO  
BIORREACTORES DE INMERSIÓN TEMPORAL Y EVALUACIÓN  
DE LA FIDELIDAD GENÉTICA DE LAS PLANTAS GENERADAS**

Tesis que presenta Lucía Isabel Chávez Ortiz para optar por el grado de Doctorado en Ciencias Biológicas en el Área de Biotecnología Vegetal

**Tutor:**

Dr. Eugenio Martín Pérez Molphe Balch  
Profesor-Investigador  
Universidad Autónoma de Aguascalientes

**Comité Tutoral**

Dr. José Francisco Morales Domínguez  
Profesor-Investigador  
Universidad Autónoma de Aguascalientes

Dra. Araceli Rodríguez Sahagún  
Centro Universitario de la Ciénega  
Universidad de Guadalajara

Aguascalientes, Ags., 8 de agosto de 2020



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES**

**CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS**  
Departamento de Química

**FORMATO DE CARTA DE VOTO APROBATORIO**

**M. en C. Jorge Martín Alférez Chávez**  
**Decano Del Centro de Ciencias Básicas**  
**PRESENTE**

Por medio del presente como Tutor designado de la estudiante **Lucía Isabel Chávez Ortiz**, con ID 10012, quien realizó la tesis titulada: **Micropropagación de agaves empleando biorreactores de inmersión temporal y evaluación de la fidelidad genética de las plantas generadas**, y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que ella 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 agosto de 2020.**

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

c.c.p.- Interesado  
c.c.p.- Secretaría de Investigación y Posgrado  
c.c.p.- Jefatura del Depto. de Química  
c.c.p.- Consejero Académico  
c.c.p.- Minuta Secretario Técnico



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES

FORMATO DE CARTA DE VOTO APROBATORIO

M. en C. Jorge Martín Alférez Chávez  
Decano Del Centro de Ciencias Básicas  
PRESENTE

Por medio del presente como miembro designado del Comité Tutorial de la estudiante Lucía Isabel Chávez Ortiz, con ID 10012, quien realizó la tesis titulada: Micropropagación de agaves empleando biorreactores de inmersión temporal y evaluación de la fidelidad genética de las plantas generadas, y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el VOTO APROBATORIO, para que ella 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 agosto de 2020.

Dr. José Francisco Morales Domínguez  
Asesor de Tesis

c.c.p.- Interesado  
c.c.p.- Secretaría de Investigación y Posgrado  
c.c.p.- Jefatura del Depto. de Química  
c.c.p.- Consejero Académico  
c.c.p.- Minuta Secretario Técnico



# UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE LA CIENEGA  
DIVISIÓN DE DESARROLLO BIO-TECNOLÓGICO / DEPARTAMENTO  
DE CIENCIAS BÁSICAS  
Laboratorio de Biología Molecular Vegetal

## CARTA DE VOTO APROBATORIO

**M. en C. Jorge Martín Alférez Chávez**  
**Decano Del Centro de Ciencias Básicas**  
**PRESENTE**

Por medio del presente como Tutor designado de la estudiante **Lucía Isabel Chávez Ortiz**, con ID 10012, quien realizó la tesis titulada: **Micropropagación de agaves empleando biorreactores de inmersión temporal y evaluación de la fidelidad genética de las plantas generadas**, y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que ella 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  
"PIENSA Y TRABAJA"  
Ocotlán, Jal.; 10 de agosto de 2020

**Dra. Araceli Rodríguez Sahagún**  
Profesor Investigador SNI nivel 1  
Asesora de Tesis



Centro Universitario de la Cienega  
División de Desarrollo Bio-Tecnológico  
Departamento de Ciencias Básicas  
Laboratorio de Biología Molecular Vegetal

- c.c.p.- Interesado
- c.c.p.- Secretaría de Investigación y Posgrado
- c.c.p.- Jefatura del Depto. de Química
- c.c.p.- Consejero Académico
- c.c.p.- Minuta Secretario Técnico



Centro Universitario de la Cienega  
División de Desarrollo Bio-Tecnológico  
Departamento de Ciencias Básicas  
Laboratorio de Biología Molecular Vegetal





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES

## DICTAMEN DE LIBERACIÓN ACADÉMICA PARA INICIAR LOS TRÁMITES DEL EXAMEN DE GRADO



Fecha de dictaminación dd/mm/aa: 22 oct 20

**NOMBRE:** LUCÍA CHÁVEZ ORTIZ **ID** \_\_\_\_\_

**PROGRAMA:** DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS **LGAC (del posgrado):** BIOTECNOLOGÍA Y BIOQUÍMICA VEGETAL Y ANIMAL

**TIPO DE TRABAJO:** ( ) Tesis ( ) Trabajo práctico

**TÍTULO:** MICROPROPAGACIÓN DE AGAVES EMPLEANDO BIORREACTORES DE INMERSIÓN TEMPORAL Y EVALUACIÓN DE LA FIDELIDAD GENÉTICA DE LAS PLANTAS GENERADAS

**IMPACTO SOCIAL (señalar el impacto logrado):** Preservación de plantas en peligro de extinción con posible uso comercial y para consumo de la población

**INDICAR SI/NO SEGÚN CORRESPONDA:**

*Elementos para la revisión académica del trabajo de tesis o trabajo práctico:*

- SI El trabajo es congruente con las LGAC del programa de posgrado
- SI La problemática fue abordada desde un enfoque multidisciplinario
- SI Existe coherencia, continuidad y orden lógico del tema central con cada apartado
- SI Los resultados del trabajo dan respuesta a las preguntas de investigación o a la problemática que aborda
- SI Los resultados presentados en el trabajo son de gran relevancia científica, tecnológica o profesional según el área
- SI El trabajo demuestra más de una aportación original al conocimiento de su área
- SI Las aportaciones responden a los problemas prioritarios del país
- SI Generó transferencia del conocimiento o tecnológica

*El egresado cumple con lo siguiente:*

- SI Cumple con lo señalado por el Reglamento General de Docencia
- SI Cumple con los requisitos señalados en el plan de estudios (créditos curriculares, optativos, actividades complementarias, estancia, predoctoral, etc)
- SI Cuenta con los votos aprobatorios del comité tutorial, en caso de los posgrados profesionales si tiene solo tutor podrá liberar solo el tutor
- SI Cuenta con la carta de satisfacción del Usuario
- SI Coincide con el título y objetivo registrado
- SI Tiene congruencia con cuerpos académicos
- SI Tiene el CVU del Conacyt actualizado
- SI Tiene el artículo aceptado o publicado y cumple con los requisitos institucionales (en caso que proceda)

*En caso de Tesis por artículos científicos publicados:*

- SI Aceptación o Publicación de los artículos según el nivel del programa
- SI El estudiante es el primer autor
- SI El autor de correspondencia es el Tutor del Núcleo Académico Básico
- SI En los artículos se ven reflejados los objetivos de la tesis, ya que son producto de este trabajo de investigación.
- SI Los artículos integran los capítulos de la tesis y se presentan en el idioma en que fueron publicados
- SI La aceptación o publicación de los artículos en revistas indexadas de alto impacto

Con base a estos criterios, se autoriza se continúen con los trámites de titulación y programación del examen de grado

Sí X  
No \_\_\_\_\_

**FIRMAS**

**Elaboró:**

\* NOMBRE Y FIRMA DEL CONSEJERO SEGÚN LA LGAC DE ADSCRIPCIÓN:

DR. FIDEL GUEVARA LARA

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO TÉCNICO:

DRA. ALMA LUJÁN GUERRERO BARRERA

\* En caso de conflicto de intereses, firmará un revisor miembro del NAB de la LGAC correspondiente distinto al tutor o miembro del comité tutorial, asignado por el Decano.

**Revisó:**

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO:

DRA. HAYDÉE MARTÍNEZ RUIZ ALCABA

**Autorizó:**

NOMBRE Y FIRMA DEL DECANO:

M. en C. JORGE MARTÍN ALFÉREZ CHÁVEZ

**Nota: procede el trámite para el Depto. de Apoyo al Posgrado**

En cumplimiento con el Art. 105C del Reglamento General de Docencia que a la letra señala entre las funciones del Consejo Académico: .... Cuidar la eficiencia terminal del programa de posgrado y el Art. 105F las funciones del Secretario Técnico, llevar el seguimiento de los alumnos.

## ***In Vitro* Propagation of *Agave guiengola* Gentry Using Semisolid Medium and Temporary Immersion Bioreactors**

**Lucía Isabel Chávez-Ortiz<sup>1</sup>, José Francisco Morales-Domínguez<sup>1</sup>, Araceli Rodríguez-Sahagún<sup>2</sup> and Eugenio Pérez-Molphe-Balch<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup> Departamento de Química, Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Av. Universidad 940, 20131, Aguascalientes, Ags. México

<sup>2</sup> Laboratorio de Biología Molecular Vegetal, Centro Universitario de la Ciénega, Universidad de Guadalajara, Av. Universidad 1115, 47820, Ocotlán, Jal., México

\*Corresponding Author: Eugenio Pérez-Molphe-Balch. Email: eperezmb@gmail.com

Received: XXXX; Accepted: XXXX

**Abstract:** *Agave guiengola* Gentry is an endemic plant from a very small locality in Oaxaca, Mexico. Its conservation status is fragile and can rapidly worsen. Because of its scarcity, this agave has been used solely for ornamental purposes, but it could have other uses if more plants were available. *In vitro* propagation by enhanced axillary sprouting from stem segments was attained using Murashige and Skoog Basal Medium (MS) as well as basal medium supplemented with cytokinins 6-Benzylaminopurine (BA) or 6-( $\gamma,\gamma$ -Dimethylallylamino)purine (2iP). The best treatment for shoot induction in semisolid medium consisted in MS supplemented with 2 mg l<sup>-1</sup> BA, obtaining a mean of 3.7 shoots per explant. Other interesting responses were observed, such as nodular callus induction using combinations of BA and 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D); root induction without Plant Growth Regulators (PGR); and generation of shoot clusters. These clusters constituted an excellent explant for micropropagation in temporary immersion bioreactors, obtaining a propagation rate of 43 shoots per explant with 1 min immersion and 6 h immersion frequencies. All new plants rooted and survived the transfer to soil. This study developed an *in vitro* propagation scheme to produce individuals that can be used either for reforestation, economical purposes, or to carry out studies in this species to assess its full potential, avoiding exploitation from wild plants.

**Keywords:** Agavaceae; temporary immersion systems; callus induction; micropropagation

### **1 Introduction**

The genus *Agave* is native to the American continent. It comprises 200 species, of which 150 of them are endemic to Mexico, which is its center of origin and diversification [1]. These plants are adapted to arid and semiarid environments [1], and therefore to hostile conditions, such as low water availability, intense solar radiation, and extreme temperatures. Agaves are an outstanding part of arid ecosystems, and have important relations with other organisms, especially pollinators such as bats, bees, wasps, ants, among others [1]; conferring them an undisputable ecological importance. On the other hand, agaves were used by man in many ways since ancient times, and they are currently a source of food, alcoholic beverages like



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

## AGRADECIMIENTOS

A la Benemérita Universidad Autónoma de Aguascalientes por todo el apoyo y las facilidades que me brindó para poder realizar mis estudios de doctorado, particularmente a través de los proyectos “Propagación masiva de plantas y generación de biomasa para la producción de metabolitos en biorreactores de inmersión temporal” (PIBT-16-2) y “Uso de Biorreactores de Inmersión Temporal [BITS] para la Propagación Masiva de Agaváceas de Interés en México” (PIBT18-2).

Al Fondo Mixto CONACYT-Gobierno del Estado de Aguascalientes por los recursos otorgados a través del proyecto “Aplicación de métodos biotecnológicos para la propagación y uso racional de plantas adaptadas a la baja disponibilidad de agua” (AGS-2015-02-01-267656), con los que se adquirieron los biorreactores de inmersión temporal.

Al Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Aguascalientes.

Al Dr. Eugenio Pérez Molphe Balch por compartir conmigo sus enciclopédicos conocimientos, su sabiduría y su amistad. Es un honor y un privilegio aprender de un gran investigador, y sobre todo un gran ser humano.

Al Dr. José Francisco Morales Domínguez por todo el apoyo que me brindó para la realización de esta tesis, especialmente por sus atinadas sugerencias para ampliar los alcances de este trabajo, y por hacer un espacio para asesorarme.

A la Dra. Araceli Rodríguez Sahagún por su valiosa asesoría, por recibirme en su laboratorio para realizar una parte de este trabajo, y por su disposición a ayudarme a lo largo de todo el doctorado; además de ser una excelente investigadora tiene una gran calidad humana.

A la Ing. Martha Evelia Pérez Reyes por brindarme su apoyo técnico y experiencia en toda la parte experimental en laboratorio, por tener un oído bien dispuesto para escuchar mis problemas de todo tipo, y por aconsejarme con sensatez.

Al M. en C. Alberto Isaac Reyes Silva por su invaluable apoyo técnico y por prestarme su experiencia en el establecimiento en suelo y cuidado de las plantas en el invernadero.

A M. en C. Adilene Dávila Galván y LBT Julia Victoria Nava Carmona por el apoyo en todos los experimentos realizados en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales.

A M.C. Laura María de Lourdes de la Rosa Carrillo y a M.C. Irma Adriana Castro Gallo por apoyarme en la realización de otras actividades para que yo pudiera dedicar más tiempo al doctorado.

A la Dra. Alejandra Palomeque Carlín, compañera de trabajo en el laboratorio durante las primeras etapas del proyecto, por su optimismo y su visión tan positiva y amable de la vida.

**DEDICATORIAS**

Para Isabel, Ximena y César





**INDICE GENERAL**

	Pág.
Índice General .....	1
Índice de tablas .....	3
Índice de figuras .....	4
Resumen .....	5
Abstract .....	6
Introducción.....	7
I. Antecedentes .....	9
1.1 El género <i>Agave</i> .....	9
1.1.1 Taxonomía del género <i>Agave</i> .....	9
1.1.2 Descripción general de los agaves .....	10
1.1.3 Aprovechamiento tradicional de los agaves .....	11
1.1.4 Usos potenciales de los agaves y sus productos .....	17
1.1.5 La problemática actual de los agaves .....	19
1.1.6 Especies incluidas en este proyecto .....	20
1.2. Cultivo de tejidos vegetales <i>in vitro</i> .....	22
1.2.1 Generalidades .....	22
1.2.2 Medios de cultivo .....	22
1.2.3 Reguladores de crecimiento vegetal .....	23
1.2.4 Micropropagación .....	25
1.3. Uso de marcadores moleculares para evaluar variación somaclonal .....	27
1.4. Biorreactores para el cultivo de tejidos vegetales .....	30
1.5. Antecedentes de la propagación <i>in vitro</i> de <i>Agave</i> .....	33
1.5.1 Organogénesis directa e indirecta .....	34
1.5.2 Embriogénesis somática .....	36
1.5.3 Enraizamiento .....	36
1.5.4 Micropropagación empleando biorreactores .....	37
II. Justificación .....	38
III. Hipótesis .....	39
IV. Objetivos .....	39
V. Materiales y métodos .....	40
5.1 Planteamiento experimental .....	40
5.2 Obtención de material vegetal .....	42
5.3 Embriogénesis somática .....	42
5.4 Elección de las especies con mayor capacidad de adaptación a los biorreactores y elección del tipo de explante .....	43
5.5 Condiciones del biorreactor .....	45
5.6 Factores de micropropagación: otros tratamientos .....	45
5.7 Enraizamiento y adaptación a suelo .....	46
5.7.1 Primer protocolo de adaptación a suelo: adaptación en recipientes de cultivo .....	46
5.7.2 Segundo protocolo de adaptación a suelo: adaptación fuera del recipiente de cultivo .....	46
5.8 Evaluación de la estabilidad genética de las plantas micropropagadas .....	47
5.8.1 Extracción y purificación de ADN .....	47
5.8.2 Evaluación de decanucleótidos para RAPDs .....	47
5.8.3 Evaluación de oligonucleótidos para ISSRs .....	48

5.8.4 Marcadores RAMP .....	49
VI. Resultados .....	51
6.1 Obtención de material vegetal .....	51
6.2 Elección de las especies con mayor capacidad de adaptación a los biorreactores y elección del tipo de explante .....	57
6.3 Condiciones del biorreactor .....	58
6.4 Factores de micropropagación: otros tratamientos .....	59
6.5 Enraizamiento y adaptación a suelo .....	64
6.5.1 Primer protocolo de adaptación a suelo: aclimatación en charolas.....	65
6.5.2 Segundo protocolo de adaptación a suelo: adaptación en recipientes de cultivo .....	67
6.6 Evaluación de la estabilidad genética de las plantas micropropagadas.....	71
6.6.1 Extracción y purificación de ADN.....	71
6.6.2 Evaluación de decanucleótidos para RAPDs .....	71
6.6.3 Evaluación de oligonucleótidos para ISSRs .....	71
6.6.4 Marcadores RAMPs .....	72
VII. Discusión .....	76
7.1 Respuestas morfogénicas a las combinaciones de auxinas/citocininas en medio semisólido .....	76
7.2 Elección de las especies con mayor capacidad de adaptación a los biorreactores y elección del tipo de explante .....	77
7.3 Condiciones del biorreactor y otros factores .....	78
7.4 Aclimatación y adaptación a suelo .....	80
7.5 Evaluación de la estabilidad genética de las plantas micropropagadas.....	83
VIII. Conclusiones .....	86
IX. Bibliografía .....	88

**INDICE DE TABLAS**

<b>Tabla</b>	<b>Título</b>	<b>Pág.</b>
1	Especies consideradas para el desarrollo de este proyecto .....	21
2	Características de los marcadores moleculares utilizados en estudios de biodiversidad .....	29
3	Comparación de los distintos tipos de biorreactores.....	31
4	Antecedentes en la micropropagación del género <i>Agave</i> .....	34
5	Relación de experimentos realizados con cada una de las especies incluidas en este trabajo .....	41
6	Oligonucleótidos probados para RAPDs .....	48
7	Oligonucleótidos probados para ISSR .....	49
8	Combinaciones de oligonucleótidos utilizadas para evaluar fidelidad genética .....	49
9	Respuestas morfogénicas observadas en <i>A. guiengola</i> .....	52
10	Respuestas morfogénicas observadas en <i>A. potatorum</i> .....	53
11	Promedio de brotes por explante obtenidos en biorreactores de inmersión temporal .....	57
12	Tratamientos en BITS .....	60
13	Resumen de los resultados obtenidos en el proceso de aclimatación y adaptación a suelo de las plantas de agave generadas <i>in vitro</i> .....	64
14	Bandas generadas mediante RAMPs en seis especies de <i>Agave</i> , de brotes generados en medio semisólido y en BIT con medio líquido adicionado con RCVs .....	73
15	Índices de diversidad beta global de brotes de agaves cultivados en medio semisólido sin RCVs y brotes de agaves cultivados en BITS en presencia de RCVs .....	73
16	Índices de Jaccard basados en datos RAMP de tres individuos generados en medio semisólido sin RCVs, y tres individuos cultivados en BIT empleando RCV de cada especie .....	74

**INDICE DE FIGURAS**

<b>Figura</b>	<b>Título</b>	<b>Pág.</b>
1	Esquema de biorreactores para cultivos de tejidos vegetales <i>in vitro</i> .....	32
2	Esquema del funcionamiento de los biorreactores de inmersión temporal de tipo tanques gemelos.....	44
3	Esquema del modelo BIT en serie .....	44
4	Promedio de brotes por explante generados en <i>A. gigantensis</i> , <i>A. guiengola</i> y <i>A. parrasana</i> .....	51
5	Respuestas de <i>A. guiengola</i> a diferentes concentraciones de BA y 2,4-D .....	54
6	Respuestas de <i>A. potatorum</i> a diferentes concentraciones de BA y 2,4-D .....	55
7	Estructuras observadas en callo nodular de <i>A. guiengola</i> generado con los tratamientos .....	56
8	Embriones somáticos de <i>A. guiengola</i> .....	56
9	Brotos generados en BIT .....	58
10	Promedio de brotes por explante generados en cada tratamiento .....	61
11	Experimentos en BITs de <i>A. durangensis</i> , <i>A. funkiana</i> y <i>A. gigantensis</i> ..	62
12	Experimentos en BITs de <i>A. guiengola</i> , <i>A. parryi</i> y <i>A. potatorum</i> .....	63
13	Sistema radical desarrollado <i>in vitro</i> de <i>A. guiengola</i> dentro del recipiente de cultivo .....	65
14	Brotos generados en BIT y enraizados en medio semisólido de <i>A. potatorum</i> y <i>A. gigantensis</i> .....	66
15	Plantas de <i>A. gigantensis</i> , <i>A. guiengola</i> y <i>A. potatorum</i> después de 18 meses de ser transferidas a suelo .....	66
16	Brotos generados en BIT y transferidos a suelo de <i>A. durangensis</i> , <i>A. funkiana</i> , <i>A. gigantensis</i> , <i>A. guiengola</i> , <i>A. parryi</i> y <i>A. potatorum</i> .....	68
17	Comparación de las tasas de elongación foliar de plántulas generadas en BIT y en tratamiento control (medio semisólido) de cuatro especies de agave .....	70
18	Electroforesis en gel de agarosa de ADN de <i>A. angustifolia</i> , <i>A. duranguensis</i> , <i>A. guiengola</i> , <i>A. potatorum</i> , <i>A. salmiana</i> , <i>A. karwinskii</i> , <i>A. gigantensis</i> , <i>A. funkiana</i> , <i>A. parrasana</i> , <i>A. victoriae-reginae</i> , <i>A. bracteosa</i> y <i>A. parryi</i> .....	71
19	Electroforesis en gel de agarosa de productos de amplificación con oligonucleótidos para ISSR y para RAPDs .....	72
20	Electroforesis en gel de agarosa de productos de amplificación obtenidos al emplear simultáneamente los oligonucleótidos SQ1 y 34 de muestras de ADN de las seis especies de <i>Agave</i> incluidas en el estudio .....	72
21	Dendrogramas generados con el software PAST basados en el análisis de datos obtenidos de RAMP .....	75

## RESUMEN

Los agaves tienen una gran importancia ecológica y un gran potencial económico, lo cual ha llevado a que se busquen nuevas alternativas para su propagación. En el presente estudio, se realizó la micropropagación de *Agave durangensis*, *A. funkiana*, *A. gigantensis*, *A. guiengola*, *A. parryi* y *A. potatorum* mediante el uso de biorreactores de inmersión temporal de tipo tanques gemelos (BITs), además de un análisis de fidelidad génica de las plantas obtenidas. Para todas las especies se probaron tres frecuencias de inmersión en BITs de 6, 12 y 24 h, empleando medio MS adicionado con 1 mg/L de BA; además se evaluaron el efecto de las nanopartículas de plata (NPsAg, 50 mg/L) adicionadas además del BA; y de 1 mg/L 2iP.

El mejor tratamiento para *A. guiengola* fue BA y NPsAg (130.67 brotes por explante), mientras que en *A. potatorum* fue BA con frecuencia de inmersión de 24 h (5.60 brotes por explante). Para el resto de las especies, el mejor tratamiento fue BA, con frecuencias de inmersión de 12 h para *A. durangensis* (2.16 brotes por explante), y de 6 h para *A. funkiana*, *A. gigantensis* y *A. parryi* (3.05, 2.00 y 1.5 brotes por explante, respectivamente). El porcentaje de supervivencia de las plantas generadas en BITs fue desde un 25 % para *A. durangensis* y un 100 % para *A. gigantensis*. El análisis de fidelidad génica mediante análisis tipo RAMP reveló que las plantas generadas en BITs y expuestas a BA no tienen variación con respecto a las plantas cultivadas *in vitro* en medio semisólido sin reguladores de crecimiento vegetal. Por lo tanto, el sistema de inmersión temporal de tipo tanques gemelos es útil para generar plantas de agave que pueden integrarse a esquemas para producir plantas adultas destinadas a la explotación comercial, y también para reforestar áreas naturales.



## ABSTRACT

Agaves have great ecological importance and great economical potential, which has driven the search for new alternatives for their propagation. In this study, *Agave durangensis*, *A. funkiana*, *A. gigantensis*, *A. guiengola*, *A. parryi*, and *A. potatorum* were micropropagated using temporary immersion bioreactors with twin tanks (TIBs) as well as an analysis of genetic fidelity in the propagated plants. Three frequencies of TIBs immersion were tested on all species: 6, 12 and 24 h, using MS culture medium added with 1 mg/L of BA; the effect of silver nanoparticles (NPsAg, 50 mg/L), added alongside the BA, and of a 1 mg/L 2iP were also evaluated.

The best treatment for *A. guiengola* was BA and NPsAg (130.67 shoots per explant), whilst for *A. potatorum* it was BA with an immersion frequency of 24 h (5.60 shoots per explant). For the rest of the species the best treatment was BA, with immersion frequencies of 12 h for *A. durangensis* (2.16 shoots per explant) and 6 h for *A. funkiana*, *A. gigantensis* and *A. parryi* (3.05, 2.00 and 1.5 shoots per explant, respectively). The percentage of survival for plants developed in BITs was 25 % for *A. durangensis* and 100% for *A. gigantensis*. The genetic fidelity RAMP analysis showed that plants developed in TIBs and exposed to BA had no variations regarding to that of plants cultivated *in vitro* with semi-solid medium without any plant growth regulators. Consequently, the temporal immersion system in twin tanks is useful to develop agave plants that can be integrated to plant production schemes of adult plants destined for both, commercial exploitation, and natural areas reforestation.

## INTRODUCCION

Uno de los principales retos a nivel local, nacional y mundial es lograr la sustentabilidad. Para ello se debe encontrar el balance entre dos intereses que con frecuencia se consideran mutuamente excluyentes, no debiendo serlo: la conservación de los recursos naturales y la satisfacción de las necesidades de la población humana. Los agaves son un caso emblemático de esta controversia; se trata de un grupo de plantas que revisten una enorme importancia ecológica, y un gran potencial económico. La presión y explotación a la que están sujetas muchas poblaciones naturales de agaves, aunada a la pérdida o deterioro de áreas naturales donde se ubican, a sus largos ciclos de vida y a la baja tasa de reclutamiento de nuevos individuos colocan a todo el género en una situación vulnerable, más aún a aquellas especies con distribución geográfica limitada.

La Biotecnología Vegetal ofrece herramientas que se pueden articular a esquemas de manejo racional y sustentable a través de la generación *in vitro* de plantas. Dentro de las técnicas empleadas para la propagación masiva de distintas especies vegetales ha cobrado relevancia el uso de biorreactores de inmersión temporal (BITs), pues presentan numerosas ventajas sobre los sistemas tradicionales en medio semisólido, entre ellas un aprovechamiento más eficiente de los nutrientes y reguladores de crecimiento vegetal; oxigenación más eficiente; aumento más rápido de la biomasa; y reducción en los costos, pues los gelificantes son el componente más caro de los medios de cultivo. Se han diseñado varios tipos de BITs, uno de los más atractivos es el de tipo tanques gemelos. Este tipo de BIT tiene un diseño simple, su operación es sencilla y se puede construir con materiales de bajo costo, entre otras. En cuanto a su operación, debido a que su funcionamiento implica un recambio de la atmósfera interna de los recipientes de cultivo, la oxigenación de las interfases líquida y gaseosa dentro del recipiente es mayor que en otros tipos de BITs; no se presenta efecto cizalla; y se disminuye de manera importante la hiperhidratación de los tejidos, pues estos solo están en contacto con el medio líquido por periodos cortos de tiempo.

Además de buscar las condiciones óptimas para lograr una propagación eficiente, y la disminución de efectos indeseables como la necrosis y la hiperhidratación de los explantes y de los brotes generados, otro aspecto que se debe tomar en cuenta en el desarrollo de un protocolo de micropropagación es que las nuevas plantas producidas *in vitro* mantengan la fidelidad genética con respecto a las plantas madre. Para evaluar este aspecto se puede recurrir al análisis de marcadores moleculares de distintos tipos. Los polimorfismos de microsátélites amplificados al azar (RAMPs) ofrecen varias ventajas: no se requiere conocer la secuencia a analizar, son reproducibles y su costo es menor al de otros marcadores moleculares.

Este trabajo propone el uso de BITs de tipo tanques gemelos para hacer más eficiente el proceso de micropropagación *in vitro* de *Agave durangensis*, *A. funkiana*, *A. gigantensis*, *A. guiengola*, *A. parryi* y *A. potatorum*. Para estas seis especies se probaron tres frecuencias

de inmersión en BITs (6, 12 y 24 h) empleando medio adicionado con BA; posteriormente se evaluó el efecto de adicionar nanopartículas de plata (NPsAg) junto con BA al medio de cultivo; y también se analizó el efecto de emplear una citocinina distinta, el 2iP. El uso de BIT con medio adicionado con BA y NPsAg resultó el mejor tratamiento para *A. guiengola*, con un incremento significativo en el número de brotes; para el resto de las especies, lo más recomendable es emplear BITs y medio adicionado únicamente con BA, que, si bien no aumenta el promedio de brotes por explante en comparación con el uso de medio semisólido, si hace más eficiente el proceso debido a la reducción de costos al no requerir de gelificantes.

Las plantas generadas *in vitro* fueron exitosamente enraizadas, y los índices de supervivencia una vez que fueron transferidas a suelo oscilaron entre 25 y 100 %, dependiendo de la especie y del protocolo de aclimatación.

Finalmente, se extrajeron y purificaron muestras de ADN de individuos de todas las especies, se analizaron mediante marcadores moleculares RAMP y se encontró que las plantas propagadas en BITs empleando citocininas conservan la fidelidad genética con respecto a las plantas cultivadas *in vitro* en medio semisólido sin reguladores de crecimiento vegetal; por lo tanto, el sistema propuesto es útil para generar plantas de agave que pueden integrarse a esquemas para producir plantas adultas que pueden emplearse con fines comerciales, o en el manejo de poblaciones naturales.

## I. ANTECEDENTES

### 1.1 EL GENERO *Agave*

Los agaves sincretizan la riqueza natural y cultural de México, pues son un grupo emblemático de la flora mexicana y un elemento importante para muchas culturas precolombinas de Aridoamérica y Mesoamérica. Se trata de un recurso natural tan valioso por todos los satisfactores que puede proveer, que los pueblos ancestrales de estas regiones, más allá de su mero valor utilitario, les confirieron un papel preponderante en los ámbitos cultural y religioso, a grado tal que los aztecas les atribuyeron un origen divino.

El género *Agave* es exclusivo del continente americano, y se puede encontrar desde el sur de los Estados Unidos Americanos, a 40° de latitud norte, hasta Colombia y Venezuela, a 6° de latitud norte, incluyendo varias islas del Caribe (García-Mendoza, 2007; Arizaga y Ezcurra, 2002). Se presentan en altitudes que van de los 0 a los 3,400 m, aunque con más frecuencia de los 1,000 a los 2,000 m de altitud, en zonas áridas o semiáridas (García-Mendoza, 2007).

Cuenta con aproximadamente 200 especies, de las cuales 75% se encuentran en México. Considerando las categorías intraespecíficas (subespecies y variedades), en el país hay 129 taxones endémicos, 88 de ellos microendémicos (García-Mendoza, 2007).

La mayor cantidad de especies y de endemismos se presenta en el valle de Tehuacán-Cuicatlán, en los estados de Puebla y Oaxaca; además, los agaves de esta región presentan características que sugieren que se trata de formas ancestrales, por lo que algunos autores consideran que este es el sitio preciso de origen y diversificación del género (Granados-Sánchez, 1993; Delgado-Lemus *et al.*, 2014).

#### 1.1.1 Taxonomía del género *Agave*

El género *Agave* pertenece a la clase *Monocotyledonae*, orden *Liliales*, familia *Asparagaceae*, subfamilia *Agavoideae* (Chase *et al.*, 2009), y se ha dividido en dos subgéneros, *Littae* y *Agave* (Granados-Sánchez, 1993).

La taxonomía de los agaves ha sido un problema difícil de abordar por razones históricas y biológicas. Las primeras clasificaciones taxonómicas se efectuaron abarcando solo las especies que se encontraban en colecciones y jardines botánicos de Europa, en muchos casos a partir de especímenes en estadios juveniles plantados en macetas. Los esfuerzos posteriores fueron importantes y constructivos, pero en general no se hicieron tomando en cuenta la totalidad de las especies, y en muchos casos omitieron el análisis de caracteres importantes, por ejemplo, las características de las flores (Gentry, 1982).

Por otra parte, los agaves muestran una asombrosa plasticidad fenotípica, lo que les ha permitido dispersarse geográficamente y adaptarse a diferentes ambientes; sin embargo, esta plasticidad dificulta su clasificación, pues dentro de una misma especie se pueden encontrar importantes variaciones morfológicas especialmente en las hojas, y en ocasiones en caracteres florales, que en algunos casos condujeron a identificar erróneamente a dos individuos como pertenecientes a distintas especies (Gentry, 1982). Además de que es indispensable tomar en cuenta todas las características morfológicas para la clasificación de especies, como sugiere Gentry (1982), es evidente la necesidad incorporar otros criterios.

Se ha recurrido a datos de la composición cromosómica de las especies de *Agave*; varios autores aceptan que el género presenta un número cromosómico básico de  $x=30$ , pero hay variaciones en el complemento cromosómico, así como diversos niveles de ploidía, pues se han reportado especies tri-, tetra-, penta-, hexa- y octaploides (García-Mendoza, 2007). Por mostrar un ejemplo de la utilidad de esta información, la mayoría de las especies del subgénero *Agave* son poliploides, mientras que en *Littae* es más frecuente la diploidía, lo que sugiere que es más primitivo (Granados-Sánchez, 1993).

Se ha propuesto utilizar la quimiotaxonomía, es decir, el perfil de metabolitos secundarios (Sidana *et al.*, 2016), para complementar los criterios taxonómicos y moleculares.

### 1.1.2 Descripción general de los agaves

Son plantas xerófitas. Presentan fotosíntesis tipo CAM -que en algunas especies parece ser facultativa- para evitar la pérdida excesiva de agua; esto también les permite acumular biomasa en condiciones inviabilas para la mayoría de los cultivos agrícolas de importancia comercial (Granados-Sánchez, 1993; García-Mendoza, 2007; Ramírez-Tobías *et al.*, 2014).

La raíz es fibrosa y superficial, lo que les permite absorber rápidamente la escasa agua de lluvia que suele presentarse en su hábitat (García-Mendoza, 2007).

El tallo usualmente es grueso y corto, caulescente o acaulescente. Algunas especies son arborescentes, como *A. karwinskii* y *A. goldmania*, y en este caso el tallo se vuelve decumbente con el paso del tiempo, y va formando raíces adventicias (Gentry, 1982).

Las hojas son glabras, generalmente cubiertas por una gruesa capa de cera, y tienen un profuso sistema de fibras vasculares; en la mayoría de las especies son suculentas, pero en algunas son coriáceas. En su extremo terminal presentan una espina que puede medir de algunos milímetros hasta cinco centímetros, según la especie; y los márgenes suelen ser serrados o dentados. En algunas especies se observan tubérculos epidérmicos. Un agave puede presentar unas pocas hojas -de cinco a diez- como en *A. nizardensis*, o una gran cantidad -hasta 200- como en *A. rhodacantha*. Están arregladas en espiral, formando una roseta que cumple con varios propósitos: permite que la planta capte una mayor



cantidad de luz; la disposición que adquieren las espinas protege a la planta de animales; cuando llueve, este arreglo dirige el agua hacia la zona del suelo en el centro de la planta, donde el agua queda bajo la sombra de la roseta, lo que eficientiza su absorción y disminuye su evaporación desde el suelo (Gentry, 1982; Granados-Sánchez, 1993; García-Mendoza, 2007).

La mayoría de los agaves son monocápicos y semélparos; esto se debe a que la planta destina una gran parte de sus reservas nutricionales, e incluso del agua almacenada en su tallo y hojas, al desarrollo de la inflorescencia (Granados-Sánchez, 1993). Esta presenta un escape floral excepcionalmente largo que en algunas especies alcanza los 10 m (Gentry, 1982). El tallo floral contiene una alta concentración de azúcares, y las flores suelen producir una gran cantidad de néctar. Esta enorme inversión metabólica en las estructuras florales tiene como objetivo atraer a polinizadores, pues entre más alta sea la inflorescencia más atractiva será para estos (Rocha *et al.*, 2005).

Los agaves presentan queropterofilia: han coevolucionado con los murciélagos, que se han convertido en sus principales polinizadores. Sin embargo, esta relación no es exclusiva, y estas plantas también atraen a polinizadores diurnos como colibríes, abejas, avispa, moscas, abejorros y hormigas, con el fin de aumentar sus posibilidades de éxito reproductivo (Granados-Sánchez, 1993; Rocha *et al.*, 2005; García-Mendoza, 2007; Delgado-Lemus *et al.*, 2014).

Las flores se agrupan en inflorescencias en espiga o racemosas (en el subgénero *Littaeae*) o panículas (en el subgénero *Agave*), y suelen ser de color amarillo verdoso o blanco verdoso (Rocha *et al.*, 2005). Son protándricas; las estructuras florales se presentan en múltiplos de tres: seis tépalos, seis estambres, ovario tricarpelar. El ovario tiene posición inferior con respecto a los tépalos; estos últimos están fusionados formando una estructura en forma de tubo (Gentry, 1982; Granados-Sánchez, 1993).

El fruto tiene forma alargada; es trilocular, leñoso y dehiscente. Las semillas son muy numerosas, de color negro brillante, triangulares y planas; presentan un ala en la porción convexa (Granados-Sánchez, 1993; García-Mendoza, 2011).

### **1.1.3 Aprovechamiento tradicional de los agaves**

El nombre de *agave*, que en griego significa noble o admirable, fue utilizado por primera vez para designar a estas plantas por Linneo (Gentry, 1982). Los españoles les llamaron *magueyes*, término de origen presumiblemente antillano (Gentry, 1982; Cervantes-Ramírez, 2005).

Pero antes de que los europeos llegaran a América, estas plantas eran llamadas *metl* por los aztecas, *ueda* por los otomíes, *doba* por los zapotecos, *yabi* por los mixtecos y *tacamba*

por los purépechas. En el noroeste de México la planta como tal es llamada *mezcal* o *mescal* (Gentry, 1982; Granados-Sánchez, 1993; Cervantes-Ramírez, 2005).

Evidencia arqueológica indica que diversos pueblos americanos utilizaban agaves con distintos propósitos desde 7,000 a.C. (Gentry, 1982). Desde épocas precolombinas diversos grupos en Aridoamérica y Mesoamérica utilizaron prácticamente todas las partes de la planta; la mayoría de estos usos siguen vigentes en la actualidad.

Los aztecas utilizaban las espinas para punzarse y ofrecer autosacrificios de sangre (Granados-Sánchez, 1993).

Los tarahumaras utilizaron varias especies de agave para envenenar peces, y otros grupos indígenas utilizaban el jugo obtenido de *A. lechuguilla* para envenenar flechas (Gentry, 1982).

Las pencas secas antiguamente se usaban como suela de calzado. Las espinas terminales de las hojas se utilizan como agujas para coser; incluso se dejan unidas a una fibra larga, con lo que se obtiene de manera simultánea aguja e hilo (Granados-Sánchez, 1993).

Las hojas de varias especies aún se usan como jabón en algunas zonas de México; con este propósito los otomíes utilizaban la pulpa de hojas de *A. lechuguilla*, a la que llamaban *shite* (Gentry, 1982).

Las hojas se han utilizado para tratar afecciones de la piel, como comezón, ardor, moretones y heridas (Gentry, 1982).

Las pencas secas se usan como combustible (Granados-Sánchez, 1993); las plantas completas se utilizan como cercos vivos (Gentry, 1982).

Los tallos florales se han utilizado como vigas o para construir cercos, y las hojas secas se empleaban como tejas para el techo (Granados-Sánchez, 1993).

Son plantas de ornato muy apreciadas, y un elemento sobresaliente en jardines, colecciones y paisajismo. Los españoles las llevaron a Europa durante la época colonial, y fueron incorporadas a colecciones y jardines botánicos (Gentry, 1982).

#### Los agaves como alimento

En el norte de México y sur de E.U.A. el meristemo del tallo y la base de las hojas (“piñas” o “cabezas”) se cocían en hornos subterráneos, que eran hoyos tapizados con rocas sobre las que se colocaba y prendía leña; una vez que se apagaba el fuego se colocaban las piñas de maguey, y se tapaban con hierbas y tierra; la cocción duraba uno o dos días. Las piñas eran seccionadas en trozos que podían conservarse por largos periodos de tiempo;

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

también se exprimían para obtener el jugo y elaborar jarabe. Los cochimi de Sierra de la Giganta, Baja California Norte, cocinaban y consumían hojas de plantas maduras cocinadas del modo antes descrito, mezcladas con cabezas de ovejas y vacas (Gentry, 1982; Granados-Sánchez, 1993).

El tallo floral, popularmente llamado *quiote*, se cocinaba directamente al fuego; desde que se comenzaron a fabricar ollas y hasta la fecha, el quiote se hierve, y se consume como dulce, al igual que las hojas (Gentry, 1982).

Las flores se comen cocidas o hervidas; en particular en Tehuacán, Puebla, se comen revueltas con huevos (Gentry, 1982).

Las pencas de *A. salmiana* se utilizan como alimento para ganado lechero en San Luis Potosí (Gentry, 1982). Silos *et al.* (2010) señalan que se trata de un forraje de calidad superior al heno de maíz, avena y nopal, y que puede proveer de suficiente calcio, fósforo, zinc y hierro para una vaca en lactancia. También *A. mapisaga* se suministra como forraje fresco (Granados-Sánchez, 1993).

Las panículas de *A. shawii* y *A. goldmaniana* se utilizan para alimentar ganado en Baja California (Gentry, 1982).

Las pencas se utilizan en la elaboración de barbacoa; durante la cocción con ellas se recubre el horno subterráneo donde se coloca la carne de borrego, y también se cubre la carne. A la cutícula que se arranca de las pencas vivas se le llama *mixiote*, el cual se utiliza para elaborar algunos platillos tradicionales (Gentry, 1982; Nava-Cruz *et al.*, 2015; José-Jacinto y García-Moya, 2000).

En algunos sitios del centro y sureste de México se consumen varios insectos asociados a los magueyes, como los escamoles (larvas de hormigas de la especie *Liometopum apiculatum* M.), gusanos blancos (*Acentrocneme hesperiaris*) y chinicuiles (gusanos rojos, larvas del lepidóptero *Hypopta agavis* B.) (Nava-Cruz *et al.*, 2015).

### Fibras

En varias especies se aprovechan las pencas y los *cogollos* (tallos florales que apenas comienzan a desarrollarse) para obtener fibras con las que tradicionalmente se han elaborado una gran cantidad de artículos, como lazos, cuerdas, redes, cestas, tapetes, manteles, tilmas, armaduras, instrumentos musicales, objetos ceremoniales, arneses, sillas de montar, entre otros (Gentry, 1982).

La industria del henequén (*A. fourcroydes*) cobró gran importancia económica para México a mediados del siglo XX, aunque poco después declinó, debido a la competencia directa de las fibras sintéticas (Granados-Sánchez, 1993). También de gran relevancia es la fibra

conocida como sisal que se obtiene de *A. sisalana*, siendo E.U.A, África, Asia y Brasil los principales productores (Gentry, 1982).

De *A. lechuguilla* se obtiene la fibra conocida como *ixtle* con la que se elaboran cepillos, escobas, cuerdas, sacos y costales, e incluso se ha utilizado en la fabricación de mezclilla (Granados-Sánchez, 1993).

#### Bebidas no alcohólicas y jarabes

En el momento en el que la planta hace la transición a la etapa reproductiva, una gran cantidad de azúcares y otros nutrientes comienzan a translocarse al meristemo floral; este flujo de nutrientes continúa hasta el desarrollo completo de la inflorescencia. Aunque se remueva el meristemo apical, una vez que la planta ha iniciado este programa fisiológico, seguirá bombeando esta savia dulce, conocida como *aguamiel*, al extremo apical del tallo.

Para extraer el aguamiel el *tlachiquero* “castra” al maguey, es decir, remueve el meristemo apical (“huevo”) y las hojas jóvenes que lo rodean (“meyolote”), y forma una cavidad (“cajete”) que cubre con rocas y pencas, y la deja madurar de tres meses a un año, con el objeto de que el tallo acumule azúcares. Pasado ese tiempo el cajete se raspa, y se comienza a coleccionar el aguamiel dos veces al día utilizando una calabaza hueca de *Lagenaria siceraria* (“acocote”) para absorberla; después de cada extracción se raspa el cajete para mantener el flujo de savia. Un maguey puede producir de cuatro a seis litros de aguamiel al día por un periodo de tres a seis meses (Escalante *et al.*, 2016).

El aguamiel se bebe fresco; en sitios donde escaseaba el agua potable y la carne era un recurso muy valioso, pues además de saciar la sed proveía de nutrientes (Granados-Sánchez, 1993). Además, con él se puede elaborar vinagre y obtener alcohol (Gentry, 1982), pero principalmente se utiliza en la elaboración de pulque.

#### Elaboración de bebidas alcohólicas

**Pulque.** Al fermentar el aguamiel se obtiene el pulque, o *poliuhquiocltli*, como era conocido por los aztecas (de *poliuhqui*, echado a perder, y *ocltli*, vino). Es una bebida blanca y lechosa, con un contenido alcohólico de 4 a 7 °GL, elaborada por diversas civilizaciones como los otomíes, teotihuacanos, aztecas, guachichiles y guamares. Parece que los otomíes comenzaron a elaborarlo desde 2,000 a.C. Era una bebida tan apreciada, que la mayoría de estos pueblos lo utilizaban en ceremonias religiosas; por el valor religioso que le atribuían, los aztecas regulaban severamente su consumo (Gentry, 1982; Escalante *et al.*, 2016).

El aguamiel se fermenta de manera espontánea por acción de bacterias y levaduras que se encuentran en el propio maguey, entre los que se han identificado *Lactobacillus sp.*, *Leuconostoc mesenteroides*, *L. dextranicum*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Zymomonas*

*mobilis*. El proceso se acelera agregando al aguamiel un inóculo o “semilla” de pulque previamente fermentado (Escalante *et al.*, 2016).

Escalante y col. (2016) reportan que el pulque es rico en vitamina C, ácido pantoténico, tiamina, ácido aminobenzoico, piridoxina, biotina; también contiene hierro, ácido ascórbico, riboflavina, y otras vitaminas del complejo B, folato, saponinas esteroideas, fitasa. El contenido de proteínas es de 0.27 g/100 ml.

Las especies consideradas pulqueras son *A. salmiana* Otto ex Salm., *A. mapisaga* Trel., *A. atrovirens* Karw. ex Salm., *A. ferox* Koch., *A. hookeri* Jacobi y *A. americana* L. (Gentry, 1982).

**Mezcal.** Walton (en Granados-Sánchez, 1993) afirma que la destilación fue introducida en América hasta el siglo XVI por los españoles, y que no fue hasta entonces que se comenzó a elaborar mezcal.

Justo cuando el agave está comenzando a desarrollar la inflorescencia, se debe *capar* o *castrar* para remover el primordio floral y el meristemo apical. Se espera uno a dos años para que el tallo acumule los azúcares que de manera natural hubieran soportado el desarrollo de la inflorescencia, y de este modo gane peso con mayor rapidez (Nava-Cruz *et al.*, 2015).

A grandes rasgos, el proceso tradicional de elaboración de mezcal consiste en remover las pencas de la piña, que luego se corta en dos o más pedazos. Luego las piñas se cocen en un horno; el tipo más antiguo es un hoyo cónico excavado en la tierra que se tapiza con rocas, sobre las que se prende leña para calentarlas, y sobre estas rocas calientes se colocan los trozos de piñas y se cubren con palma y tierra, para cocerlas por 32-42 horas. El propósito de este paso es transformar los azúcares complejos en azúcares simples. Las piñas cocidas se cortan en trozos más pequeños que se muelen y colocan en tinas de fermentación, donde permanecen por al menos seis días; en esta etapa del proceso levaduras y bacterias convierten los azúcares en etanol, y el producto intermedio que se genera es llamado “tepache”. Este se destila en alambiques para obtener el producto final, el mezcal (Salas y Hernández, 2015).

Las principales especies de agaves mezcaleros son *A. angustifolia* Haw., vars., *A. rhodacantha* Trel., *A. shrevei* Gentry, *A. wocomahi* Gentry, *A. durangensis* Gentry, *A. palmeri* Engelm., *A. zebra* Gentry, *A. asperrima* Jacobi, *A. potatorum* Zucc., *A. weberi* Cels (Gentry, 1982), *A. crassispina* var *culta* Trel., *A. paloma* y *A. jaiboli* (Granados-Sánchez, 1993), pero hay quien afirma que se utilizan 53 especies diferentes, la mayoría de ellas silvestres (Torres *et al.*, 2015).

A finales del siglo XIX cobró importancia la producción de mezcal en el pueblo de Tequila, Jalisco, a partir de *A. tequilana* Weber, conocido popularmente como agave azul, y a este



TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

tipo en particular de mezcal se le comenzó a llamar “tequila” (Granados-Sánchez, 1993). El proceso para su elaboración se fue industrializando conforme creció la demanda. En 1974 la Secretaría de Industria y Comercio emitió una Declaración General de Protección de la Denominación de Origen "Tequila" (CRT); la norma oficial mexicana NOM-006-SCFI-2012 enuncia las especificaciones que debe reunir un producto para poder ser etiquetado como tal.

Al mezcal se le otorgó la Protección de la Denominación de Origen en 1994, en la que se estipula que solo pueden recibir este nombre los productos elaborados en los estados de Guerrero, Oaxaca, Durango, San Luis Potosí y Zacatecas; en años posteriores se agregaron municipios de los estados de Guanajuato (DOF, Resolución 154006, 2001; Resolución 419872, 2015), Tamaulipas (DOF, Resolución 174603, 2003), Michoacán (DOF, Resolución 356898, 2012), y Puebla (DOF, Resolución 424649, 2015). En el 2018 el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial resolvió incluir algunos municipios de los estados de México (DOF, Resolución 471442, 2018) y Morelos (DOF, Resolución 471443, 2018), y los municipios de Aguascalientes, Asientos, Calvillo, Cosío, El Llano, Rincón de Romos y Tepezalá del estado de Aguascalientes (DOF, Resolución 471440, 2018); sin embargo, productores de mezcal de los primeros estados a los que se concedió la denominación de origen y productores pertenecientes al Consejo Regulador del Mezcal han interpuesto recursos legales para evitar que estas últimas tres resoluciones entren en vigor.

La norma oficial mexicana NOM-070-SCFI-1994 especifica que el nombre mezcal...

‘se aplica a la bebida alcohólica elaborada... con agaves de las siguientes especies:

- *Agave Angustifolia Haw* (maguey espadín);
- *Agave Esperrima jacobi*, Amarilidáceas (maguey de cerro, bruto o cenizo);
- *Agave Weberi cela*, Amarilidáceas (maguey de mezcal);
- *Agave Patatorum zucc*, Amarilidáceas (maguey de mezcal);
- *Agave Salmiana Otto Ex Salm SSP Crassispina (Trel) Gentry* (maguey verde o mezcalero); y
- Otras especies de agave, siempre y cuando no sean utilizadas como materia prima para otras bebidas con denominaciones de origen dentro del mismo Estado.

Cultivados en las Entidades Federativas, Municipios y Regiones que señala la Declaración General de Protección a la denominación de origen “mezcal”, en vigor.’

La norma oficial mexicana NOM-070-SCFI-2016 respecto a la materia prima para la elaboración de mezcal aclara que “Están permitidos los magueyes o agaves, cultivados o silvestres, cuyo desarrollo biológico haya transcurrido en el área geográfica comprendida en la Resolución... y está permitida su extracción por las autoridades competentes conforme a las leyes aplicables... Los magueyes o agaves, así como los predios de donde proceden, deben registrarse y estar geo-referenciados ante el OEC. Los magueyes o agaves deben estar maduros para cosecharse”.

En Sonora se elabora la bebida conocida como bacanora a partir de las especies *A. pacifica* y *A. palmeri* (Granados-Sánchez, 1993), la cual obtuvo la Protección a la Denominación de Origen en 2000 (NOM-168-SCFI-2004).

#### 1.1.4 Usos potenciales de los agaves y sus productos

El desarrollo tecnológico posibilita diversificar el aprovechamiento de los agaves, ya sea ampliando y eficientando los usos tradicionales, o encontrando nuevas posibilidades, por ejemplo:

**Edulcorantes.** Tradicionalmente se ha elaborado la llamada “miel de agave”, la cual se produce calentando el aguamiel. Actualmente también se producen y comercializan el néctar o jarabe de agave, que se obtiene al hidrolizar los fructanos mediante calentamiento o enzimas, obteniendo un producto de aspecto y sabor un tanto parecidos a la miel de abeja; y el concentrado de savia de agave, que se obtiene al hervir el aguamiel (Santos-Zea *et al.*, 2016).

**Biocombustibles.** Los agaves enteros, particularmente *A. fourcroyedes*, así como el aguamiel, el pulque, incluso el bagazo desechado durante la producción de mezcal y tequila, son una fuente promisoría para producir etanol como biocombustible, debido a la alta concentración de azúcares presentes en la planta completa y en sus productos y subproductos, y también a que no compite por recursos hídricos ni edáficos con cultivos agroalimentarios, pues sus requerimientos de agua y nutrientes son muy modestos (Nava-Cruz *et al.*, 2015).

**Fibras.** Aunque el aprovechamiento de estas es uno de los usos más antiguos de los magueyes, han sido desplazadas por fibras sintéticas, más baratas y durables. Sin embargo, la búsqueda de productos más amigables con el medio ambiente podría conferir un nuevo impulso a la industria de fibras de agave, pues son completamente biodegradables, de bajo costo, reciclables y de baja densidad (Nava-Cruz *et al.*, 2015).

**Probióticos.** Las bacterias y levaduras presentes en el aguamiel y el pulque se consideran probióticas, y se han demostrado que son resistentes a las barreras antimicrobianas presentes en el tracto digestivo, además de mostrar actividad antimicrobiana, antiinflamatoria, anticolesterolémica y antiinfectiva (Escalante *et al.*, 2016).

**Nutracéuticos y farmacéuticos.** Estas plantas presentan una variedad de metabolitos secundarios, entre los que destacan los fructanos y saponinas. Ambos grupos han mostrado un interesante potencial como nutracéuticos, e incluso como fármacos.

Los fructanos son polisacáridos de fructosa que pueden ser lineares (inulinas y levanos) o ramificados (neoserias de inulinas y de levanos). Los agaves contienen una gran cantidad de fructanos de alto grado de polimerización (Nava-Cruz *et al.*, 2015). Varios fructanos son

prebióticos, pues no son digeribles y pasan intactos a través del tracto intestinal hasta el colon, donde la microflora nativa, particularmente bacterias ácido lácticas, los fermentan. Así pues, estos fructanos estimulan el crecimiento de flora intestinal benéfica, la cual puede modular la respuesta inmune; también se ha señalado que estos probióticos pueden influenciar el metabolismo de todo el organismo mediante la modulación del balance de energía, permeabilidad de la mucosa intestinal, concentración de lipopolisacáridos en suero e inflamación metabólica (Jasso-Padilla *et al.*, 2017).

En un estudio realizado en ratas, a estas se les suministraron extractos de *A. tequilana*; encontraron que los fructanos de bajo grado de polimerización disminuyen peso corporal y ganancia de peso, y son responsables de la disminución en la concentración en plasma de glucosa y lípidos. Por otra parte, encontraron que los fructanos de alto grado de polimerización tienen un efecto prebiótico más acentuado, pero no disminuyen la concentración de glucosa en plasma, por lo que sugieren que fructanos de alto y bajo grado de polimerización presentan efectos benéficos complementarios (Márquez-Aguirre *et al.*, 2016).

Por su parte, las saponinas se definen como glucósidos de triterpenos o esteroides. Son compuestos anfipáticos ya que presentan una unidad de aglicona (hidrofóbica) y un azúcar (hidrofílica). Los azúcares que se han encontrado formando parte de saponinas en agaves son  $\beta$ -D-glucopiranosil,  $\beta$ -D-galactopiranosil,  $\beta$ -D-xilopiranosil y  $\alpha$ -L-ramnopiranosil. Cuando presentan un residuo de azúcar se denominan monoglicósidos; si presentan dos, diglicósidos, y así sucesivamente, pudiendo presentar hasta seis residuos de azúcar - hexaglicósidos- (Sidana *et al.*, 2016).

En agaves se han identificado saponinas esteroidales de tipo espirostanol, como kammogeninas, manogeninas, gentrogeninas, agavósidos, agavasaponinas, magueyósidos; y solo una, la agavegenina D, de tipo colestano (Sidana *et al.*, 2016; Santos-Zea *et al.*, 2016).

En general, se ha observado que las saponinas presentan actividades hemolítica, citotóxica, inmunoestimulante, antiinflamatoria, antioxidante, antimicrobiana, hipocolesterolemica, antihiperalgésica, fitotóxica y molusquicida (Sidana *et al.*, 2016).

A pesar de que el aguamiel de agave, y por lo tanto endulzantes elaborados a partir del mismo, presentan concentraciones bastante altas de sacarosa, glucosa y fructosa, al consumirlos el incremento en los niveles séricos de azúcar e insulina son menores que al consumir una cantidad equivalente de glucosa; esta reducción en el índice glicémico puede deberse a la presencia de otros compuestos (Leal-Díaz *et al.*, 2016), como las saponinas.

Leal Díaz y col. (2016) encontraron que, al administrar aguamiel concentrado o extracto de saponinas a ratones, estos mostraron más tolerancia a la glucosa y mejoró su metabolismo hepático de lípidos, además de que se redujo la esteatosis hepática y la hipertrofia del tejido

adiposo; también registraron un incremento en la actividad mitocondrial en músculo esquelético. Un hallazgo interesante fue que el grupo de ratones alimentados con una dieta hiperlipídica suplementada con una dosis alta de extracto de aguamiel de *A. salmiana* ganó menos peso que los ratones del grupo control, alimentados con una dieta balanceada.

Santos-Zea y col. (2016) reportaron que el magueyósido B y el tetraglicósido de gentrogenina causaron la reducción en la viabilidad de la línea celular cancerosa Caco-2.

Queda claro el potencial terapéutico de las saponinas presentes en especies del género *Agave*; se han estudiado con detalle algunas de estas especies, particularmente las domesticadas, pero mediante un esquema de manejo y explotación sustentable se podría hacer uso de especies silvestres, que pudieran tener una mayor concentración de compuestos de interés que las especies cultivadas, o compuestos diferentes a los detectados. La disponibilidad de material vegetal para estudios fitoquímicos es un prerequisite indispensable, pero es vital evitar que la obtención de este de material vegetal dañe a las poblaciones silvestres.

#### **1.1.5 La problemática actual de los agaves**

Los agaves son un grupo de plantas que en general tienen un ciclo de vida largo, lo que implica que tardan varios años para alcanzar la madurez sexual; la mayoría de ellos son semélparos. Aunque producen una vasta cantidad de semillas, hasta 500,000 en *A. chrysoglossa* según Gentry (Arizaga y Ezcurra, 2002), la tasa de reclutamiento es extremadamente baja. Por ejemplo, Arizaga y col. (2002) reportaron que un individuo de *A. macroacantha* produce unas 2,800 semillas, de las que germina el 80%, pero solo sobreviven el 2.4% de las que crecen bajo la protección de algún arbusto nodriza, y ninguna de las que crecen en zonas abiertas.

Actualmente, el principal uso que se da a los agaves es la producción de bebidas alcohólicas; a los ejemplares destinados a este propósito se les impide el proceso de floración, y evidentemente su reproducción sexual (Escalante *et al.*, 2016). Aunque la mayoría de las especies de *Agave* presentan métodos alternos de reproducción vegetativa, si se impide la reproducción sexual de una gran parte de la población -lo cual es una práctica común-, se altera el ciclo demográfico normal de estas especies. Esto altera la capacidad de las poblaciones para recuperarse, así como sus relaciones ecológicas con otros organismos, como murciélagos, aves, abejas, hormigas y plantas a las que sirven de nodrizas (Delgado-Lemus *et al.*, 2014; Torres *et al.*, 2015), con consecuencias potencialmente devastadoras para las poblaciones, comunidades y ecosistemas.

En los últimos años se ha incrementado la demanda de mezcal, lo que ha conducido a los productores a sobreexplotar este recurso. De las cincuenta y tres especies que se utilizan para la elaboración de esta bebida, doce son objeto de manejo incipiente, y nueve han sido domesticadas; de cuarenta y cuatro especies se explotan sus poblaciones silvestres (en

una región una especie puede ser objeto de algún tipo de manejo, y en otra región se utilizan ejemplares silvestres). Esta situación pone en riesgo tanto la producción de mezcal como a las poblaciones de diferentes especies de agaves (Delgado-Lemus *et al.*, 2014; Torres *et al.*, 2015).

Por ejemplo, en Puebla se calcula que al año se extraen 12,331 individuos de *A. potatorum*, el 97% de los cuales se destina a la producción de mezcal. En Michoacán se utiliza *A. inaequidens* para obtener mezcal, pero también se utiliza como alimento, medicina para humanos y animales, forraje, construcción, obtención de fibra, entre otros usos. Por año se extraen más de 11,900 plantas en cinco comunidades michoacanas. En ambos estados, los pobladores de comunidades han comenzado a implementar esquemas de manejo, pero es necesario mejorar estas prácticas, así como implementar estrategias complementarias para evitar la eventual pérdida de poblaciones naturales, e incluso la extinción de estas y otras especies (Delgado-Lemus *et al.*, 2014; Torres *et al.*, 2015).

La práctica de remover el *mixiote* (cutícula de las hojas usada en la preparación de alimentos) es ilegal y clandestina. Cuando se efectúa en más del 30% de la superficie de las hojas del maguey, causa una severa deshidratación de la planta, disminución de la tasa fotosintética y finalmente la muerte del individuo; aun cuando el daño no sea letal, el maguey queda inutilizado para la obtención de otros productos, como el pulque (José-Jacinto y García-Moya, 2000).

Aún en aquellas especies domesticadas, los agaves son propagados a través de brotes o bulbillos, que a pesar de ser clones de la planta madre presentan una gran variabilidad morfológica; en estos esquemas, una planta puede producir hasta veinticinco brotes en un lapso de cinco años. Sin embargo, aunque se mantiene la producción de plantas, este número no es capaz de soportar un programa para seleccionar a los mejores ejemplares (Robert *et al.*, 2006).

#### **1.1.6 Especies incluidas en este proyecto**

Las especies disponibles para iniciar este proyecto se presentan en la tabla 1.

Tabla 1. Especies consideradas para el desarrollo de este proyecto (Gentry, 1982; Granados-Sánchez, 1993; Irish e Irish, 2000; García-Mendoza, 2007; García-Mendoza, 2011; Delgado-Lemus *et al.*, 2014; Avendaño-Arrazate *et al.*, 2015; Salas y Hernández, 2016).

Especie	Nombre común	Distribución	Usos	Estatus
<i>A. angustifolia</i>	Espadín, mezcal de Bacanora, zapupe verde, bab'ki (maya)	De Costa Rica a Tamaulipas	Elaboración de mezcal	Sin datos
<i>A. bracteosa</i>	Agave araña, maguey huasteco	Endémico de Coahuila y Nuevo León	Ornamental	Amenazada
<i>A. durangensis</i>	Maguey cenizo	Durango y Zacatecas	Elaboración de mezcal. Con potencial para uso ornamental	Sin datos
<i>A. funkiana</i>	Ixtle de Jaumave	Chiapas, Hidalgo, Nuevo León, Querétaro, Tamaulipas	Obtención de fibra. Con potencial para uso ornamental.	Sin datos
<i>A. gigantensis</i>	Sin denominación	Endémico de Sierra de la Giganta, BC	Elaboración de mezcal. Con potencial para uso ornamental	Solo se reproduce por semilla
<i>A. guiengola</i>	Maguey plateado	Endémico de la formación caliza de Guiengola, en el Istmo de Tehuantepec, Oaxaca	Ornamental	Amenazada
<i>A. karwinskii</i>	Cirial, kuish, chamisa, tobasiche, candelillo, cachitún, lechuguilla, maguey largo	Puebla y Oaxaca	Elaboración de mezcal. Cercos vivos. Con potencial para uso ornamental	Casi extinto en su distribución geográfica original
<i>A. parrasana</i>	Maguey de Parras, noah	Endémico de Coahuila	Ornamental	Sujeta a Protección Especial
<i>A. parryi</i>	Mezcal	Chihuahua y Arizona	Elaboración de mezcal, ornamental	Sin datos
<i>A. potatorum</i>	Agave mariposa, papalometl	Endémico del valle de Tehuacán-Cuicatlán, en Puebla y Oaxaca	Elaboración de mezcal Como alimento hojas, tallos, flores y tallo floral. Medicinal. Forraje. Construcción. Ceremonias religiosas	Solo se reproduce por semilla Poblaciones naturales muy reducidas
<i>A. salmiana</i>	Maguey pulquero, maguey cimarrón, xamini	Edo. De México, Michoacán, Guanajuato, Querétaro, San Luis Potosí, Hidalgo, Tlaxcala, Puebla, Morelos, Jalisco	Elaboración de pulque y mezcal	Se ha cultivado en varias regiones del país
<i>A. victoriae-reginae</i>	Maguey noa	Endémica de Coahuila, Durango y Nuevo León	Ornamental	En peligro de extinción.



## 1.2 CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES *IN VITRO*

### 1.2.1 Generalidades

El cultivo de tejidos vegetales *in vitro* (CTV) “se refiere al conjunto de técnicas diseñadas para el crecimiento y multiplicación de células, tejidos, y órganos usando soluciones nutritivas en un ambiente aséptico y controlado” (Loyola-Vargas y Ocho-Alejo, 2012).

El CTV se inicia a partir de un órgano o un fragmento de tejido, al cual se denomina *explante*; puede ser una semilla, un fragmento de hoja o de tallo, un grano de polen, etc.; se debe utilizar explantes de tejidos tan jóvenes como sea posible, pues suelen responder mejor a cualquier estímulo al que se expongan (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1999).

El explante debe someterse a un proceso de desinfección para eliminar todos los microorganismos que puedan encontrarse en su superficie. Los agentes desinfectantes de uso común son hipoclorito de sodio y etanol; los tiempos y concentraciones se determinan para cada especie y tipo de explante (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1999). Una vez desinfectado, el explante se coloca dentro de un recipiente de cultivo que contiene un medio nutritivo.

Ya que se han establecido explantes de una especie vegetal *in vitro*, se pueden someter a distintos estímulos para lograr diferentes respuestas, como la obtención de brotes adventicios, embriones somáticos, formación de raíces, entre otros.

Según Loyola Vargas y col. (2012) hay cinco áreas principales en las que se aplica rutinariamente el CTV: 1) propagación de materiales élite en gran escala; b) obtención de plantas modificadas genéticamente; c) modelo de estudio en fisiología vegetal; d) conservación de especies amenazadas; y e) ingeniería metabólica de fitoquímicos.

### 1.2.2 Medios de cultivo

El medio de cultivo está constituido en su mayor proporción por agua, a la cual se le agregan los macro y micronutrientes necesarios para el crecimiento y desarrollo de especies vegetales. Se han desarrollado diferentes formulaciones, en las que varía la forma de suministrar los nutrientes y su concentración. La más utilizada es la desarrollada por Murashige y Skoog, la cual se caracteriza por contener altos niveles de nitratos y amonio, además de una fuente de carbono (sacarosa) y vitaminas (Thorpe, 2012). Agregar una fuente de carbono orgánico y vitaminas es necesario porque las plantas *in vitro* no presentan un metabolismo normal: no tienen capacidad fotosintética, o es muy baja, y no tienen la capacidad de sintetizar todas las vitaminas que requieren (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1999).

El pH del medio se fija en 5.5 - 5.8 para garantizar la biodisponibilidad de todos los nutrientes, especialmente el Fe. También se le agregan sustancias gelificantes para

otorgarle una consistencia semisólida, tales como agar, gelrite, phytigel, entre otros (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1999).

Al medio de cultivo se le pueden adicionar reguladores de crecimiento vegetal para inducir respuestas específicas en los explantes; así como carbón activado, polivinilpirrolidona, polivinilpolipirrolidona para adsorber compuestos algunos tejidos vegetales secretan al medio, y que pueden resultarle tóxicos al propio explante (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1999).

Las altas concentraciones de nutrientes, particularmente de sacarosa, resulta óptimo para el crecimiento de diversos microorganismos, por lo que se debe garantizar la total ausencia de estos en los cultivos. Los medios, así como los recipientes y cualquier otro material que entre en contacto con los tejidos vegetales, se deben esterilizar; usualmente se colocan en una autoclave y se someten a una temperatura de 121°C y una presión de 15 a 20 psi durante veinte minutos (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1999).

### 1.2.3 Reguladores de crecimiento vegetal

Los reguladores de crecimiento vegetal (RCV), erróneamente llamados “hormonas vegetales”, son compuestos de diversa naturaleza química que fungen como moléculas de señalización encargadas de regular el metabolismo, crecimiento y morfogénesis de las plantas (Taiz y Zeiger, 2002).

Desde que Skoog y Miller mostraron que la proporción de auxinas y citocininas utilizadas en cultivos *in vitro* es determinante en los eventos de morfogénesis de raíces y brotes, estos son los grupos de reguladores más utilizados en el cultivo de tejidos vegetales (Hurny y Benková, 2017).

#### **Auxinas**

Las auxinas son un grupo heterogéneo de compuestos derivados del triptófano, cuya característica común es que en el anillo aromático presentan un grupo de carga positiva separado por 0.5nm de un grupo carboxilo de carga negativa (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1999; Taiz y Zeiger, 2002).

En cuanto a su mecanismo de acción, se ha descrito un grupo de factores de transcripción, los ARF, cuya expresión es inhibida por las proteínas represoras Aux-IAA en ausencia de auxinas. Cuando están presentes, las auxinas interactúan con el receptor TIR1, el cual es una subunidad de SCF<sup>TIR1/AFB</sup>, una ubiquitina ligasa E3. SCF<sup>TIR1/AFB</sup> promueve la degradación de Aux-IAA, lo que a su vez desregula a ARF, permitiendo que induzcan la transcripción de genes blanco (Hurny y Benková, 2017).

Se ha observado que las auxinas dirigen la elongación celular y formación de raíces adventicias; son responsables del fenómeno de dominancia apical, inducen la diferenciación del tejido vascular y promueven el desarrollo del fruto (Pérez-Molphe-Balch

et al., 1999; Taiz y Zeiger, 2002). En los cultivos *in vitro* se utilizan para inducir la formación de callo, para enraizar brotes y para promover la embriogénesis somática (Gaba, 2005).

Las auxinas de uso frecuente son el ácido indolacético (IAA), que es un compuesto natural, y las auxinas sintéticas ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido 3-indol butírico (IBA) y ácido 1-naftalenacético (NAA) (Gaba, 2005).

### **Citocininas**

Las citocininas se sintetizan a partir de monofosfato de adenosina (AMP) a través de la vía de la isopentiltransferasa (Hurny y Benková, 2017).

La mayoría de los receptores a citocininas se encuentran en la membrana del retículo endoplásmico, y en menor proporción en la membrana celular; se trata de histidin kinasas (AHK), las cuales inician una cascada de autofosforilación y transfosforilación en la que participan proteínas histidin fosfotransferasas (AHPs) que finalmente activan a un grupo de factores de transcripción conocidos como ARR tipo B. Estos factores de transcripción inducen la expresión de genes específicos (Hurny y Benková, 2017).

En dicotiledóneas se ha observado que las citocininas rompen la dominancia apical, lo que resulta en el desarrollo de las yemas laterales; por lo que una de sus aplicaciones más importantes en el CTV es la inducción de brotes múltiples. En ocasiones, concentraciones altas de cinetinas inhiben la formación de raíces (Gaba, 2005), lo que hace indispensable una etapa para el enraizamiento de los brotes.

En cultivos *in vitro* es común el uso de las citocininas naturales cinetina (Cin), zeatina (Zea) y N<sup>6</sup>-2-isopentil adenina (2-iP), y las sintéticas 6-benciladenina (BA) y tidiazurón (TDZ) (Gaba, 2005).

### **Consideraciones respecto al uso de RCV en cultivos *in vitro***

Los tejidos vegetales cultivados *in vitro* producen sus propios RCV (endógenos), aunque no es raro que lo hagan en concentraciones demasiado pequeñas o nulas. La adición de RCV al medio de cultivo (exógenos), ya sea naturales o sintéticos, es fundamental para obtener respuestas específicas, como la inducción de tejido calloso, la generación de brotes adventicios, o la formación de raíces en los explantes, por mencionar algunas (Gaba, 2005).

Sin embargo, se debe tener presente en todo momento que la respuesta a un RCV depende de varios factores, particularmente el genotipo del explante: cada especie, cada variedad, e incluso cada individuo, puede presentar un efecto diferente a la misma concentración de un RCV (Gaba, 2005). Aunque existen directrices generales (las citocininas inducen la generación de brotes adventicios, por ejemplo) es imposible predecir con certeza qué regulador y en qué concentración inducirá tal o cual respuesta en cierta especie. Por otra parte, la respuesta del mismo tejido vegetal puede ser distinta frente a diferentes

compuestos del mismo grupo de RCV. Por todo ello es necesario diseñar experimentos para determinar el mejor tratamiento para cada caso particular.

Otro factor que influye en el efecto de un RCV exógeno es el estado fisiológico de los tejidos vegetales: se debe buscar el explante que muestra una mejor respuesta (Gaba, 2005). Usualmente es más fácil inducir la respuesta deseada en tejidos muy jóvenes.

También se debe tomar en cuenta que los tejidos vegetales tienen mecanismos de degradación o inactivación para RCV naturales; cuando se agregan al medio de cultivo su concentración va disminuyendo con el tiempo, debido a la absorción, degradación e inactivación por parte del explante (Gaba, 2005). Por tal razón, en ocasiones es más conveniente utilizar RCV sintéticos, los cuales muestran más estabilidad debido a la incapacidad de las células vegetales para degradar a la mayoría de ellos.

*In vivo e in vitro*, las concentraciones de RCV necesarias para inducir un evento de morfogénesis son extremadamente bajas; es común que concentraciones más altas resulten tóxicas para los explantes (Gaba, 2005).

Los RCV de diferentes grupos pueden presentar efectos antagónicos, sinérgicos o complementarios; de los dos últimos se puede sacar provecho, adicionando mezclas de diferentes RCV. Por ejemplo, de manera general (con excepciones y notables variantes), una concentración alta de auxinas y baja de citocininas resultan en la formación de raíces o embriones somáticos; concentraciones similares de ambas inducen la formación de tejido calloso; y concentraciones altas de citocininas y bajas de auxinas propician la formación de brotes adventicios y proliferación de yemas (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1999).

Usualmente la adición de citocininas al medio de cultivo es suficiente para inducir la generación de brotes adventicios; sin embargo, en algunas especies es necesario añadir auxinas en bajas concentraciones –además de las citocininas- para lograr este propósito. Hurny y Benková (2017) mencionan que “las citocininas promueven la proliferación de células indiferenciadas, mientras que las auxinas coordinan la organogénesis en la zona periférica”. En otras palabras, se requiere de citocininas para inducir la generación de brotes, y auxinas para su diferenciación y desarrollo; es posible que, en algunos casos, los explantes presenten concentraciones de auxinas endógenas demasiado bajas para soportar el desarrollo de los brotes generados.

#### **1.2.4 Micropropagación**

La micropropagación es un método que puede ser utilizado para complementar esquemas de manejo de especies vegetales amenazadas, ya que gracias a estas técnicas se puede generar un gran número de plantas a partir de un solo individuo a través de propagación vegetativa (Liao *et al.*, 2016). Las especies que pudieran beneficiarse particularmente de esta aplicación son aquellas que presentan un patrón reproductivo complejo, poblaciones

pequeñas y ciclos de vida largos (Loyola-Vargas y Ochoa-Alejo, 2012); tal es el caso de muchos agaves.

Liao y col. (2016) señalan que la micropropagación tiene muchas ventajas, pues es un método rápido, se asegura que el material vegetal esté libre de patógenos, es económico, requiere poco espacio, es eficiente, y no se ve afectado por cambios climáticos ni estacionales.

Thorpe (2012) señala que hay tres vías para lograr la micropropagación de una especie: 1) potenciar la brotación de yemas axilares; 2) producción de yemas axilares adventicias, ya sea directa o indirecta; 3) embriogénesis somática directa o indirecta. La generación indirecta consiste en obtener primero tejido caloso, a partir del cual se genera la yema adventicia o el embrión somático.

Se recurre al uso de micropropagación en los programas de conservación de especies amenazadas para incrementar el número de los individuos disponibles con el fin de reintroducirlas a su hábitat natural, o bien, para su preservación *ex situ*. En el caso de especies sobreexplotadas por su uso ornamental, medicinal, alimenticio, los individuos generados *in vitro* pueden cubrir las necesidades del mercado, para así aliviar la presión sobre las poblaciones silvestres (Pence, 1999). Así pues, aunque Benson (1999) advierte que se debe sopesar cuidadosamente el uso de métodos biotecnológicos en programas de conservación, también señala que estos pueden permitir la implementación de programas de uso sustentable para el aprovechamiento de especies de interés económico.

También se ha señalado que las plantas obtenidas con técnicas de cultivo de tejidos vegetales *in vitro* muestran estabilidad genética; sin embargo, pueden ocurrir alteraciones genéticas y epigenéticas (De la Peña *et al.*, 2012). Esto no es indeseable *per se*, incluso algunos autores la consideran una alternativa valiosa, pues además de recuperar “numéricamente” a las poblaciones naturales, se puede enriquecer la diversidad genética a través de la variación somaclonal (Loyola-Vargas y Ochoa-Alejo, 2012). Se debe tener una aproximación muy cautelosa al aplicar este fenómeno en especies ecológicamente vulnerables; no obstante, es conveniente estudiar el potencial y factibilidad de utilizar esta metodología en la recuperación de la diversidad genética de especies severamente diezmadas.

Ciertamente el escenario ideal sería conservar a las especies vegetales junto con las comunidades bióticas y ecosistemas a los que pertenecen, preservando su variabilidad genética original. Desafortunadamente, en muchas ocasiones esto no es posible. El problema de la pérdida de especies vegetales es complejo, multifactorial, y por lo tanto la solución debe ser integral y multidisciplinaria; las técnicas de cultivo de tejidos vegetales son una herramienta muy valiosa, y deben ser incluidas en esquemas integrales de manejo y recuperación de poblaciones naturales amenazadas o en peligro de extinción.



### 1.3 USO DE MARCADORES MOLECULARES PARA EVALUAR VARIACIÓN SOMACLONAL

Como se señaló en el apartado anterior, una de las inquietudes que despierta el uso de CTV respecto a la conservación de germoplasma *ex situ* de especies vulnerables es la estabilidad genética del material vegetal a lo largo de los procesos a los que es sometido. Los cambios en el fenotipo y genotipo de plantas cultivadas *in vitro* se conocen como variación somaclonal, e incluyen alteraciones cromosómicas (se han observado poliploidía, aneuploidía, deleciones, pérdida de satélites, translocaciones, entre otras), mutaciones, alteraciones en el nivel de expresión de ácido ribonucleico y proteínas (Lynch, 1999; Harding, 1999).

Lynch (1999) señala que entre más viejos y especializados sean los explantes utilizados para el establecimiento *in vitro* de una especie, las posibilidades de que se presente variación en las plantas generadas a partir de estos explantes son mayores.

Lynch (1999) también advierte que algunos RCV son mutágenos, y en diversos estudios se ha atribuido el surgimiento de variantes fenotípicas al uso de altas concentraciones de auxinas y citocininas. Hay evidencias de que el 2,4-D causa más problemas que otras auxinas, que van desde aumentar la frecuencia de mutaciones hasta incrementar el nivel de ploidía en algunas especies.

Se ha reportado que tanto citocininas como auxinas alteran la expresión de genes *KNOX* en *A. thaliana*, y las giberelinas hacen lo propio en plantas de coco; asimismo, hay estudios que muestran que estos genes *KNOX* están asociados a la organogénesis en *A. tequilana* (De la Peña *et al.*, 2012).

Por otra parte, se pueden presentar modificaciones en los patrones de metilación de tejidos vegetales cultivados *in vitro* que puede alterar los patrones de desarrollo normales; aún más, estos cambios epigenéticos son heredados, y a la postre pueden ocasionar inestabilidad genética (Harding, 1999). De la Peña y col. (2012) evaluaron los patrones de metilación de plantas de *A. fourcroydes* y *A. angustifolia* cultivadas en medio semisólido y en biorreactores, y posteriormente adaptadas a tierra. Encontraron que la tasa de metilación de cada especie permanece igual ya sea que se cultive en medio sólido o líquido. Sin embargo, la tasa de metilación de *A. angustifolia* se duplicó al pasarla a tierra, mientras que la de *A. fourcroydes* presentó un pequeño incremento, de entre 1 y 3%; notablemente, las plantas de *A. angustifolia* mostraron un pobre desarrollo *ex vitro* o murieron, mientras que las plantas de *A. fourcroydes* presentaron una alta tasa de supervivencia y un desarrollo adecuado, lo que sugiere una relación entre los patrones de metilación y el desempeño *ex vitro* de las plantas obtenidas mediante CTV.

El uso de marcadores moleculares es crucial para evaluar la estabilidad genética de tejidos vegetales cultivados *in vitro* (Benson, 1999). Hay varios marcadores moleculares



TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

disponibles, con los que es posible evaluar la variabilidad genética del material vegetal que se mantiene y propaga *in vitro*; Harris (1999) señala que todos tienen limitaciones, y la elección de uno o más de ellos depende de varios factores, primordialmente del problema metodológico que se aborda. La tabla 2 presenta el resumen realizado por Harris (1999) de las características de los marcadores moleculares utilizados en estudios de biodiversidad.

De especial interés en este trabajo son los microsatélites, también conocidos como repeticiones de secuencia simple (SSRs), son secuencias de uno a diez nucleótidos repetidos en tándem; presentan una tasa de mutación de  $10^3$  a  $10^6$  por cada generación de células (Carneiro-Vieira *et al.*, 2016) y se encuentran tanto en regiones codificantes como no codificantes distribuidas en todo el genoma; cabe señalar que los SSRs intragénicos suelen presentarse en tripletes, y el más común en monocotiledóneas es CCG (Kalia *et al.*, 2011). El polimorfismo que exhiben entre diferentes individuos reside en la diferencia en el número de repeticiones, y actualmente se acepta que juegan un rol importante en la plasticidad fenotípica de diversos grupos de seres vivos, incluso en plantas (Carneiro-Vieira *et al.*, 2016).

Los SSRs han resultado útiles para el estudio tanto de especies silvestres como cultivadas; se han utilizado profusamente debido a que “son marcadores genéticos altamente informativos, codominantes, multi-alélicos que son experimentalmente reproducibles y transferibles entre especies relacionadas” (Carneiro-Vieira *et al.*, 2016); los SSRs permiten evaluar el flujo genético y el potencial de introgresión gracias al gran número de alelos que presentan; también se han utilizado para caracterizar los patrones de diversidad genética dentro de una colección de tejido vegetal (Harris, 1999).

Se ha desarrollado una técnica que combina los SSR con los RAPD que se denomina polimorfismo de microsatélites amplificados al azar (*random amplified microsatellite polymorphism*, RAMP); consiste en utilizar un oligonucleótido complementario al extremo 5' de un SSR, combinado con un primer diseñado para RAPD, es decir, un decámero de secuencia arbitraria; los productos amplificados pueden proceder del propio sitio del SSR o de la secuencia que se encuentra entre los sitios de unión de ambos primers (Kalia *et al.*, 2011). De este modo se pueden detectar y mapear polimorfismos en microsatélites sin necesidad de clonarlos y secuenciarlos (Zhang *et al.*, 2005).

Tabla 2. Características de los marcadores moleculares utilizados en estudios de biodiversidad (Harris, 1999).

	<b>Aloenzimas</b>	<b>RFLP</b>	<b>RAPD</b>	<b>AFLP</b>	<b>PCR-RFLP</b>	<b>SSR</b>	<b>SSCP</b>	<b>Secuenciación</b>
Bases	Detección de la distribución de AA cargados	Detección de las posiciones relativas de sitios de restricción	Distribución de primers aleatorios a través del genoma	PCR de subconjuntos de fragmentos de restricción usando primers modificados	Digestión de sitios de restricción de productos PCR	PCR de regiones repetidas de secuencias simples	El ssDNA adquiere diferentes estructuras en geles no-desnaturalizantes	Secuenciación directa de productos de PCR
Polimorfismo	Sustituciones de AA cargados	Sustitución de nucleótidos; INDELS; inserciones	Sustitución de nucleótidos; INDELS; inserciones	Sustitución de nucleótidos; inserciones; inserciones	Sustitución de nucleótidos; INDELS; inserciones	Cambios en la longitud de las repeticiones	Sustitución de nucleótidos; INDELS; inserciones	Sustitución de nucleótidos; INDELS; inserciones
Abundancia en el genoma	Baja	Alta	Muy alta	Alta	Alta	Media	Media	Alta
Nivel de polimorfismo	Bajo	Medio	Medio	Medio	Medio	Alto	Alto	Medio
Dominancia	Usualmente codominante	Codominante	Dominante	Codominante/dominante	Codominante	Codominante	Codominante	Codominante
Cantidad de material	Muy poca	2-10 µg DNA	10-25 ng DNA	1-2 µg DNA	50-100 ng DNA	50-100 ng DNA	50-100 ng DNA	10-25 ng DNA
Relación multiplex	¿?	1-2	5-10	30-100	Bajo	1	¿?	¿?
Información de secuencia	NO	NO	NO	NO	SI	SI	NO	SI
Detección con radioactividad	NO	SI/NO	NO	SI/NO	NO	NO/SI	NO/SI	NO/SI
Costos de desarrollo	Bajo	Medio	Bajo	Medio	Medio/alto	Alto	Medio	Medio
Costos de inicio	Bajo	Medio/alto	Bajo	Medio	Alto	Alto	Medio	Alto
Aplicaciones	Diversidad genética; poliploidía; hibridación; filogenia; sistemas de reproducción.	Diversidad genética; poliploidía; hibridación; filogenia; sistemas de reproducción.	Huella génica; diversidad genética; poliploidía; hibridación; filogenia.	Huella génica; diversidad genética	Diversidad genética; poliploidía; hibridación; filogenia	Diversidad genética; sistemas de reproducción.	Diversidad genética; sistemas de reproducción.	Diversidad genética; poliploidía; hibridación; filogenia
Automatización	No	Limitada	Si	Si	Limitada	Si	Limitada	Si
Reproductibilidad	Media/alta	Alta	Baja	Media	Alta	Alta	Media	Alta

AA, aminoácido; AFLP, polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados; PCR, reacción en cadena de la polimerasa; PCR-RFLP, reacción en cadena de la polimerasa-polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción; RAPD, DNA polimórfico amplificado al azar; RFLP, polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción; SSCP, polimorfismo de la conformación de cadena sencilla; ssDNA, DNA de cadena sencilla; SSR, repeticiones de secuencia simple; INDELS, pequeñas inserciones-delecciones.

#### 1.4 BIORREACTORES PARA EL CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES

Según Mamun y col. (2015) los biorreactores son “sistemas cerrados, estériles para la propagación clonal de propágulos organogénicos o embriones somáticos”.

Aunque no hay una definición precisa para el término biorreactor, se usa para referirse a recipientes utilizados para producción vegetal a gran escala que pueden conectarse a diferentes dispositivos para controlar diversos parámetros fisicoquímicos, con el objeto de cultivar células, tejidos, embriones somáticos o propágulos en suspensiones líquidas (Prail, 2005; Paek *et al.*, 2005).

Diversos autores señalan que el uso de biorreactores y medios líquidos para el cultivo de tejidos vegetales tiene varias ventajas sobre el uso de medios semisólidos (Paek *et al.*, 2005; Ziv, 2005; Takayama y Akita, 2005; Berthouly y Etienne, 2005; Afreen, 2008; Dewir *et al.*, 2014):

- El contacto directo de los tejidos vegetales con el medio de cultivo incrementa la disponibilidad de nutrientes y reguladores de crecimiento vegetal.
- Las condiciones de cultivo son mucho más uniformes.
- Es factible renovar el medio de cultivo sin cambiar el recipiente de cultivo.
- Se reduce el efecto negativo de sustancias exudadas por el propio explante que podrían tener un efecto inhibitorio, al diluirse en el medio líquido.
- Se incrementa la oxigenación, lo que usualmente se traduce en un aumento en la producción de biomasa.
- En algunos modelos en los que el material vegetal está en movimiento se reduce la dominancia apical, lo que resulta en un mayor desarrollo de yemas
- Se pueden reducir los costos de producción, comenzando por el hecho de que se prescinde de gelificantes.
- Abre la posibilidad de escalar con mayor facilidad los procesos de propagación; entre otras razones, porque se pueden utilizar recipientes de cultivo y volúmenes de medio de cultivo mayores.
- Es susceptible a automatización y regulación más precisa de factores físicos y químicos.

En la tabla 3 se muestra una relación de los principales tipos de biorreactores utilizados en el cultivo de tejidos vegetales *in vitro*.

Tabla 3. Comparación de los distintos tipos de biorreactores. Construida con información de Eibl y Eibl, 2008; Afreen, 2008; Stiles y Liu, 2013.

	Tipo	Características	Ventajas	Desventajas
Agitación mecánica	Tanques de aireación	Presentan un dispositivo de agitación, usualmente una propela.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Diseño probado, derivado de biorreactores para cultivos microbianos</li> <li>• Oxigenación eficiente.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Efecto cizalla daña tejidos vegetales.</li> <li>• Hiperhidratación de tejidos.</li> <li>• Formación de vapor.</li> </ul>
	Tanques de tambor rotatorio	Recipientes cilíndricos que giran.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Oxigenación eficiente.</li> <li>• Poco daño mecánico.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hiperhidratación de tejidos.</li> </ul>
Agitación neumática o sin agitación	Columna de burbujas	Cilindros con un rociador en la base que introduce aire en el medio de cultivo, generando burbujas.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Estrés mecánico mínimo.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Las burbujas pueden dañar tejidos vegetales delicados.</li> <li>• Generación de espuma</li> <li>• Pobre transferencia de oxígeno.</li> <li>• Distribución heterogénea de nutrientes y biomasa.</li> <li>• Intercambio gaseoso limitado.</li> <li>• Hiperhidratación de tejidos.</li> </ul>
	Airlift	Cilindros con un rociador en la base, y con un tubo de aspiración que evita la coalescencia de burbujas.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Distribución de nutrientes homogénea</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Generación de espuma</li> <li>• Pobre transferencia de oxígeno</li> <li>• Distribución heterogénea de biomas</li> <li>• Intercambio gaseoso limitado.</li> <li>• Hiperhidratación de tejidos.</li> </ul>
	De ola, con bolsas de plástico con agitación	Bolsas desechables que se colocan sobre una placa que se inclina horizontalmente para producir un movimiento tipo ola	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Oxigenación y agitación apropiadas</li> <li>• Reducción en el tiempo de limpieza y esterilización.</li> <li>• Poca formación de espuma.</li> <li>• Bajo riesgo de</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Intercambio gaseoso limitado.</li> <li>• Hiperhidratación de tejidos.</li> </ul>

			contaminación.	
Biorreactores de fase gaseosa	El medio se suministra mediante rocío o niebla	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Intercambio gaseoso más eficiente.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Para el cultivo de tejidos es indispensable el uso de matrices (mallas, por ejemplo)</li> </ul>	
Inmersión temporal	El medio está en un compartimiento o recipiente distinto a los explantes; el medio se pone en contacto con los explantes de manera intermitente.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Susceptible a automatización y a llevarse a gran escala.</li> <li>• Reducción de hiperhidratación.</li> <li>• Reducción del estrés mecánico para los tejidos vegetales.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Es necesario implementar protocolos para cada especie y variedad; se deben dedicar tiempo y recursos a determinar distintas variables, especialmente frecuencias y tiempos de inmersión.</li> </ul>	

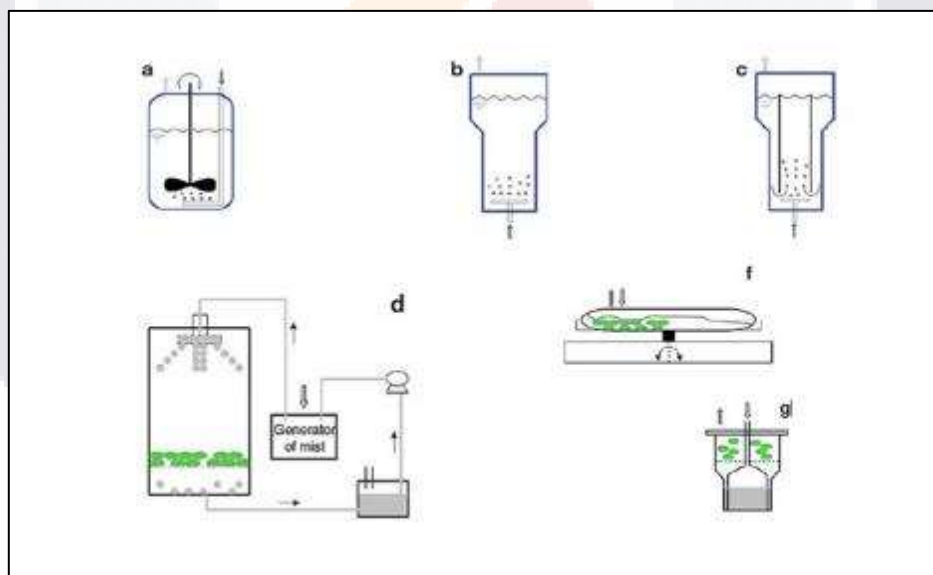


Fig. 1. Esquema de biorreactores para cultivos de tejidos vegetales *in vitro*. a) Biorreactor de tanque agitado, (b) biorreactor de columna de burbujas, (c) biorreactor de air-lift, (d) biorreactor de niebla, (e) biorreactor de ola, (f) RITA. Adaptado de Georgiev, 2014.

En los biorreactores en los que los explantes están permanentemente sumergidos (Fig. 1, incisos a, b y c), se presentan desórdenes fisiológicos serios, como la vitrificación, caracterizada por la hiperhidratación de los tejidos, reducción del contenido de clorofila, hipolignificación, reducción de la capa epicuticular de ceras y cambios en la actividad

enzimática. También resultan afectados negativamente el crecimiento y morfogénesis (Berthouly y Etienne, 2005; Afreen, 2008). Estos desórdenes tienen su origen en el estrés oxidativo que causa a los tejidos el estar sumergidos permanentemente (Ziv, 2005).

En cambio, con el uso de biorreactores de inmersión temporal (Fig. 1, inciso g) se reducen la vitrificación y el estrés mecánico, y se incrementa el crecimiento (Afreen, 2008), reportándose tasas de proliferación hasta cinco o seis veces mayores en estos sistemas, comparados con cultivos en medios semisólidos (Berthouly y Etienne, 2005). Esto se debe a la ventilación y expulsión de gases como el etileno y CO<sub>2</sub> gracias a la transferencia periódica del medio, y a que toda la superficie del explante está en contacto con el medio, absorbiendo nutrientes y RCVs (Prail, 2005). Un sistema adecuado de aireación también permite que haya una concentración adecuada de oxígeno, tanto en la fase gaseosa del recipiente como disuelto en el medio de cultivo; de lo contrario, el crecimiento y la diferenciación de los tejidos pueden verse inhibidos (Ziv, 2005).

Otro aspecto importante es el tipo de explante a inocular en el biorreactor; según Takayama y col. (2005) los explantes apropiados pueden ser:

- a) Brotes con yemas múltiples
- b) Tejidos regenerativos como protocormos, tejidos meristemáticos o embriogénicos.
- c) Embriones somáticos
- d) Tallos o brotes con numerosas yemas axilares.

Estos inóculos se suelen generar en cultivos realizados en medio semisólido, y el objetivo es producir plantas de tamaño apto para ser transplantadas (Takayama y Akita, 2005); en otras palabras, la etapa de cultivo en biorreactor no necesariamente apunta a **generar** un gran número de brotes, sino a lograr **el crecimiento y la diferenciación** de los brotes, ya sea que se hayan inducido en el propio biorreactor o en una etapa previa.

El potencial de los biorreactores es enorme. Como se mencionó líneas arriba, es imprescindible buscar las condiciones apropiadas para cada especie y cada aplicación, en cuanto a la formulación del medio, el uso de RCVs, frecuencia y tiempos de inmersión. Previo a todo ello, es muy importante contar con biorreactores de bajo costo, fáciles de ensamblar, esterilizar, inocular y operar.

### **1.5 ANTECEDENTES DE LA PROPAGACIÓN *in vitro* DE *Agave***

Hay varias aplicaciones del CTV que resultan útiles para estudiar y aprovechar los agaves; una de las más atractivas es la micropropagación, pues a través de ella se pueden obtener ejemplares para su aprovechamiento comercial, y, desarrollando esquemas apropiados, también para reforestación de áreas naturales.

La micropropagación se puede lograr a través de la organogénesis o de la embriogénesis somática, ya sea que los brotes o embriones somáticos se generen a partir del explante



original (directa), o que inicialmente se genere tejido calloso y a partir de este los brotes o embriones somáticos (indirecta) (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1999).

Se ha logrado obtener tejido calloso de algunas especies de *Agave*, por ejemplo, en *A. fourcroydes* se obtuvo callo friable a partir de segmentos internodales de rizoma al añadir al medio de cultivo 0.25 mg/L 2,4-D y 1.0 mg/L de BA (Robert *et al.*, 1987). En *A. tequilana* generaron tejido calloso a partir de segmentos de tallo al utilizar 2,4-D combinado con zeatina o BA (Valenzuela-Sánchez *et al.*, 2006), mientras que en *A. arizonica* utilizaron segmentos basales de hojas de bulbillos y medio MS adicionado con 1.4  $\mu\text{M}$  2,4-D y 555  $\mu\text{M}$  de inositol con el mismo propósito (Powers y Backhaus, 1989).

### 1.5.1 Organogénesis directa e indirecta

Se han realizado estudios en diversas especies de agaves para determinar las condiciones óptimas para lograr una organogénesis exitosa, ya sea directa o indirecta; se muestra un sumario en la tabla 4.

Tabla 4. Antecedentes en la micropropagación del género *Agave*

Especie	Reguladores	Explant	Brotos por explante	Tiempo	Fuente
<i>A. fourcroydes</i>	0.025 mg/L 2,4-D y 10.0 mg/L de BA	Callo friable	15	12-16 semanas	Robert <i>et al.</i> , 1987
<i>A. arizonica</i>	5.4 $\mu\text{M}$ NAA	Callo	5-10	12 semanas	Powers y Backhaus, 1989
<i>A. cantala</i>	0.075 mg/L NAA, 0.1 mg/L IBA y 0.5 mg/L de Kin	Segmentos de tallo de plántulas	4	4-5 semanas	Binh <i>et al.</i> , 1990
<i>A. sisalana</i>	44.0 $\mu\text{M}$ BA	Bloques de rizoma	12 $\pm$ 2	60 días	Das, 1992
<i>A. parrasana</i>	53.2 $\mu\text{M}$ BA	Yemas axilares	48.6 $\pm$ 10.2	60 días	Santacruz-Ruvalcaba <i>et al.</i> , 1999
<i>A. tequilana</i>	0.55 $\mu\text{M}$ 2,4-D y 44 $\mu\text{M}$ 2,4-D $\mu\text{M}$ de BA.	Callo	CFB 14.5		Valenzuela-Sánchez <i>et al.</i> , 2006
<i>A. salmiana</i>	2.0 mg/L BA + 0.25 mg/L AIA	Cilindros de tallo	20.3	45 días	Silos-Espino <i>et al.</i> , 2010

<i>A. tequilana</i>	Pulsos de 3 días con 6.8 mM 2,4-D	Tallo de brotes jóvenes	12	60 días	Ramírez-Malagón <i>et al.</i> , 2008
<i>A. salmiana</i> sub. <i>crassispina</i>	0.49 µM IBA y 4.44 µM BA	Tallo de brotes jóvenes	3		
<i>A. duranguensis</i>	0.049 µM IBA y 4.44 µM BA	Tallo de brotes jóvenes	5.9		
<i>A. oscura</i>	2.46 µM IBA y 4.44 µM BA	Tallo de brotes jóvenes	12.8		
<i>A. pigmaea</i>	0.49 µM IBA y 13.31 µM BA	Tallo de brotes jóvenes	5.6		
<i>A. victoriae-reginae</i>	2.46 µM IBA y 2.22 µM BA	Tallo de brotes jóvenes	5.5		
<i>A. cupreata</i>	1.5 mg/L BA	Segmentos de tallo	10.5	90 días	Domínguez-Rosales <i>et al.</i> , 2008
<i>A. difformis</i>	0.2 mg/L TDZ		8.5		
<i>A. karwinskii</i>	1mg/L BA		6.1		
<i>A. obscura</i>	0.2mg/L TDZ		11		
<i>A. potatorum</i>	3 mg/L Cin		6.9		
<i>A. salmiana</i>	10 mg/L BAP + 0.04 mg/L 2,4-D	Plántulas	14±0.7	60 días	Puente Garza <i>et al.</i> , 2015

Robert y col. (2016) reportaron un protocolo utilizado para micropropagar *A. fourcroydes* var. Yaax Ki, *A. fourcroydes* var. Kitam Ki, *A. tequilana*, *A. letonae*, *A. angustifolia* var. Marginata, *A. angustifolia* var. Bacanora, *A. sisalana*, *A. amaniensis*, a partir de ápices de brotes de 25-40 cm de alto y de preferencia aún adheridos a la planta madre, obteniendo bloques de tejido de 0.8 cm<sup>2</sup> y colocándolos en MS con el contenido de nitrógeno modificado (10 mM KNO<sub>3</sub> y 5 mM de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>), y adicionado con 0.11 uM de 2,4-D y 44.4 uM de BA para su establecimiento *in vitro*, y 0.11 uM de 2,4-D y 4.43 uM de BA para su proliferación. Indican que en ocasiones los brotes enraizan espontáneamente, y cuando no es así recomiendan la adición de auxinas al medio de cultivo.

### 1.5.2 Embriogénesis somática

Esta vía de propagación *in vitro* tiene varias ventajas, una de las principales es la posibilidad de generar variabilidad genética en caso de que se trate de embriogénesis somática indirecta (Monja-Mio y Robert, 2016).

Para obtener embriones somáticos se pueden manipular varios factores, como el tipo de explante, composición del medio de cultivo, uso de RCVs; sin embargo, un factor determinante es el genotipo del material vegetal utilizado, por lo que en ocasiones los protocolos propuestos no tienen alta reproductibilidad. El genotipo influye no solo en la inducción (la generación de embriones somáticos) sino también en su diferenciación y desarrollo (Monja-Mio y Robert, 2016). Así pues, el primer reto para lograr la embriogénesis somática es obtener callo embriogénico, pero después es indispensable encontrar las condiciones apropiadas para que los embriones se desarrollen y formen plantas completas.

En *A. victoriae-reginae* se obtuvo callo embriogénico al colocar tallos de plántulas en medio suplementado con 2,4-D en concentraciones de 2.26 y 4.52  $\mu\text{M}$ ; al transferir los embriones somáticos a medio MS sin reguladores, estos se desarrollaron para formar plantas completas (Martínez-Palacios *et al.*, 2003).

Monja-Mio y Robert (2016) señalan que se ha logrado la embriogénesis somática indirecta en varias especies (*A. tequilana*, *A. angustifolia*, *A. vera-cruz*, *A. sisalana*) utilizando auxinas como 2,4-D, NAA, dicamba y picloram solas o combinadas con las citocininas BA y KIN, y que se ha logrado el desarrollo de los embriones aumentando la concentración de sacarosa en el medio de cultivo a 40 g/L (*A. vera-cruz*, *A. victoriae-reginae*), con el uso de citocininas (*A. fourcroydes*, *A. sisalana*, *A. vera-cruz*), utilizando medio de cultivo con la mitad de la fuerza iónica (*A. victoriae-reginae*, *A. angustifolia*, *A. fourcroydes*), o añadiendo compuestos nitrogenados como caseína (*A. tequilana*).

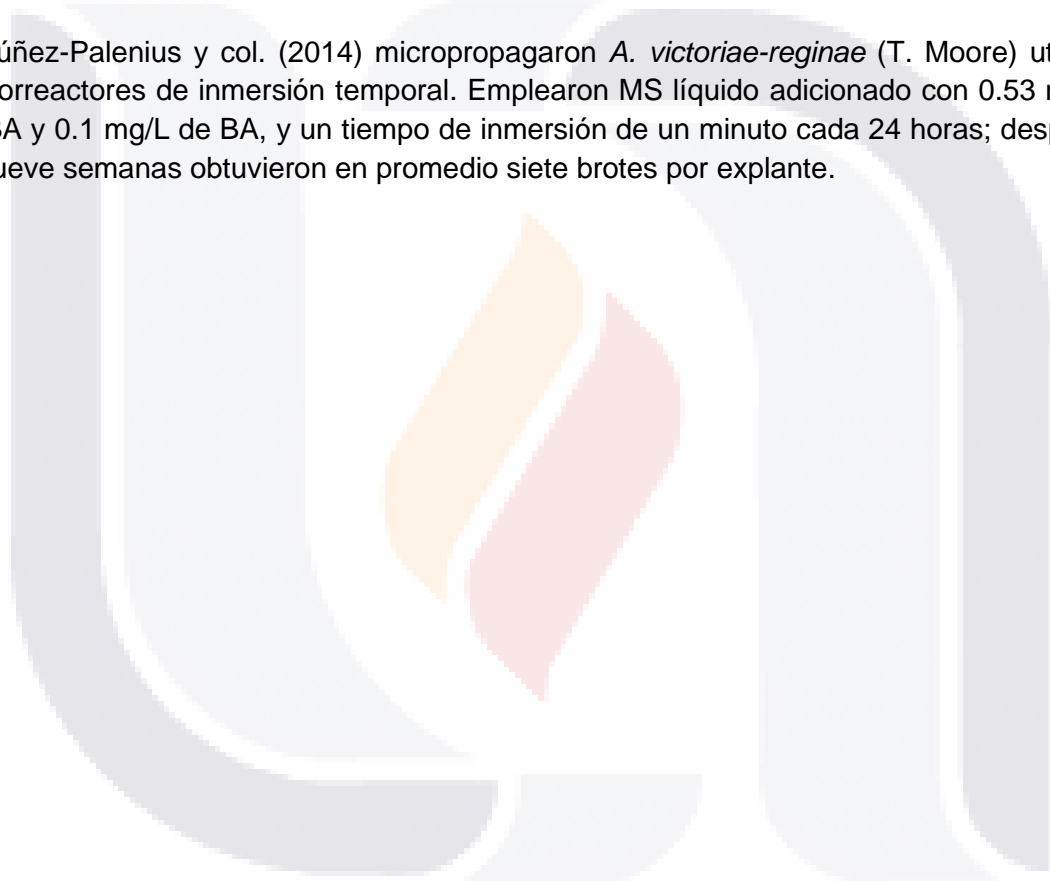
### 1.5.3 Enraizamiento

En los protocolos de micropropagación por organogénesis se debe lograr el enraizamiento de los brotes para poder adaptarlos a suelo. Según lo reportado por varios autores, en el género *Agave* el enraizamiento de los brotes usualmente ocurre en medio MS, sin necesidad de adicionar RCVs (Santacruz-Ruvalcaba *et al.*, 1999; Puente-Garza *et al.*, 2015). Cuando los brotes no enraízan espontáneamente se recomienda la adición de auxinas al medio de cultivo (Robert *et al.*, 2016); por ejemplo, Silos y col. (2010) lograron el mejor enraizamiento de brotes generados *in vitro* de *A. salmiana* con 0.2 mg/L AIA, ya que con este tratamiento presentaron un promedio de cuatro raíces primarias de mayor longitud que los tratamientos alternativos

#### 1.5.4 Micropropagación empleando biorreactores

De la Peña y col. Cultivaron *A. fourcroydes* y *A. angustifolia* en medio semisólido y en biorreactores modulares, y reportaron que las plantas de ambas especies cultivadas en biorreactores fueron más cortas, pero más vigorosas y presentaron coloración más intensa que aquellas cultivadas en medio semisólido. Después de dos meses de haberlas adaptado a suelo, el 90% de las plantas de *A. fourcroydes* sobrevivieron y se desarrollaron adecuadamente, mientras que la mayoría de las plantas de *A. angustifolia* murieron, y las pocas que sobrevivieron se desarrollaron pobremente, presentando poco crecimiento, poco desarrollo radical y coloración pálida (De la Peña *et al.*, 2012).

Núñez-Palenius y col. (2014) micropropagaron *A. victoriae-reginae* (T. Moore) utilizando biorreactores de inmersión temporal. Emplearon MS líquido adicionado con 0.53 mg/L de IBA y 0.1 mg/L de BA, y un tiempo de inmersión de un minuto cada 24 horas; después de nueve semanas obtuvieron en promedio siete brotes por explante.



## II. JUSTIFICACIÓN

El género *Agave* tiene su centro de origen y diversificación en México; aproximadamente el 75% de las 200 especies que se han registrado se encuentran en nuestro país, muchas de ellas endémicas. Son plantas extraordinariamente bien adaptadas a condiciones de sequía, altas temperaturas, y a suelos pobres en nutrientes; pero su tasa de crecimiento es muy lenta, tardan entre 8 y 20 años en reproducirse sexualmente, y la gran mayoría son semélparos. La mayoría de las especies también puede reproducirse asexualmente, formando brotes o “hijuelos” a partir del rizoma o en el tallo de la inflorescencia.

Entre la gran cantidad de usos que se les ha dado a los agaves o magueyes desde épocas prehispánicas se destacan la elaboración de bebidas fermentadas y destiladas, la obtención de fibras y el uso de diversas partes de las plantas como alimento. Actualmente se están explotando otras propiedades del género, y se han comenzado a industrializar y comercializar edulcorantes y prebióticos elaborados a partir de agaves; asimismo se exploran metabolitos secundarios con propiedades farmacológicas. Mención especial merece el hecho de que en los últimos años ha aumentado la demanda por mezcales artesanales, que en muchos casos son elaborados con plantas silvestres, lo que ha agravado la presión sobre poblaciones naturales de varias especies.

Los agaves son un elemento muy importante en los ecosistemas de zonas áridas y semiáridas, y la sobreexplotación de sus poblaciones naturales es alarmante. Sin embargo, su aprovechamiento es importante desde el punto de vista cultural y social, y los productos que se pueden obtener de ellos tienen gran valor comercial, y en algunos casos terapéutico. Lo más recomendable es desarrollar estrategias integrales de aprovechamiento que por un lado permitan su explotación racional, su uso sustentable, y por otro eviten la reducción de las poblaciones naturales y la pérdida de diversidad genética de estas especies. El uso de técnicas de cultivo de tejidos vegetales *in vitro*, particularmente el uso de biorreactores de inmersión temporal, pueden permitir obtener un gran número de individuos que podrían utilizarse para estudiar compuestos de interés, para la producción de metabolitos secundarios *in vitro*, y para la generación de plantas que luego podrían cultivarse e incluso usarse para la reforestación de áreas naturales.

### III. HIPÓTESIS

Es posible generar un mayor número de brotes en especies del género *Agave* utilizando biorreactores de inmersión temporal, en comparación a los obtenidos utilizando medio semisólido; los brotes generados en el sistema BIT conservarán la fidelidad genética con respecto a las plantas madre.

### IV. OBJETIVOS

#### 4.1 Objetivo General:

Desarrollar sistemas para la propagación masiva *in vitro* de varias especies mexicanas de *Agave* en biorreactores de inmersión temporal, y analizar la fidelidad genética de las plantas generadas mediante marcadores moleculares.

#### 4.2 Objetivos particulares:

1. Multiplicar en medio semisólido las especies de interés, con tratamientos establecidos en estudios previos o determinados experimentalmente, según sea el caso.
2. Determinar el mejor tipo de explante de *Agave* para micropropagar en biorreactores de inmersión temporal.
3. Determinar las condiciones de los biorreactores más apropiadas para generar brotes de varias especies de *Agave*.
4. Evaluar otros tratamientos empleando reguladores de crecimiento vegetal para aumentar la producción de brotes de agaves en biorreactores.
5. Determinar las condiciones más apropiadas para lograr la exitosa aclimatación y establecimiento en suelo de las plántulas generadas *in vitro*.
6. Evaluar el desarrollo inicial en suelo de los ejemplares de agave generados en biorreactores.
7. Evaluar la fidelidad genética de las plantas de agave micropropagadas en biorreactores de inmersión temporal mediante marcadores moleculares tipo RAMP (polimorfismos de microsatélites amplificados al azar).



## V. MATERIALES Y METODOS

### 5.1 Planteamiento experimental

Al iniciar el presente trabajo, se consideró trabajar con doce especies de agaves; sin embargo, tres de ellas (*A. bracteosa*, *A. salmiana* y *A. victoriae-reginae*) se descartaron antes de comenzar a montar experimentos por no contar con material vegetal libre de contaminación.

La decisión de someter a cada una de las nueve especies restantes a los experimentos que se muestran en la tabla 8 se tomó considerando la información disponible en la literatura, para los dos primeros experimentos, y para el resto la respuesta de los cultivos al tratamiento inmediato anterior.

Es conveniente señalar que se contó con un número limitado de BITs, por lo que los experimentos realizados en ellos no se montaron de manera simultánea sino secuencial; por tal motivo, la etapa de experimentación en BITs y las siguientes (a saber, enraizamiento, aclimatación y adaptación a suelo) se fueron completando conforme se obtenían tanto los datos como el material vegetal de la etapa inmediata anterior.

Por otra parte, algunas especies mostraron una excelente respuesta, generando un gran número de brotes en las etapas iniciales e intermedias, lo que hizo posible contar con una cantidad de material vegetal considerable para los experimentos de la etapa final (enraizamiento, aclimatación y adaptación a suelo); mientras que en otras especies la respuesta fue muy pobre, y en consecuencia la cantidad de material vegetal disponible para las etapas subsecuentes fue muy limitada.

El medio de cultivo utilizado en todos los protocolos fue el MS (Murashige y Skoog, 1962), adicionado con 30 g/L de sacarosa; en el caso del medio semisólido, también se le agregaron 9 g/L de agar. Fue esterilizado mediante autoclave a 120 °C durante 20 min. En lo subsecuente este medio será referido como medio basal líquido o semisólido, según sea el caso.

En los tratamientos que requirieron la adición de RCV o nanopartículas de plata, estos agentes se agregaron antes de esterilizar el medio de cultivo.

Tabla 5. Relación de experimentos realizados con cada una de las especies incluidas en este trabajo.

Especie	Propagación preliminar en medio semisólido		Respuestas morfológicas a combinaciones auxina/citocinina	Determinar capacidad de adaptarse a BITs	Determinar la frecuencia de inmersión en BITs	Efecto del 2iP y NPsAg en BITs	Evaluación de fidelidad genética	Enraizamiento	Adaptación a suelo
	Rep.*	Exp.**							
<i>A. angustifolia</i>	X			X					
<i>A. duranguensis</i>	X			X	X	X	X	X	X
<i>A. funkiana</i>	X			X	X	X	X	X	X
<i>A. gigantensis</i>		X		X	X	X	X	X	X
<i>A. guiengola</i>		X	X	X	X	X	X	X	X
<i>A. karwinskii</i>	X			X					
<i>A. potatorum</i>	X		X	X	X	X	X	X	X
<i>A. parrasana</i>		X		X					
<i>A. parryi</i>	X			X	X	X	X	X	X

\* La propagación se hizo en base a un tratamiento ya reportado en la literatura.

\*\* En el marco de este proyecto se llevaron a cabo experimentos con el fin de determinar un tratamiento adecuado para la propagación.

## 5.2 Obtención de material vegetal

El material vegetal utilizado se obtuvo de ejemplares previamente establecidos *in vitro* en el Banco de Germoplasma de la Unidad de Biotecnología Vegetal, adscrita al Centro de Ciencias Básicas de la Universidad Autónoma de Aguascalientes.

Para contar con suficiente material vegetal para experimentos posteriores, las especies *A. angustifolia*, *A. duranguensis*, *A. funkiana*, *A. karwinskii* y *A. parryi* fueron propagados en medio basal semisólido adicionado con 1 mg/L BA, de acuerdo con lo consultado en trabajos previos reportados en la literatura o realizados en la propia Unidad de Biotecnología Vegetal.

En el caso de *A. guiengola*, *A. gigantensis* y *A. parrasana*, especies para las que no había antecedentes, se realizó un experimento para determinar el tratamiento más eficiente para obtención de brotes. Para esto las tres especies fueron sometidas a cinco tratamientos que consistieron en medio basal semisólido adicionado con los siguientes RCVs del grupo de las citocininas: a) tratamiento control, sin RCVs; b) 1 mg/L BA; c) 2 mg/L BA; d) 1 mg/L 2iP; e) 1 mg/L 2iP. Se utilizaron diez explantes por tratamiento; para obtenerlos, se tomaron brotes adventicios a los cuales se les removió la raíz y la porción media y distal de las hojas. Los cultivos se mantuvieron a  $25 \pm 2$  °C, con un fotoperiodo de 16 h luz / 8 h oscuridad durante 60-65 días; transcurrido ese tiempo se contaron los brotes generados y se registraron otras respuestas cuando se presentaron. Se efectuaron tres réplicas de este experimento.

Algunos de los resultados obtenidos con el experimento anterior nos llevaron a probar otras condiciones con *A. guiengola* y *A. potatorum*. En estos casos se probaron dieciséis tratamientos en medio basal semisólido adicionado con BA (0, 1, 2 y 3 mg/L) y 2,4-D (0, 0.1, 0.5 y 1.0 mg/L). Se usaron diez explantes por tratamiento, procesados del mismo modo que en el experimento anterior. Los cultivos se mantuvieron a  $25 \pm 2$  °C, con un fotoperiodo de 16 h y una radiación de 54mmol m<sup>2</sup> s<sup>-1</sup> durante 60-65 días; transcurrido ese tiempo se registraron los resultados. También se realizaron tres réplicas de este experimento.

## 5.3 Embriogénesis somática

En algunos de los tratamientos probados con el objetivo de lograr la proliferación de brotes adventicios, en lugar del resultado esperado se generó callo aparentemente embriogénico, al que se le practicó una tinción diferencial para determinar si había o no embriones somáticos.

El procedimiento (modificado de Gupta y Holmstrom, 2005) consistió en colocar en un microtubo una pequeña muestra del callo presuntamente embriogénico, al que se le agregaron 100 µl de acetocarmín y luego se incubó en baño maría a 60°C hasta observar un viraje de color. Se lavó agregando agua a 60°C, se centrifugó a 1,500 - 2,000 r.p.m.

por 5 seg para colectar el tejido y se retiró el agua con una pipeta de transferencia; se repitió el lavado. En seguida se agregaron 80  $\mu$ l de solución de azul de Evans, y posteriormente se realizaron lavados con agua a 60°C, hasta que se eliminó el exceso de colorante y el sobrenadante se tornó transparente. El callo se colocó en caja de Petri y se observó en microscopio estereoscópico para evaluar la presencia de embriones somáticos.

## **5.4 Elección de las especies con mayor capacidad de adaptación a los biorreactores, y elección del tipo de explante**

### **5.4.1 Descripción de los biorreactores**

Los BIT utilizados fueron:

- I. Biorreactor de tanques gemelos modelo comercial CIT MiniBio® (Tecniproducos Orizaba);
- II. Biorreactor de tanques gemelos construidos en el propio laboratorio, y;
- III. BIT en serie modelo comercial (Tecniproducos Orizaba).

La operación de cada uno de estos sistemas se detalla a continuación:

El modelo de tanques gemelos, tanto el comercial como el construido en el laboratorio, consta de dos recipientes de vidrio con un volumen de 1 L conectados a través de una manguera. En uno de los recipientes se colocan los explantes, y en el otro 100 ml de medio de cultivo líquido; cada uno de los recipientes está conectado a una pequeña bomba de aire, que al encenderse presuriza el recipiente, obligando al medio líquido a pasar de uno a otro. El aire pasa a través de filtros hidrofóbicos de .22  $\mu$ m para mantener la esterilidad dentro del biorreactor (Fig. 2).

b) El modelo BIT en serie consiste de cinco recipientes de vidrio de 1 L conectados entre sí a través de mangueras de silicón; en cuatro de los recipientes se colocan los explantes, y en el quinto se colocan 600 ml de medio líquido, formando un sistema de vasos comunicantes; solo el recipiente con el medio de cultivo y el recipiente con explantes que se encuentra al otro extremo se conectan a una pequeña bomba de aire (Fig. 3). Cuando la bomba inyecta aire al recipiente que contiene el medio de cultivo, la presión del aire es la misma en todos los recipientes ya que estos están interconectados por las mangueras de silicón; y la presión es la misma sobre todos los puntos del medio de cultivo (principio de Pascal). Entonces, el medio de cultivo se distribuye en todos los recipientes comunicados, alcanzando el mismo nivel en todos ellos.

Debido a las dificultades para manipular y mantener la esterilidad del BIT en serie, solo se emplearon los BIT de tanques gemelos en los experimentos que se describen a continuación.

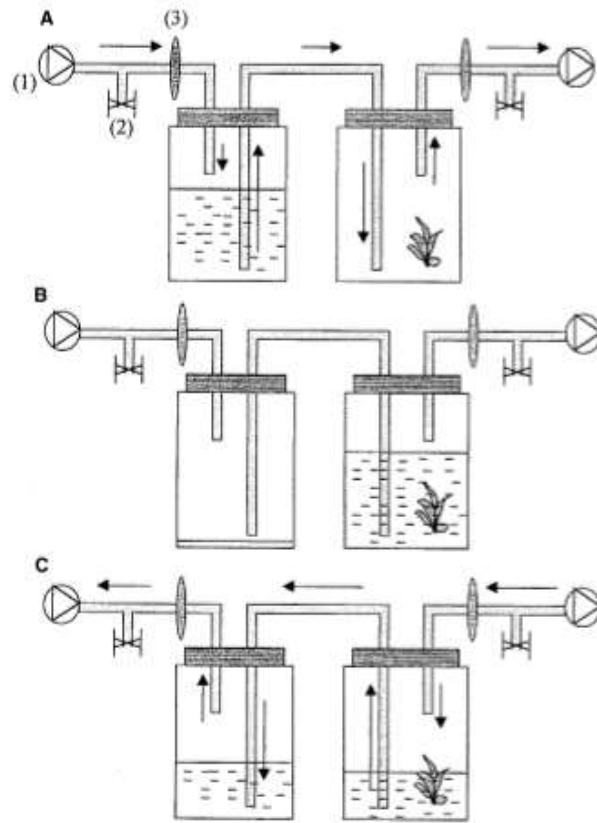


Figura 2. Esquema del funcionamiento de los biorreactores de inmersión temporal de tipo tanques gemelos (Escalona *et al.*, 1999). A. Una bomba genera un flujo de aire que pasa a través del filtro y empuja el medio al recipiente que contiene a los explantes. B y C. Después del tiempo de inmersión programado, se activa una segunda bomba que inyecta aire al recipiente que contiene a los explantes, forzando el retorno del medio al recipiente original.



Fig. 3. Esquema del modelo BIT en serie (manual de operación, Tecniproductos Orizaba). En el recipiente de la extrema izquierda se coloca el medio de cultivo líquido, y en los cuatro recipientes a la derecha se colocan los explantes.

#### 5.4.1 Condiciones de operación de los BIT de tanques gemelos

En un primer experimento, los biorreactores se programaron con 1 min de inmersión cada doce horas. Al medio basal se le añadió 1 mg/L de BA, y se colocaron dos explantes por biorreactor. Inicialmente se planteó tomar resultados a los 60 d, y se decidió mantener los explantes en los biorreactores hasta los 90 d.

Con base a los resultados obtenidos en los primeros experimentos realizados en biorreactores de inmersión temporal, las especies que mostraron las mejores respuestas, y por lo tanto se incluirán en las siguientes etapas del proyecto, son *A. duranguensis*, *A. funkiana*, *A. gigantensis*, *A. guiengola*, *A. parryi* y *A. potatorum*. Las respuestas que se consideraron para hacer esta selección fueron el número de brotes generados por explante en los biorreactores, así como su grado de diferenciación y baja incidencia de fenómenos negativos como hiperhidratación.

#### 5.5 Condiciones del biorreactor

Las especies seleccionadas en el paso anterior fueron sometidas a otras frecuencias de inmersión (6 y 24 h). Se colocaron cinco explantes por biorreactor para todas las especies, excepto para *A. gigantensis*, en la que se emplearon cuatro explantes por biorreactor. Cada experimento se condujo por triplicado, y después de 90 d se contabilizó el número de brotes generados, se midió su longitud y se registró su morfología.

#### 5.6 Factores micropropagación: otros tratamientos

Se probó el efecto de otros tratamientos distintos a la adición de BA al medio líquido empleado en BIT:

- 1) Adición de 1 mg/L de 2iP al medio basal
- 2) Adición de 1 mg/L de BA y 50 mg/L de nanopartículas de plata (NPsAg) al medio basal.

Se empleó el producto Agrovit® que contiene 200 mg/ml de NPsAg.

Se colocaron cinco explantes por biorreactor para todas las especies, excepto para *A. gigantensis*, en la que se emplearon cuatro explantes por biorreactor, y para *A. guiengola* se colocó una masa de brotes de aproximadamente 3 cm de diámetro por biorreactor. Cada experimento se condujo por triplicado, y después de 90 d se contabilizó el número de brotes generados, se midió su longitud y se registró su morfología.



## 5.7 Enraizamiento y adaptación a suelo

Los brotes generados en BIT fueron separados del explante y se colocaron en medio MS adicionado con 9 g/L de agar para lograr su enraizamiento, además de aumentar su talla.

### 5.7.1 Primer protocolo de adaptación a suelo: adaptación en recipientes de cultivo

Una vez que formaron un sistema radical vigoroso, se sometieron a una aclimatación gradual retirando el vitafilm y aflojando progresivamente la tapa durante una semana, al cabo de la cual se sacaron del recipiente de cultivo y las raíces se lavaron cuidadosamente para retirar todo el medio de cultivo. Se midieron la longitud y el diámetro mayor de la parte aérea, así como la longitud de las raíces remanentes. Aleatoriamente se eligieron diez plántulas generadas en BIT y diez generadas en medio semisólido como grupo control, a las que se les dio seguimiento detallado, continuando con las mediciones; en caso de contar con un número mayor de plantas adaptadas a suelo, solo se tomaron datos de supervivencia.

Los brotes fueron colocados en sustrato (40 % de jal, 30 % tierra negra y 30 % peat moss) bien hidratado, en macetas de 6.5 X 6.5 X 5 cm. Las macetas se colocaron dentro de bolsas de plástico semicerradas; una semana después se abrieron completamente y un día después se retiraron. Desde su adaptación a medio externo, los brotes se mantuvieron en invernadero.

### 5.7.2 Segundo protocolo de adaptación a suelo: adaptación fuera del recipiente de cultivo

El primer protocolo de adaptación a suelo utilizado resultó adecuado para todas las especies, excepto para *A. guiengola*, por lo cual se probó otro protocolo para esta especie, el cual consistió en omitir la aclimatación gradual; por el contrario, las plantas se sacaron de inmediato de los recipientes de cultivo, las raíces se lavaron cuidadosamente para retirar los remanentes de medio de cultivo; después se midieron longitud, diámetro mayor de la parte aérea, longitud de las raíces y número de hojas. Los brotes enraizados se colocaron sobre papel de estraza en charolas para que las raíces se secaran, y estas se colocaron dentro de bolsas de plástico por 24 h, para la adaptación de los brotes a la atmósfera externa a los recipientes de cultivo.

Posteriormente, los brotes se colocaron en charolas de germinación de 50 cavidades, cada cavidad con un volumen de 90 cc y horadada en la parte inferior para permitir un adecuado drenado del exceso de agua; la charola se colocó dentro de una segunda charola sin divisiones ni orificios de drenaje, el riego se realizó colocando agua en la charola inferior y manteniendo el nivel del agua al menos en un 50 % de su capacidad. Se probaron dos sustratos distintos: peat moss y peat moss:vermiculita en una proporción de 50:50, para un total de cuatro tratamientos: 1) plantas generadas en medio semisólido sembradas en peat moss; 2) plantas generadas en medio semisólido sembradas en peat moss:vermiculita; 3)

plantas generadas en BIT sembradas en peat moss; 4) plantas generadas en BIT sembradas en peat moss:vermiculita.

Las charolas se colocaron dentro de bolsas de plástico transparente durante dos semanas, en el transcurso de las cuales se les fueron realizando perforaciones gradualmente, y se mantuvieron en invernadero. Transcurridas dos semanas, las bolsas se retiraron y se continuó con el mismo esquema de riego.

## **5.8 Evaluación de la estabilidad genética de las plantas micropropagadas**

### **5.8.1 Extracción y purificación de ADN**

Para la extracción de ADN se probaron los métodos de CTAB modificado y el descrito por Zhang y Hewitt (2001) con modificaciones. El que dio mejores resultados fue el segundo, y a continuación se describe a detalle:

Se pesaron 300 mg de tejido, cuando fue posible de una sola hoja, de lo contrario se tomaron varias hojas de la misma planta, y en algunos casos también se tomó el tallo; para las muestras con las que no se completaron los 300 mg con tejido de una sola planta, se utilizó la cantidad disponible. Las muestras se congelaron a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , posteriormente se les agregó 300  $\mu\text{l}$  de solución SuperTEN (100 mM Tris-HCl pH8, 100 mM EDTA pH 8, 1 mM NaCl) y se maceraron con ayuda del equipo TissueLyser II® (Qiagen) aplicando 30 Hz por 3 min. En seguida se agregaron 500  $\mu\text{l}$  de una solución de SDS al 1% m/v, se agitó para mezclar bien. A una muestra de cada especie se le agregó RNAsa y se incubó 30 min a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; a la otra muestra no se le agregó RNAsa.

Se agregaron 300  $\mu\text{l}$  de fenol, se agitó suavemente para mezclar las dos fases hasta formar una emulsión y se dejó a temperatura ambiente por 15 min. Se centrifugó 5 min a 12,000 rpm, y se transfirió la fase acuosa un tubo nuevo, para después añadir 300  $\mu\text{l}$  de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), se mezcló suavemente por 5 min. Las muestras se centrifugaron nuevamente a 12,000 rpm por 5 min y se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo. Después se añadieron 0.7 volúmenes de isopropanol frío y se mezclaron los tubos por inmersión, para luego centrifugar 5 min a 12,000 rpm. Después de desechar el sobrenadante se realizaron dos lavados con etanol al 70 %, y la pastilla se secó en baño seco a  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ . El ADN se resuspendió en 50  $\mu\text{l}$  TE. Las muestras se cuantificaron con Colibri Microvolume Spectrometer® (Titertek Berthold) y se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1%, aplicando 100 V, para evaluar su integridad.

### **5.8.2 Evaluación de decanucleótidos para RAPDs.**

De acuerdo con la bibliografía consultada (Gil-Vega *et al.*, 2001; Alfaro-Rojas *et al.*, 2007) se eligieron oligonucleótidos de la serie OPA (tabla 5) para evaluar el patrón de bandas generado en todas las especies incluidas en este proyecto. La mezcla de reacción se

preparó con 12.5 µl de RedTaq ReadyMix® (Sigma Aldrich), 9.5 µl de agua ultrapura, 2 µl de muestra de ADN a una concentración 40 ng/µl y 2 µl del oligonucleótido a una concentración 20 pmols/µl. El programa utilizado en el termociclador fue el siguiente: a) un ciclo de 3 min a 94 °C; b) cuarenta y cinco ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 36 °C, 2 min a 72 °C; c) un ciclo de 5 min a 72 °C. Los productos amplificados se visualizaron mediante electroforesis en gel, la corrida se efectuó en gel de agarosa al 1.2 % m/v, preparado con buffer TAE 1X, y una corriente eléctrica de 80 V.

Posteriormente se probaron oligos de la serie OPB (tabla 6). La mezcla de reacción consistió en 5ng de templado de ADN, 1X de buffer para PCR (Invitrogen®), 2.0 mM de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen®), 0.25 µM de cada dNTP, 0.3 µM del decanucleótido y 0.5 U de DNA polimerasa (Jena Bioscience®). La amplificación se llevó a cabo en un termociclador MultiGene (Labnet®) con el siguiente programa: un ciclo inicial de desnaturalización a 94 °C por 1 min, 40 ciclos de 1 min a 94 °C, 2 min a 36 °C y 2 min 72 °C; y un ciclo de 5 min a 72 °C. Para observar los productos de amplificación se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2 % m/v preparado con buffer de boratos 1X, sometido a una corriente eléctrica de 80 V.

Para verificar la integridad del ADN se utilizaron oligonucleótidos para el gen de actina. El programa utilizado para amplificar el gen de actina fue: a) un ciclo de 2 min a 95 °C; b) treinta ciclos de 30 s a 94 °C, 1 min a 36 °C, 2 min a 72 °C; c) un ciclo de 5 min a 72 °C.

Tabla 6. Oligonucleótidos probados para RAPDs

<b>Decanucleótido</b>	<b>Secuencia (5'→3')</b>	<b>Decanucleótido</b>	<b>Secuencia (5'→3')</b>
OP A-01	CAGGCCCTTC	OP B-07	GGTGACGCAG
OP A-02	TGCCGAGCTG	OP B-08	GTCCACACGG
OP A-03	AGTCAGCCAC	OP B-11	CAATCGCCGT
OP A-04	AATCGGGCTG	S18	CTGGCGAACT
OP A-05	AGGGGTCTTG	SQ1	CTACTGGCGT
OP A-07	GAAACGGGTG	W102	ACCCCGCCAA
OP A-09	GGGTAACGCC	W13	CACAGCGACA
OP A-10	GTGATCGCAG		
OP A-14	TCTGTGCTGG		
OP A-15	TTCCGAACCC		
OP A-19	CAAACGTCCG		
OP A-20	GTTGCGATCC		

### 5.8.3 Evaluación de oligonucleótidos para ISSR

Se probaron oligonucleótidos complementarios a la secuencia interna del ISSR (Tabla 7) utilizando una mezcla de reacción que incluyó 5ng de templado de ADN, 1X de buffer para PCR (Sigma-Aldrich®), 2.0 mM de MgCl<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich®), 0.25 µM de cada dNTP, 0.3 µM del oligonucleótido y 0.5 U de DNA polimerasa (Sigma-Aldrich®). La amplificación se

llevó a cabo en un termociclador MultiGene (Labnet ®) con el siguiente programa: un ciclo inicial de desnaturalización a 94 °C por 1 min, 40 ciclos de 1 min a 94 °C, 2 min a 36 °C y 2 min 72 °C; y un ciclo de 5 min a 72 °C. Para observar los productos de amplificación se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2 % m/v preparado con buffer de boratos 1X, sometido a una corriente eléctrica de 80 V.

Tabla 7. Oligonucleótidos probados para ISSR

<b>Oligonucleótidos</b>	<b>Secuencia (5'→3')</b>
811	GAGAGAGAGAGAGAGAC
845	CACACACACACACAGT
853	TCTCTCTCTCTCTCTT
33	CAGCAGCAGCAGCAG
34	CAGCAGCAGCAGCAGRC
36	CGCAGCAGCAGCAGCAG

#### 5.8.4 Marcadores RAMP

Se seleccionaron los oligonucleótidos que generaron mejores patrones de bandeo, y con ellos se diseñaron combinaciones para realizar los RAMPs (tabla 8).

Tabla 8. Combinaciones de oligonucleótidos utilizadas para evaluar fidelidad genética

Decámero – Iniciador SSR	S18 – 33	S18 – 34	S18 – 36	S18 – 811
	SQ1 – 33	SQ1 – 34	SQ1 – 36	SQ1 – 811
	W102 -33	W102 -34	W102 -36	W102 - 811

La mezcla de reacción consistió en 5ng de templado de ADN, 1X de buffer para PCR (Sigma-Aldrich ®), 2.0 mM de MgCl<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich ®), 0.25 µM de cada dNTP, 0.3 µM del decanucleotido, 0.3 µM del oligonucleótido para SSR y 0.5 U de DNA polimerasa (Sigma-Aldrich ®). La amplificación se llevó a cabo en un termociclador MultiGene (Labnet ®) con el siguiente programa: un ciclo inicial de desnaturalización a 94 °C por 1 min, 40 ciclos de 1 min a 94 °C, 2 min a 36 °C y 2 min 72 °C; y un ciclo de 5 min a 72 °C. Para observar los productos de amplificación se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2 % m/v preparado con buffer de boratos 1X, sometido a una corriente eléctrica de 80 V.

Para cada especie se sometieron a amplificación en las condiciones señaladas en el párrafo anterior las muestras de ADN extraídas de cinco individuos distintos cultivados *in vitro* en medio semisólido, no expuestos a ningún RCV, y las muestras de ADN extraídas de cinco individuos distintos obtenidos por micropropagación en BITs en medio líquido y expuestos a reguladores de crecimiento vegetal.

Con el fin de evaluar si el perfil genético de las plantas micropropagadas en BIT era igual o distinto al de las plantas no expuestas a RCV y cultivadas en medio semisólido, con los patrones de bandeo observados en los geles de agarosa se construyeron matrices binarias. Con base a estas matrices binarias se obtuvieron los índices de Jaccard comparando entre sí las muestras de cada especie; también se construyeron dendrogramas y se obtuvieron índices de diversidad empleando el programa PAST 3.25.



## VI. RESULTADOS

### 6.1 Obtención de material vegetal

En el caso de las especies *A. duranguensis* (Ramírez-Malagón, 2008), *A. funkiana* y *A. parryi* existen publicaciones previas en las que se reportan protocolos eficientes de propagación *in vitro*. Con base a esta información, las tres especies se propagaron con el fin de contar con material vegetal suficiente para las siguientes etapas del proyecto.

Para *A. gigantensis*, *A. guiengola* y *A. parrasana* fue necesario realizar experimentos para definir el mejor tratamiento para su propagación masiva en medio semisólido; se encontró que para *A. gigantensis* y *A. parrasana* los tratamientos que generaron un mayor número de brotes fueron 1 y 2 mg/L BA (Fig. 4).

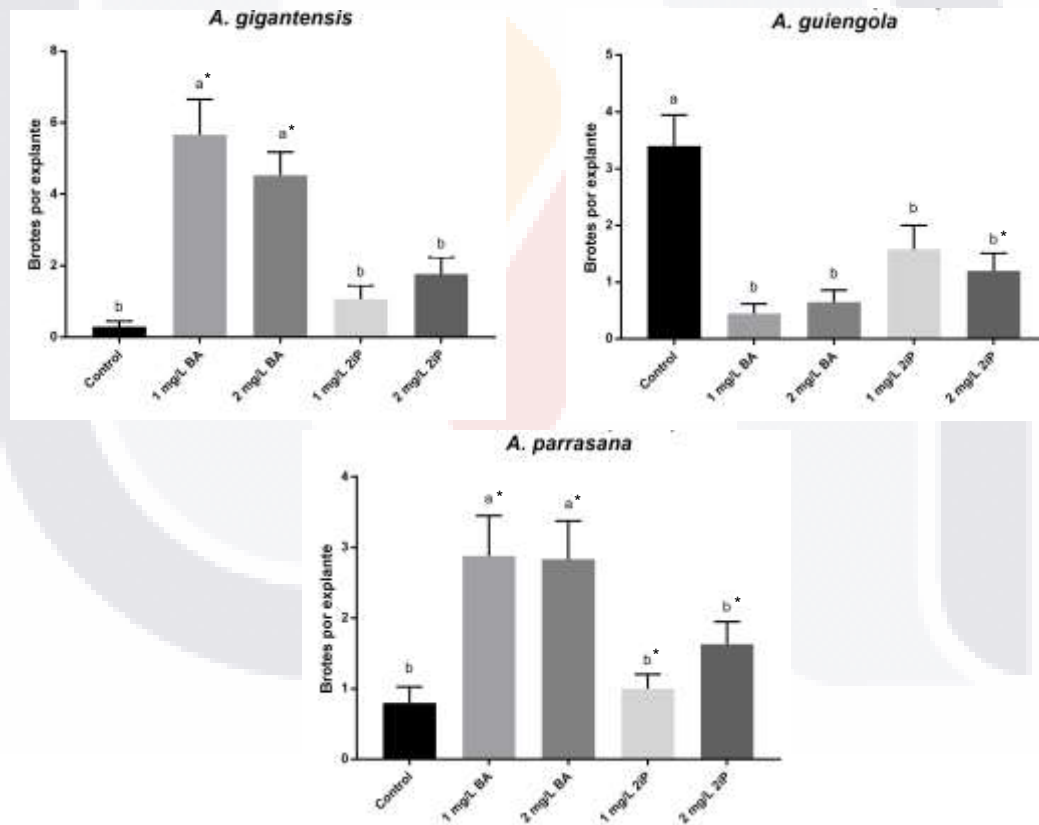


Fig. 4. Promedio de brotes por explante generados en *A. gigantensis*, *A. guiengola* y *A. parrasana*. La barra representa el error estándar; letras iguales indican que no existe diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos a  $P \geq 0.05$  utilizando la prueba de Tukey (n=30). (\*) denota la presencia de masas de brotes.



Para *A. guiengola* y *A. potatozum* se diseñó un experimento utilizando combinaciones de una auxina y una citocinina para evaluar el efecto de la combinación de ambas. Como se puede observar en las tablas 9 y 10, en ambas especies los tratamientos con 2,4-D solo o combinado con BA la generación de brotes es muy baja o nula; sin embargo, se presentaron otras respuestas, como la formación de masas de brotes (Fig. 5e, 5i, 5m) y de callo nodular (Fig. 5f, 5g, 7). Las masas de brotes son grupos compactos de numerosos brotes poco diferenciados, muy difíciles de separar y contabilizar.

Tabla 9. Respuestas morfogénicas observadas en *A. guiengola*. BE (promedio de brotes por explante  $\pm$  ES); porcentaje de explantes que presentaron masas de brotes (MB), raíces (R), callo (CR) o callo nodular (CN); explantes contaminados, oxidados o necrosados (EP).

Trat.	RCV (mg/L)		BE	MB (%)	R (%)	CR (%)	CN (%)	EP (%)
	BA	2,4-D						
1	0.0	0.0	0.3 $\pm$ 0.1189 <sup>c</sup>	SR	76.7	SR	SR	SR
2	0.0	0.1	0.1 $\pm$ 0.0673 <sup>c</sup>	SR	SR	SR	83.3	6.7
3	0.0	0.5	0.0 $\pm$ 0.0333 <sup>c</sup>	SR	SR	80.0	3.3	SR
4	0.0	1.0	SR <sup>c</sup>	SR	SR	60.0	6.7	20.0
5	1.0	0.0	3.0 $\pm$ 0.6798 <sup>a</sup>	80.0	3.3	16.7	SR	SR
6	1.0	0.1	0.8 $\pm$ 0.2971 <sup>b</sup>	6.7	SR	SR	100.0	SR
7	1.0	0.5	0.0 $\pm$ 0.0333 <sup>c</sup>	SR	SR	SR	100.0	SR
8	1.0	1.0	0.0 $\pm$ 0.0333 <sup>c</sup>	SR	SR	SR	100.0	SR
9	2.0	0.0	1.5 $\pm$ 0.3171 <sup>b</sup>	53.3	SR	33.3	6.7	3.3
10	2.0	0.1	SR <sup>c</sup>	43.3	SR	66.7	SR	10.0
11	2.0	0.5	0.0 $\pm$ 0.0333 <sup>c</sup>	SR	SR	3.3	90.0	SR
12	2.0	1.0	SR <sup>c</sup>	SR	SR	26.7	40.0	SR
13	3.0	0.0	1.6 $\pm$ 0.4506 <sup>b</sup>	73.3	SR	16.7	SR	13.3
14	3.0	0.1	0.5 $\pm$ 0.1571 <sup>b</sup>	3.3	SR	76.7	20.0	SR
15	3.0	0.5	0.2 $\pm$ 0.0884 <sup>c</sup>	SR	SR	3.3	93.3	SR
16	3.0	1.0	0.0 $\pm$ 0.0333 <sup>c</sup>	SR	SR	66.7	33.3	SR

Letras iguales indican que no existe diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos a  $P \geq 0.05$  utilizando la prueba de Tukey. Para todos los tratamientos n=30. SR: Sin respuesta

Tabla 10. Respuestas morfológicas observadas en *A. potatozum*. BE (promedio de brotes por explante  $\pm$  ES); porcentaje de explantes que presentaron masas de brotes (MB), raíces (R), callo (CR) o callo nodular (CN); explantes contaminados, oxidados o necrosados (EP).

Trat.	RCV (mg/L)		BE	MB (%)	R (%)	CR (%)	CN (%)	EP (%)
	BA	2,4-D						
1	0.0	0.0	SR <sup>b</sup>	SR	60.0	SR	SR	SR
2	0.0	0.1	SR <sup>b</sup>	SR	20.0	40.0	SR	SR
3	0.0	0.5	SR <sup>b</sup>	SR	SR	70.0	SR	SR
4	0.0	1.0	SR <sup>b</sup>	SR	SR	90.0	SR	SR
5	1.0	0.0	SR <sup>b</sup>	20.0	10.0	SR	SR	SR
6	1.0	0.1	0.8 $\pm$ 0.6325 <sup>b</sup>	SR	10.0	SR	100.0	SR
7	1.0	0.5	0.3 $\pm$ 0.1527 <sup>b</sup>	SR	SR	SR	100.0	SR
8	1.0	1.0	0.2 $\pm$ 0.1333 <sup>b</sup>	SR	SR	70.0	30.0	SR
9	2.0	0.0	SR <sup>b</sup>	SR	SR	40.0	60.0	20.0
10	2.0	0.1	1.0 $\pm$ 0.3944 <sup>b</sup>	SR	SR	60.0	SR	10.0
11	2.0	0.5	0.1 $\pm$ 0.1000 <sup>b</sup>	SR	SR	SR	SR	40.0
12	2.0	1.0	0.1 $\pm$ 0.1000 <sup>b</sup>	SR	SR	100.0	SR	80.0
13	3.0	0.0	0.6 $\pm$ 0.4000 <sup>b</sup>	10.0	SR	10.0	SR	SR
14	3.0	0.1	1.4 $\pm$ 0.6864 <sup>a</sup>	SR	SR	100.0	SR	SR
15	3.0	0.5	SR <sup>b</sup>	SR	SR	70.0	30.0	SR
16	3.0	1.0	SR <sup>b</sup>	SR	SR	50.0	30.0	SR

Trat.	RCV (mg/L)		BE	MB (%)	R (%)	CR (%)	CN (%)	EP (%)
	BA	Pic						
1	0.0	0.0	0.9 $\pm$ 0.0627 <sup>b</sup>	9.1	54.5	4.5	SR	36.4
2	0.0	1.0	SR <sup>b</sup>	SR	SR	42.3	SR	15.4
3	0.0	2.0	SR <sup>b</sup>	SR	SR	42.3	30.8	15.4
4	0.0	3.0	SR <sup>b</sup>	SR	SR	43.5	34.8	30.4
5	1.0	0.0	4.2 $\pm$ 1.2736 <sup>a</sup>	9.5	9.5	9.5	SR	42.9
6	1.0	1.0	SR <sup>b</sup>	SR	4.2	41.7	45.8	25.0
7	1.0	2.0	SR <sup>b</sup>	SR	SR	60.0	40.0	SR
8	1.0	3.0	SR <sup>b</sup>	SR	SR	71.4	25.0	7.1
9	2.0	0.0	6.2 $\pm$ 1.5293 <sup>a</sup>	14.3	SR	7.1	3.6	7.1
10	2.0	1.0	SR <sup>b</sup>	SR	SR	53.3	43.3	SR
11	2.0	2.0	SR <sup>b</sup>	SR	SR	46.7	50.0	SR
12	2.0	3.0	SR <sup>b</sup>	SR	SR	63.3	33.3	SR
13	3.0	0.0	4.4 $\pm$ 1.0540 <sup>a</sup>	7.7	3.8	SR	11.5	15.4
14	3.0	1.0	SR <sup>b</sup>	SR	4.2	45.8	54.2	25.0
15	3.0	2.0	SR <sup>b</sup>	SR	SR	50.0	46.1	15.4
16	3.0	3.0	SR <sup>b</sup>	SR	SR	56.7	33.3	SR

Letras iguales indican que no existe diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos a  $P \geq 0.05$  utilizando la prueba de Tukey. Para todos los tratamientos BA/2,4-D n=10, y BA/Pic n=30. SR: Sin respuesta

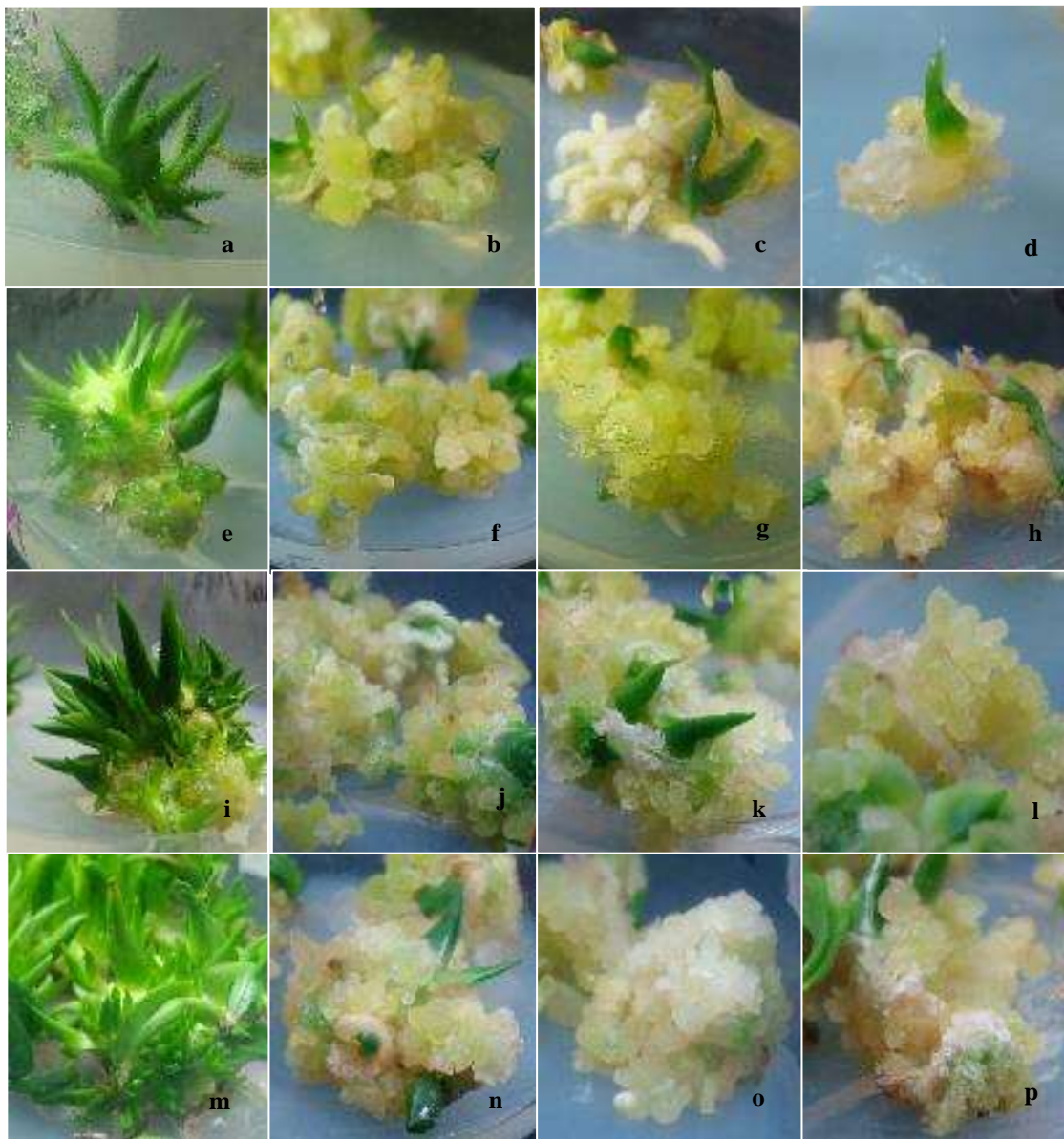


Fig. 5. Respuestas de *A. guiengola* a diferentes concentraciones de BA y 2,4-D: a) Sin RCVs; b) 0.1 mg/L 2,4-D; c) 0.5 mg/L 2,4-D; d) 1.0 mg/L 2,4-D; e) 1 mg/L BA; f) 1.0 mg/L BA y 0.1 mg/L 2,4-D; g) 1.0 mg/L BA y 0.5 mg/L 2,4-D; h) 1.0 mg/L BA y 1.0 mg/L 2,4-D; i) 2.0 mg/L BA; j) 2.0 mg/L BA y 0.1 mg/L 2,4-D; k) 2.0 mg/L BA y 0.5 mg/L 2,4-D; l) 2.0 mg/L BA y 1.0 mg/L 2,4-D; m) 3 mg/L BA; n) 3.0 mg/L BA y 0.1 mg/L 2,4-D; o) 3.0 mg/L BA y 0.5 mg/L 2,4-D; p) 3.0 mg/L BA y 1.0 mg/L 2,4-D

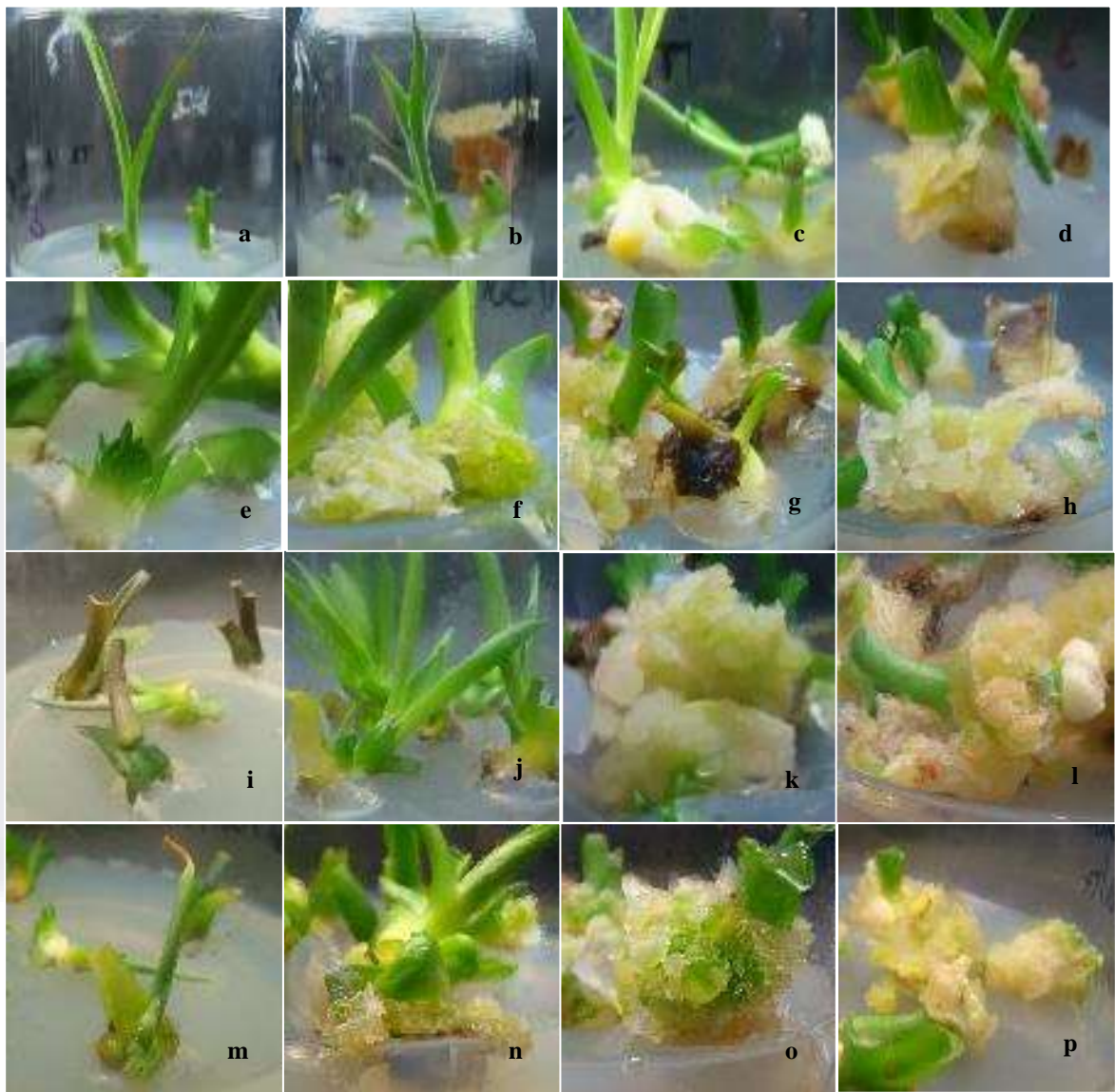


Fig. 6. Respuestas de *A. potatozum* a diferentes concentraciones de BA y 2,4-D: a) Sin RCVs; b) 0.1 mg/L 2,4-D; c) 0.5 mg/L 2,4-D; d) 1.0 mg/L 2,4-D; e) 1 mg/L BA; f) 1.0 mg/L BA y 0.1 mg/L 2,4-D; g) 1.0 mg/L BA y 0.5 mg/L 2,4-D; h) 1.0 mg/L BA y 1.0 mg/L 2,4-D; i) 2.0 mg/L BA; j) 2.0 mg/L BA y 0.1 mg/L 2,4-D; k) 2.0 mg/L BA y 0.5 mg/L 2,4-D; l) 2.0 mg/L BA y 1.0 mg/L 2,4-D; m) 3 mg/L BA; n) 3.0 mg/L BA y 0.1 mg/L 2,4-D; o) 3.0 mg/L BA y 0.5 mg/L 2,4-D; p) 3.0 mg/L BA y 1.0 mg/L 2,4-D



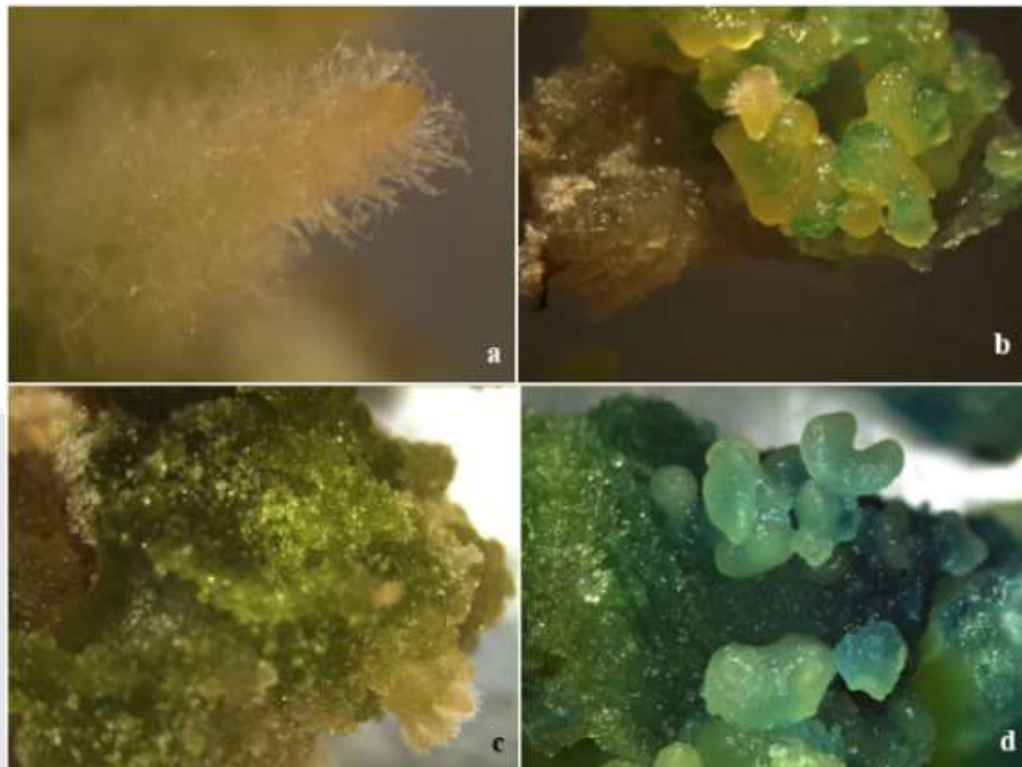


Fig. 7. Estructuras observadas en callo nodular de *A. guineensis* generado con los tratamientos: a) 1.0 mg/L BA y 0.1 mg/L 2,4-D; b) 2.0 mg/L BA y 0.5 mg/L 2,4-D; c) 3.0 mg/L BA y 0.1 mg/L 2,4-D; d) 3 mg/L BA y 3 mg/L 2,4-D.

Para verificar la presencia de embriones somáticos en callos de *A. guineensis* se realizó una tinción diferencial con acetocarmín y azul de Evans (Fig. 8). El acetocarmín tiñe glicoproteínas, cromatina y ADN; por tal razón las células de tejido embriogénico, con grandes núcleos y citoplasma denso, y se tiñen de rojo. En cambio, las células con núcleos pequeños y vacuolas grandes no pueden extruir el azul de Evans, y quedan teñidas de este color; por ello, el callo embriogénico y las células del suspensor se observan de color azul (Gupta y Holmstrom, 2005).

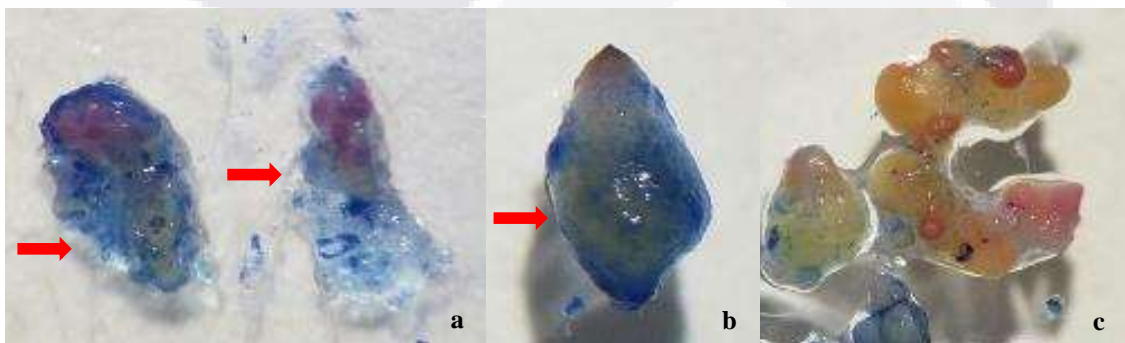


Fig. 8. Embriones somáticos de *A. guineensis* (a y b); es fácil distinguir estas estructuras de las células indiferenciadas de callo (c), ya que estas últimas no presentan suspensor. La flecha roja indica la posición del suspensor.

**6.2 Elección de las especies con mayor capacidad de adaptación a los biorreactores, y elección del tipo de explante.**

El experimento inicial se condujo con nueve especies de *Agave* (Tabla 11). Con algunos tratamientos en medio semisólido, *A. guiengola* forma masas de brotes, como ya se ha señalado, así que, para esta especie, los explantes probados en BIT fueron tanto brotes individuales como masas de brotes (Tabla 11, Fig. 9a). También se formaron algunas masas de brotes en *A. gigantensis*, y se decidió probar también este tipo de explante para esta especie.

Tabla 11. Promedio de brotes por explante obtenidos en biorreactores de inmersión temporal, con tiempo de inmersión de 1 min y frecuencia de inmersión de 12 h. (SD: Sin datos)

Especie	Tipo de explante	RCV	n	Brotes por explante (media ± ES)		
				60 d	90 d	120 d
<i>A. angustifolia</i>	Brotes individuales	1 mg/L BA	6	0.2 ± 0.17	1.2 ± 0.40	SD
<i>A. duranguensis</i>	Brotes individuales	1 mg/L BA	4	1.5 ± 0.65	6.5 ± 2.04	SD
<i>A. funkiana</i>	Brotes individuales	1 mg/L BA	11	SD	SD	6.1 ± 2.04
<i>A. gigantensis</i>	Brotes individuales	1 mg/L BA	4	SD	5.3 ± 2.78	SD
	Masa de brotes	1 mg/L BA	1	SD	7.0	SD
<i>A. guiengola</i>	Brotes individuales	1 mg/L BA	6	2.8 ± 0.95	SD	SD
		1 mg/L 2iP	3	1.7 ± 1.67	SD	SD
	Masas de brotes	1 mg/L BA	3	38.3 ± 2.33	SD	SD
		1 mg/L 2iP	2	8.0 ± 4.62	SD	39.0 ± 39.00
<i>A. karwinskii</i>	Brotes individuales	1 mg/L BA	6	0.8 ± 0.48	1.0 ± 0.82	SD
<i>A. potatorum</i>	Plántulas (de semillas)	1 mg/L BA	3	2.0 ± 2.00	2.7 ± 2.67	SD
<i>A. parrasana</i>	Brotes individuales	1 mg/L BA	3	SD	SD	1.3 ± 1.33
<i>A. parryi</i>	Brotes individuales	1 mg/L BA	6	0.8 ± 0.83	1.7 ± 1.23	SD





Fig. 9. Brotes generados en BIT: a) Brotes obtenidos de un solo explante (masa de brotes) de *A. guiengola* empleando MS adicionado con 1 mg/L 2iP; b) corte de un explante de *A. guiengola* mostrando el origen de los brotes generados; c y d) Brotes generados en *A. potatorum* empleando MS adicionado con 1 mg/L BA, nótese la presencia de zonas necrosadas.

### 6.3 Condiciones del biorreactor

Con las seis especies seleccionadas para continuar el proyecto se montaron los experimentos para determinar el efecto de la frecuencia de inmersión, probando tiempos de 6, 12 y 24 h, además de un control en medio semisólido (Fig. 10). Se registró si los explantes conservaron una morfología normal, o si se hiperhidrataron o necrosaron, y la cantidad y longitud de los brotes generados, así como la cantidad y longitud de los brotes que se hiperhidrataron (tabla 11).

En general se observa que en *A. durangensis*, *A. funkiana*, *A. gigantensis* y *A. parryi* el promedio de brotes por explante es mayor en el tratamiento control (medio semisólido) que en los tratamientos con distintas frecuencias de inmersión en BIT, aunque la longitud promedio de los brotes en todas estas especies fue mayor en al menos uno de los tratamientos en BIT.

Un dato importante es el efecto del uso de BITs y medios líquidos sobre los propios explantes, pues cuando se necrosaron evidentemente no generaron brotes, y cuando se hiperhidrataron siempre generaron brotes hiperhidratados; en algunas ocasiones explantes que conservaron una morfología normal produjeron brotes hiperhidratados. En *A. funkiana*, *A. guiengola* y *A. potatorum* los explantes no se hiperhidrataron con ninguna frecuencia de

inmersión, y tampoco se presentaron porcentajes altos de brotes hiperhidratados, excepto en *A. guiengola* bajo una frecuencia de inmersión de 24 h. En cambio, en *A. durangensis*, *A. gigantensis* y *A. parryi* se hiperhidrataron más del 20 % de los explantes en al menos una de las frecuencias de inmersión evaluadas, y esto se tradujo en la formación de brotes hiperhidratados en una proporción mayor al 25 % en algunas frecuencias de inmersión. No se presentó necrosis de explantes en el tratamiento control en ninguna especie, excepto en *A. gigantensis*; sin embargo, se presentó la necrosis de más de un 15 % de los explantes en *A. durangensis* en todas las frecuencias de inmersión, en la inmersión cada 6 h en *A. funkiana*, y en la frecuencia de inmersión de 12 h en *A. gigantensis*.

#### **6.4 Factores de micropropagación: otros tratamientos**

En las seis especies se probó el efecto de añadir 2iP al medio de cultivo; también se añadió NPsAg junto con BA (tabla 12; Fig. 10). Se registró si los explantes conservaron una morfología normal, o si se hiperhidrataron o necrosaron, y la cantidad y longitud de los brotes generados, y cuántos se hiperhidrataron (tabla 12).

La adición de 2iP al medio de cultivo líquido resultó el tratamiento menos eficiente en cuanto a la generación de brotes para *A. durangensis*, *A. gigantensis*, *A. guiengola* y *A. potatorum*. En *A. funkiana* el uso de 2iP resultó en una menor formación de brotes que en el tratamiento control y BIT con medio adicionado con BA, pero los brotes fueron de mayor tamaño en el tratamiento con 2iP (Fig. 11H). En *A. parryi* el tratamiento con 2iP fue el que generó un mayor promedio de brotes por explante, y los explantes de morfología normal tuvieron una longitud promedio mayor a la mayoría de los demás tratamientos, sin embargo, el 84.2 % de los brotes se hiperhidrató (Fig. 12H).

Las NPsAg causaron la hiperhidratación del 86.7 % de los explantes y del 30.9 % de los brotes en *A. durangensis*, aunque los brotes de morfología normal alcanzaron una longitud mucho mayor que con cualquier otro tratamiento (Fig. 11C). En *A. funkiana*, *A. gigantensis* y *A. parryi* este tratamiento tuvo un muy bajo promedio de brotes por explante. En *A. gigantensis* fue el tratamiento que generó más brotes por explante, y los brotes tuvieron la mayor longitud promedio, aunque el 85 % de ellos se hiperhidrató (Fig. 11O). En *A. guiengola* las NPsAg resultaron en la mayor cantidad de brotes por explante, y estos tuvieron la mayor longitud promedio, con solo un 35 % de brotes por hiperhidratados (Fig. 12C).

Tabla 12. Tratamientos en BITs. Se muestra el efecto de la frecuencia de inmersión, regulador de crecimiento y adición de NPsAg al medio de cultivo en el número y longitud de brotes generados, y en el porcentaje de brotes hiperhidratados. Letras iguales indican que no hay diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos según la prueba de Kruskal-Wallis a  $\alpha=0.05$ .

Especie	Trat.	n	EB (%)	EH (%)	EN (%)	BE (media $\pm$ ES)	BH (%)	LB (media $\pm$ ES)	
								N	H
<i>A. duranguensis</i>	Control	17	58.8	0.0	0.0	3.94 $\pm$ 1.19 <sup>a</sup>	0.0	1.38 $\pm$ 0.14 <sup>b</sup>	SD
	BA - 6 h	17	29.4	41.2	17.6	0.94 $\pm$ 0.46 <sup>a</sup>	87.5	2.75 $\pm$ 0.25 <sup>b</sup>	1.54
	BA - 12 h	19	42.1	5.3	26.3	2.16 $\pm$ 0.80 <sup>a</sup>	14.6	1.24 $\pm$ 0.13 <sup>b</sup>	0.83
	BA - 24 h	21	28.6	0.0	28.6	1.24 $\pm$ 0.56 <sup>a</sup>	3.9	1.11 $\pm$ 0.22 <sup>b</sup>	1.00
	2iP	15	10.0	40.0	40.0	0.20 $\pm$ 0.20 <sup>a</sup>	0.0	0.75 $\pm$ 0.25 <sup>b</sup>	SD
	NPsAg	15	26.7	86.7	0.0	1.73 $\pm$ 0.94 <sup>a</sup>	30.9	4.78 $\pm$ 0.56 <sup>a</sup>	1.25
<i>A. funkiana</i>	Control	15	46.7	0.0	0.0	3.07 $\pm$ 1.00 <sup>a</sup>	2.2	0.69 $\pm$ 0.06 <sup>c</sup>	0.50
	BA - 6 h	21	57.1	0.0	28.6	3.05 $\pm$ 1.08 <sup>a</sup>	3.1	1.40 $\pm$ 0.14 <sup>b</sup>	1.50
	BA - 12 h	27	59.3	0.0	0.0	2.93 $\pm$ 0.95 <sup>a</sup>	0.0	1.20 $\pm$ 0.12 <sup>bc</sup>	SD
	BA - 24 h	21	47.6	0.0	9.5	2.14 $\pm$ 0.81 <sup>a</sup>	0.0	1.19 $\pm$ 0.14 <sup>b</sup>	SD
	2iP	15	26.7	0.0	20.0	0.93 $\pm$ 0.66 <sup>a</sup>	21.4	3.14 $\pm$ 0.44 <sup>a</sup>	2.5
	NPsAg	15	46.7	13.3	26.7	0.47 $\pm$ 0.13 <sup>a</sup>	0.0	4.29 $\pm$ 0.40 <sup>a</sup>	SD
<i>A. gigantensis</i>	Control	8	75.0	0.0	25.0	2.90 $\pm$ 0.97 <sup>a</sup>	0.0	1.37 $\pm$ 0.11 <sup>c</sup>	SD
	BA - 6 h	18	61.1	22.2	5.6	2.00 $\pm$ 0.65 <sup>ab</sup>	11.1	2.42 $\pm$ 0.24 <sup>ab</sup>	0.50
	BA - 12 h	16	50.0	16.7	50.0	1.63 $\pm$ 0.85 <sup>ab</sup>	0.0	2.98 $\pm$ 0.37 <sup>ab</sup>	SD
	BA - 24 h	18	27.8	16.7	0.0	1.22 $\pm$ 0.61 <sup>ab</sup>	0.0	1.23 $\pm$ 0.11 <sup>bc</sup>	SD
	2iP	12	8.3	0.0	58.3	0.08 $\pm$ 0.08 <sup>b</sup>	0.0	1.5 $\pm$ 0.00 <sup>*</sup>	SD
	NPsAg	12	16.7	0.0	41.7	0.58 $\pm$ 0.50 <sup>ab</sup>	0.0	1.42 $\pm$ 0.37 <sup>abc</sup>	SD
<i>A. guiengola</i>	Control	3	100.0	0.0	0.0	11.67 $\pm$ 4.05 <sup>ab</sup>	0.0	0.83 $\pm$ 0.06 <sup>c</sup>	SD
	BA - 6 h	4	100.0	0.0	0.0	43.00 $\pm$ 6.92 <sup>ab</sup>	0.0	1.41 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	SD
	BA - 12 h	3	42.9	0.0	0.0	38.33 $\pm$ 2.33 <sup>ab</sup>	0.0	1.09 $\pm$ 0.04 <sup>bc</sup>	SD
	BA - 24 h	6	100.0	0.0	0.0	45.33 $\pm$ 10.55 <sup>ab</sup>	33.8	1.27 $\pm$ 0.07 <sup>b</sup>	1.22
	2iP	3	66.7	0.0	0.0	1.67 $\pm$ 1.67 <sup>b</sup>	0.0	0.5 $\pm$ 0.00 <sup>c</sup>	SD
	NPsAg	3	100.0	33.3	0.0	130.67 $\pm$ 63.34 <sup>a</sup>	35.0	1.56 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	1.66
<i>A. potatorum</i>	Control	15	66.67	0.0	0.0	3.80 $\pm$ 1.08 <sup>ab</sup>	0.0	2.00 $\pm$ 0.07 <sup>ab</sup>	SD
	BA - 6 h	21	85.71	19.1	0.0	4.86 $\pm$ 1.37 <sup>ab</sup>	19.6	2.02 $\pm$ 0.14 <sup>b</sup>	1.60
	BA - 12 h	22	45.55	4.6	4.5	3.32 $\pm$ 0.93 <sup>ab</sup>	39.7	1.82 $\pm$ 0.14 <sup>b</sup>	1.40
	BA - 24 h	15	86.67	13.3	0.0	5.60 $\pm$ 1.39 <sup>ab</sup>	22.6	1.64 $\pm$ 0.11 <sup>b</sup>	1.74
	2iP	15	46.67	6.7	0.0	1.60 $\pm$ 0.65 <sup>b</sup>	0.0	2.13 $\pm$ 0.27 <sup>ab</sup>	SD
	NPsAg	15	73.3	26.7	0.0	8.47 $\pm$ 2.07 <sup>a</sup>	85	2.80 $\pm$ 0.25 <sup>a</sup>	1.54
<i>A. parryi</i>	Control	17	53.0	0.0	0.0	1.35 $\pm$ 0.39 <sup>a</sup>	0.0	1.50 $\pm$ 0.24 <sup>b</sup>	SD
	BA - 6 h	14	42.9	0.0	0.0	1.5 $\pm$ 0.71 <sup>a</sup>	0.0	2.01 $\pm$ 0.31 <sup>ab</sup>	SD
	BA - 12 h	21	14.3	19.1	0.0	1.19 $\pm$ 0.39 <sup>a</sup>	8.0	3.22 $\pm$ 0.36 <sup>ab</sup>	1.0
	BA - 24 h	16	25.0	37.5	6.3	0.68 $\pm$ 0.35 <sup>a</sup>	25.0	1.64 $\pm$ 0.66 <sup>ab</sup>	0.88
	2iP	10	50.0	60.0	0.0	1.90 $\pm$ 0.66 <sup>a</sup>	84.2	3.00 $\pm$ 1.26 <sup>ab</sup>	0.56
	NPsAg	15	46.7	0.0	6.7	0.93 $\pm$ 0.42 <sup>a</sup>	0.0	2.46 $\pm$ 0.49 <sup>ab</sup>	SD

EB: explantes generadores de brotes; EH: explantes hiperhidratados; EN: explantes necrosados; BE: brotes por explante; BH: brotes hiperhidratados; LB: longitud de los brotes; N: normales; H: hiperhidratados. SD: Sin datos.

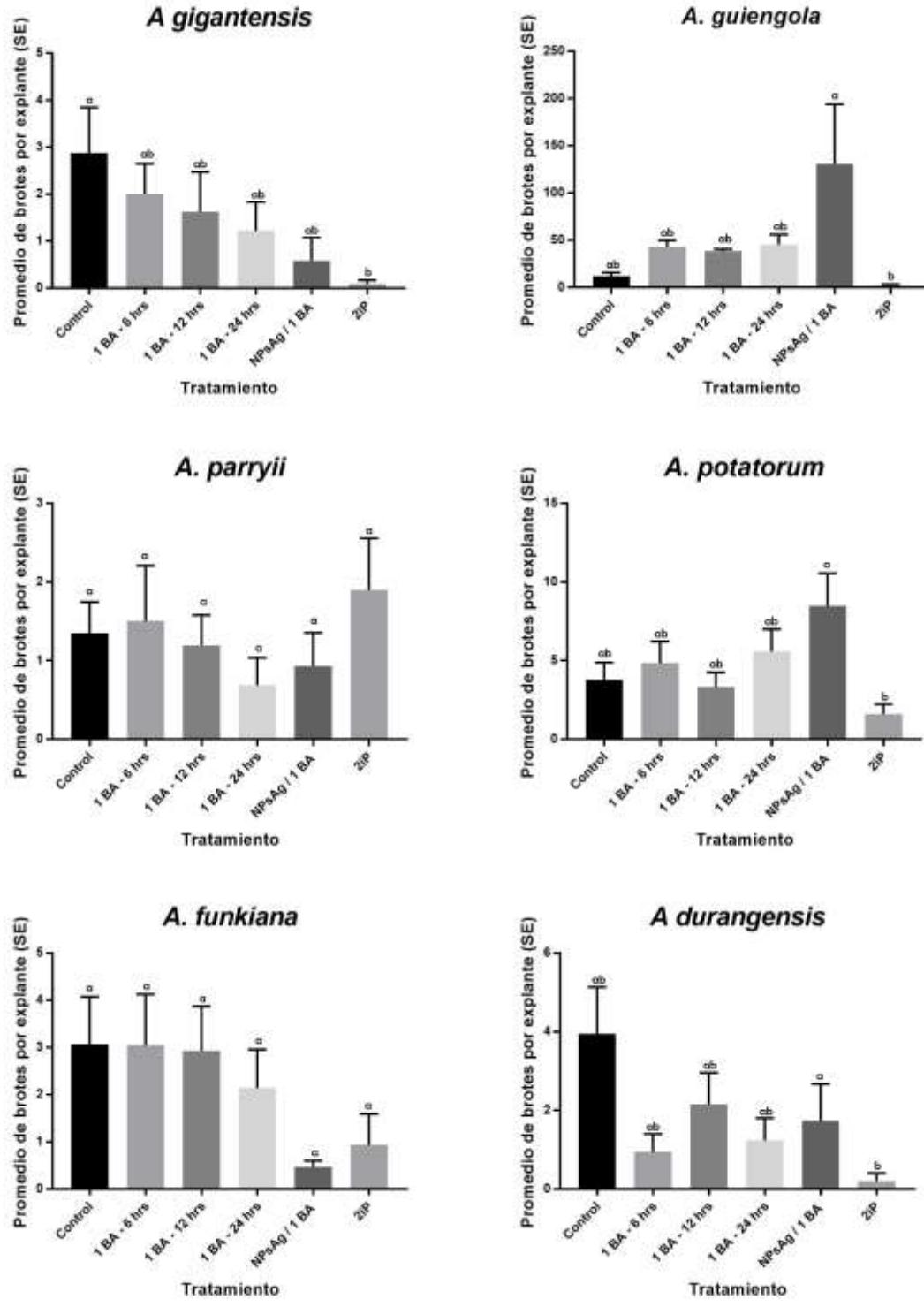


Fig. 10. Promedio de brotes por explante generados en cada tratamiento. Todos los tratamientos, excepto el control, se condujeron en BITs con la frecuencia de inmersión indicada en cada caso. Letras iguales indican que no hay diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos según la prueba de Kruskal-Wallis a  $\alpha=0.05$  (excepto *A. potatorum*:  $\alpha=0.1$ )





Figura 11. Experimentos en BITs de *A. durangensis* (A-F), *A. funkiana* (G-L) y *A. gigantensis* (M-R) en los tratamientos Control (medio semisólido adicionado con BA; [A, G, M]), 2iP [B, H, N], NPsAg [C, I, O], y medio adicionado con BA a frecuencias de inmersión de 6 h [D, J, P], 12 h [E, K, Q] y 24 h [F, L, R]. En todas las fotografías la barra representa 1 cm y se muestran los brotes generados, agrupando los provenientes de un solo explante; en B, D, I y P se observan explantes que no generaron brotes, y en B, D, e I se muestran explantes necrosados.

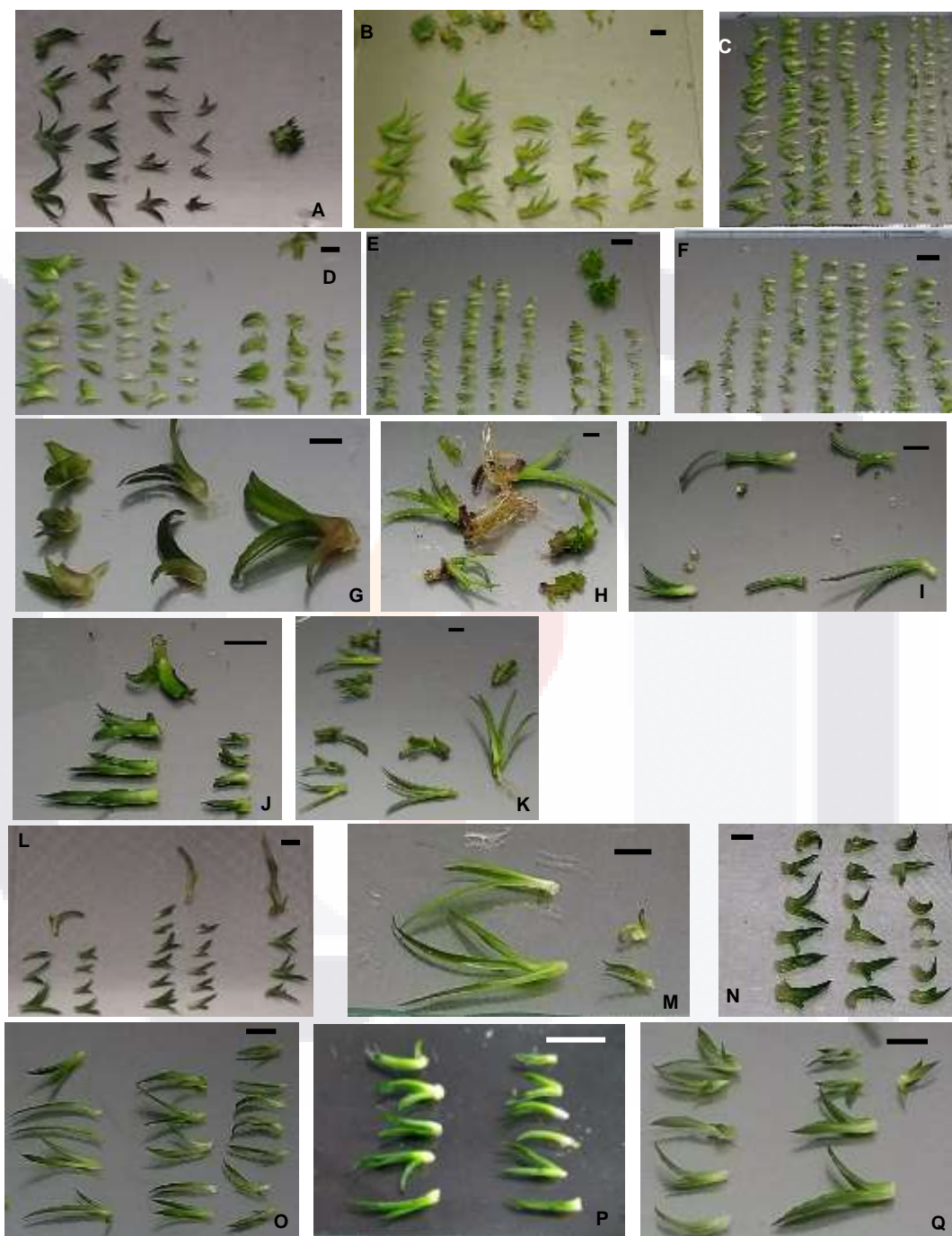


Figura 12. Experimentos en BITs de *A. guiangola* (A-F), *A. parryi* (G-K) y *A. potatorum* (L-Q) en los tratamientos Control (medio semisólido adicionado con BA; [A, G, L]), 2iP [B, H, M], NPsAg [C, I, N], y medio adicionado con BA a frecuencias de inmersión de 6 h [D, J, O], 12 h [E, K, P] y 24 h [F, Q]. En todas las fotografías la barra representa 1 cm y se muestran los brotes generados, agrupando los provenientes de un solo explante.



## 6.5 Enraizamiento y adaptación a suelo.

Una vez que se tomaron los resultados de la etapa anterior, los brotes generados fueron transferidos a medio semisólido sin RCVs, y una vez que se observó la formación de un sistema radical vigoroso, que en general tomó alrededor de 2 meses, se inició el proceso de aclimatación y adaptación a suelo.

El proceso de adaptación se llevó a cabo de acuerdo con la cantidad de brotes que se fueron generando, por tal razón, se establecieron en suelo un mayor número de plantas para algunas especies que para otras; asimismo, en algunos casos se adaptaron a suelo con mayor antelación y se cuenta con datos por un periodo de tiempo más prolongado. En la tabla 13 se muestra un resumen de los resultados generales, y posteriormente se muestran resultados pormenorizados para cada protocolo de aclimatación.

Tabla 13. Resumen de los resultados obtenidos en el proceso de aclimatación y adaptación a suelo de las plantas de agave generadas *in vitro*. Se reportan supervivencia (Superv.), diferencia en el diámetro (D.) y en la longitud de la hoja más larga (L.H.), y el tiempo final de observación (SD: sin datos).

Protocolo	Especie / Origen	Superv. (%)	Diferencia (cm)		Tiempo (meses)
			D.	L. H.	
Aclimatación en recipiente de cultivo ( 7 días)	<i>A. gigantensis</i> – BIT	100	3.2	0.9	18
	<i>A. guiengola</i> – BIT	45.8	3.4	SD	18
	<i>A. guiengola</i> - semisólido	57.1	2.2	SD	18
	<i>A. potatorum</i> - BIT	90.0	4.8	1.0	18
Aclimatación en charolas (1 día)	<i>A. durangensis</i> – BIT	25.0	-0.5	-3.0	9
	<i>A. durangensis</i> - semisólido	55.6	-1.3	-3.5	9
	<i>A. funkiana</i> – BIT	50.0	1.8	-0.6	9
	<i>A. funkiana</i> – semisólido	53.3	0.2	-2.3	9
	<i>A. gigantensis</i> - BIT	60.0	2.6	-0.8	9
	<i>A. gigantensis</i> - semisólido	66.7	2.5	-0.7	9
	<i>A. guiengola</i> – BIT	75.0	-0.5	0.17	9
	<i>A. guiengola</i> - semisólido	75.0	0.2	1.25	9
Mixto (7 días en recipiente de cultivo, 1 día en charola)	<i>A. parryi</i> - BIT	0.0	SD	SD	9
	<i>A. potatorum</i> - semisólido	30.0	0.5	-5.1	9
	<i>A. durangensis</i> – BIT	46.7	1.6	-1.1	8
	<i>A. durangensis</i> - semisólido	81.3	0.3	-2.3	8
	<i>A. funkiana</i> – BIT	90.0	2.7	0.6	2
	<i>A. funkiana</i> – semisólido	79.0	1.2	-1.3	2
	<i>A. gigantensis</i> - BIT	100	2.7	0.2	2
	<i>A. gigantensis</i> - semisólido	40.0	-0.7	-0.2	2
	<i>A. parryi</i> - BIT	33.3	2.7	-1.2	2
	<i>A. parryi</i> – semisólido	100	-0.1	-1.7	2

**6.5.1 Primer protocolo de adaptación a suelo: Aclimatación en recipiente de cultivo**

Los brotes generados *in vitro* que generaron un sistema radical vigoroso (Fig. 13 a, b y d) se aclimataron y adaptaron a suelo. Típicamente las raíces de agaves desarrolladas *in vitro* son largas y delgadas, y al momento de lavarlas y separarlas, fue inevitable que una porción de cada raíz se escindiera (Fig. 13 c). De acuerdo con observaciones previas, los agaves son capaces de desarrollarse apropiadamente aún con pequeñas porciones remanentes de raíz; sin embargo, se registró la longitud de las raíces remanentes con el propósito de dar seguimiento al desarrollo de los brotes para poder corroborar si el daño a las raíces durante el proceso de adaptarlas a suelo no compromete la supervivencia y el desarrollo de la planta.

Este primer protocolo de adaptación se efectuó con todos los brotes listos para aclimatarse en ese momento: 48 provenientes de BIT y 18 provenientes de medio semisólido de *A. guiengola*; 10 de BIT de *A. potatorum*; y 6 de BIT de *A. gigantensis*. Estas plantas se pasaron a macetas y las que sobreviven se mantienen en invernadero. Se realizó seguimiento de su supervivencia, crecimiento y apariencia general, con el fin de evaluar si hubo alguna diferencia en el desarrollo *ex vitro* de las plantas generadas en BIT o en medio semisólido (tabla 13). Cabe señalar que *A. potatorum* fue la especie en la que se logró conservar una mayor porción del sistema radical al retirar el medio de cultivo de las raíces (Fig. 14).



Fig. 13. Sistema radical desarrollado *in vitro* de *A. guiengola* dentro del recipiente de cultivo de brotes generados en BIT (a) y brotes generados en medio semisólido (d); brotes generados en BIT (b y c) y en medio semisólido (e).



Fig. 14. Brotes generados en BIT y enraizados en medio semisólido de *A. potatorum* (izq.) y *A. gigantensis* (der.).

Después de ocho meses, el 100 % de las plantas de *A. gigantensis*, el 90 % de las de *A. potatorum* y alrededor del 50 % de las de *A. guiengola* sobrevivieron. Estos índices de supervivencia se mantuvieron igual después de dieciocho meses (Fig. 15).

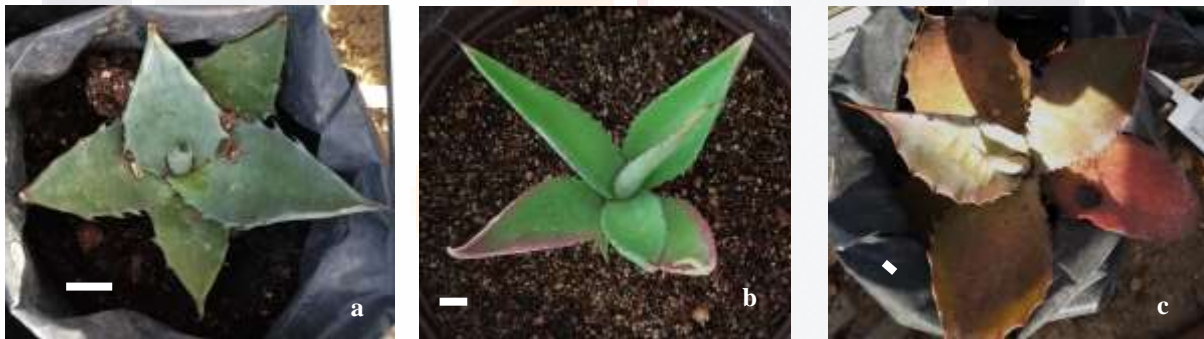


Fig. 15. Plantas de *A. gigantensis* (a), *A. guiengola* (b) y *A. potatorum* (c) después de 18 meses de ser transferidas a suelo.

### 6.5.2 Segundo protocolo de adaptación a suelo: adaptación en charolas

En este segundo protocolo se incluyeron plántulas de las seis especies; de *A. durangensis*, *A. funkiana*, *A. gigantensis* y *A. guiengola* se emplearon individuos generados en BIT y en medio semisólido (como control), de *A. parryi* solo se incluyeron individuos generados en BIT, y de *A. potatorum* solo generados en medio semisólido.

Las hojas generadas *in vitro* adquirieron tonalidades que iban de verde rojizo, verde rosáceo hasta rojo, debido al estrés causado por un aumento en la intensidad luminosa y un decremento en la humedad ambiental (Holmes, 2006). El aspecto de estas hojas originadas *in vitro* fue empeorando (Fig. 16 B, E, H, K, N, P) y la mayoría fueron muriendo a lo largo de los meses. Las hojas nuevas que aparecieron en condiciones *ex vitro* mostraron un aspecto más vigoroso, su longitud fue menor, pero su anchura y grosor mayores a las hojas originadas *in vitro*. A continuación, se describen las características observadas a los 10 meses de haber sido transferidas a suelo:

Las hojas generadas *ex vitro* de *A. durangensis* presentaron un color verde cenizo, con la base estrecha y más anchas en la porción media; dientes café oscuro, de 2-3 mm; espinas de 5-6 mm, color café oscuro (Fig. 16C).

Las hojas *ex vitro* de *A. funkiana* tenían color verde seco, con una franja longitudinal media de una tonalidad verde más clara en el haz, y varias líneas longitudinales más oscuras en el envés; dientes de color claro curvados hacia abajo, y espinas de color oscuro de aproximadamente 2 mm (Fig. 16F). Esta especie mostró una roseta muy abierta, con las hojas más viejas en una posición casi paralela respecto al sustrato.

Las hojas *ex vitro* de *A. gigantensis* mostraron una tonalidad verde brillante, en algunos individuos se observaron franjas transversales un poco más claras; los dientes curvados y de color café oscuro, al igual que las espinas (Fig. 16I).

En *A. guiengola* las hojas *ex vitro* mantuvieron una coloración rosácea en el envés, y verde brillante, a veces ligeramente rosáceo, en el haz, no obstante presentar un aspecto excelente y vigoroso; algunas hojas alcanzaron un grosor de hasta 6 mm. Los dientes presentaron una coloración casi negra; las espinas, también muy oscuras, en algunos casos de hasta 5 mm. La roseta se mantuvo con una apariencia cerrada, ya que las hojas mantuvieron una posición muy erguida, casi perpendicular al sustrato (Fig. 16L).

Las hojas *ex vitro* de *A. potatorum* mostraron un color verde seco, con dientes pequeños, aproximadamente 1 mm, de color muy claro; las espinas de color café oscuro y alrededor de 5 mm de longitud (Fig. 16Q).

Se calcularon las tasas de elongación foliar (TEF) de las hojas más largas de cada ejemplar; durante los primeros 30 días hay un notable decremento en la longitud de la hoja más larga

para *A. durangensis*, *A. funkiana*, *A. gigantensis* y *A. quiengola*, tanto en los individuos generados en BIT como en los que se obtuvieron de medio semisólido. A los 60 días las TEF promedio son cercanas a cero en *A. durangensis* y *A. gigantensis* para ambos tratamientos, y para las plantas generadas en BIT de *A. funkiana*. A partir de los 100 días en general se observan valores de TEF ligeramente positivos para las cuatro especies, bajo algunas excepciones; y a los 180 días se observa un ligero decremento de TEF (Fig. 17). Lo que se ha descrito es un patrón muy general e irregular.





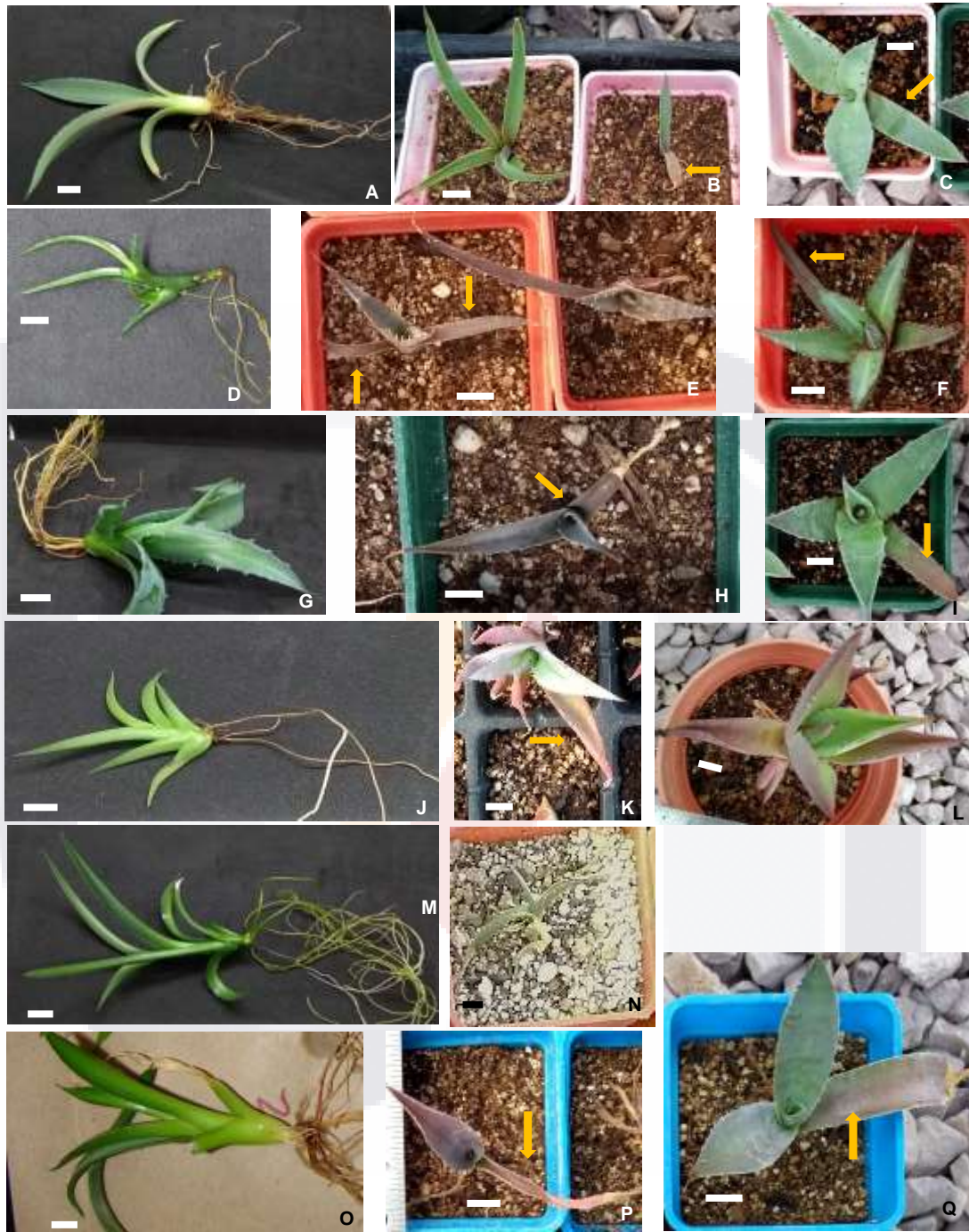


Fig. 16. Brotes generados en BIT y transferidos a suelo de *A. durangensis* (A, B, C), *A. funkiana* (D, E, F), *A. gigantensis* (G, H, I), *A. guiengola* (J, K, L), *A. parryi* (M, N) y *A. potatorum* (O, P, Q). Se muestran a los 0 días (izq.), 5 meses (centro) y 9 meses (der., excepto *A. parryi*) de haberlos sacado de los recipientes de cultivo. Las barras blancas representan 1 cm, y las flechas amarillas en las fotografías de 5 y 8 meses señalan las hojas que se desarrollaron *in vitro*; se observa claramente que son más largas, más delgadas, menos vigorosas y con distinta coloración a las hojas que se desarrollaron *ex vitro*.



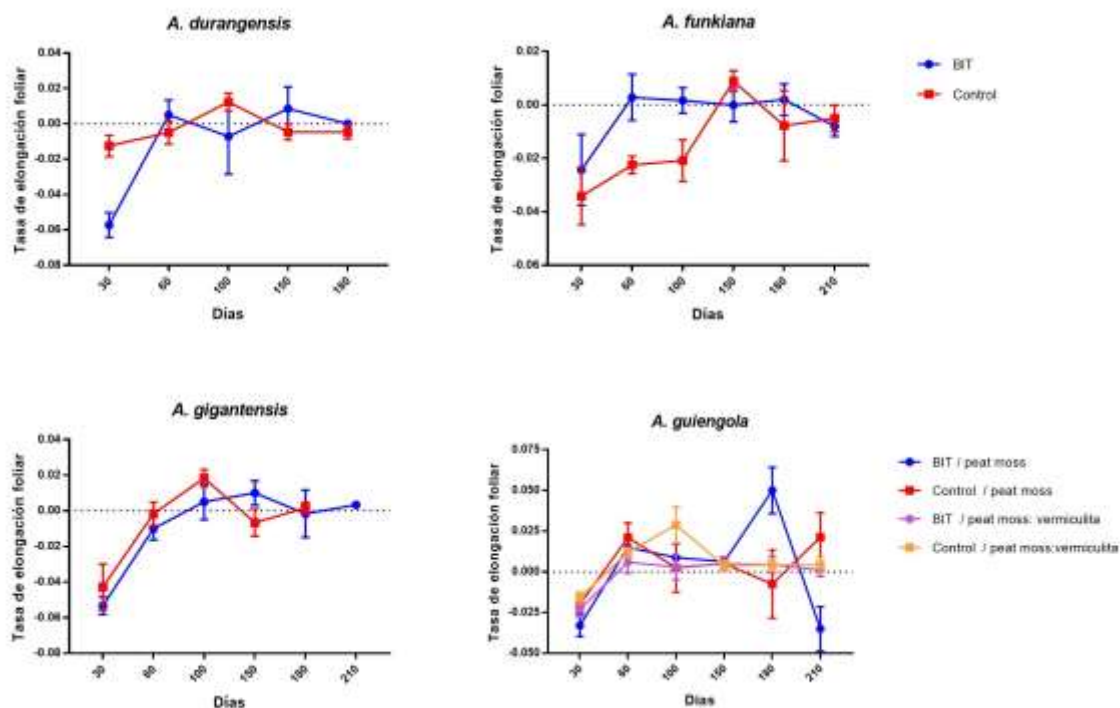


Fig. 17. Comparación de las tasas de elongación foliar de plántulas generadas en BIT y en tratamiento control (medio semisólido) de cuatro especies de agave.

## 6.6 Evaluación de la estabilidad genética de las plantas micropropagadas.

### 6.6.1 Extracción y purificación de ADN.

Se extrajo y purificó ADN de todas las especies incluidas en este proyecto; aunque en la mayoría de los casos se obtuvo ADN parcialmente degradado, se comprobó que su integridad y pureza eran suficientes para someterlo a la PCR, como se muestra en fig. 18. Las muestras se cuantificaron, y de ser necesario se diluyeron a una concentración de 5 ng /  $\mu$ l.

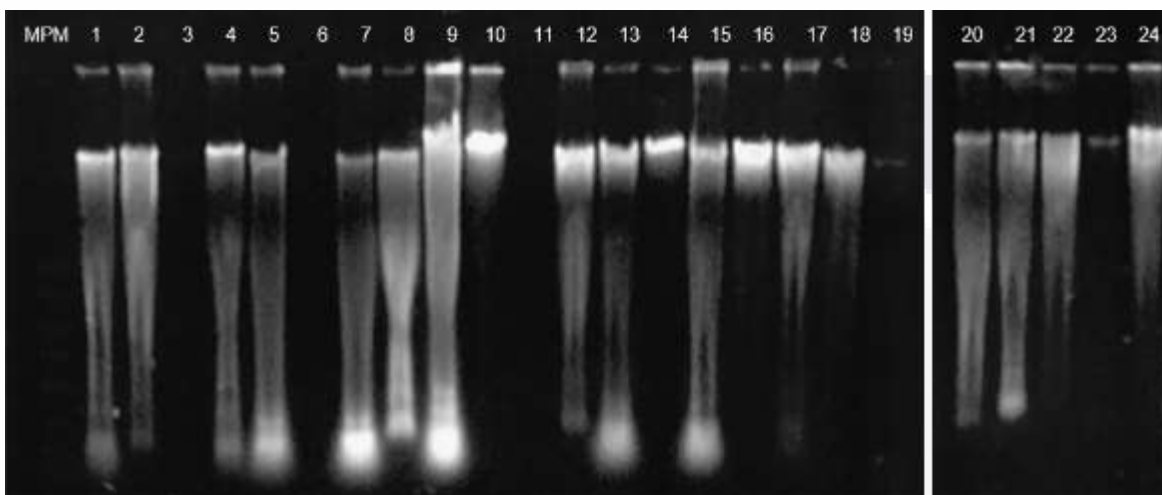


Fig. 18. Electroforesis en gel de agarosa de ADN de *A. angustifolia* (carriles 1 y 2), *A. duranguensis* (3, 4), *A. guiengola* (5, 6), *A. potatorum* (7, 8), *A. salmiana* (9, 10), *A. karwinskii* (11, 12), *A. gigantensis* (13, 14), *A. funkiana* (15, 16), *A. parrasana* (17, 18), *A. victoriae-reginae* (19, 20), *A. bracteosa* (21, 22) y *A. parryi* (23, 24). Todas las muestras pares fueron tratadas con RNasa. Aunque la mayoría de las muestras presentan degradación parcial del ADN, una parte se encuentra íntegro.

### 6.6.2 Evaluación de decanucleótidos para RAPDs

Se evaluaron los doce decanucleótidos de la serie OPA en las doce especies incluidas en este trabajo; en todos los casos se amplificaron pocas bandas, por lo que estos decanucleótidos se descartaron para el análisis de estabilidad genética. Posteriormente se probaron oligonucleótidos de la serie OPB (07, 08 y 11) y los oligonucleótidos S18, SQ1, W102 y W13 con mejores resultados; se muestran algunos de ellos en la Fig. 19.

### 6.6.3 Evaluación de decanucleótidos para ISSRs

Se evaluaron los oligonucleótidos para ISSR 811, 846, 853, 2, 10, 12, 33, 34, 36 y 39; se muestra un ejemplo de los patrones de bandeo obtenidos en la Fig. 19.

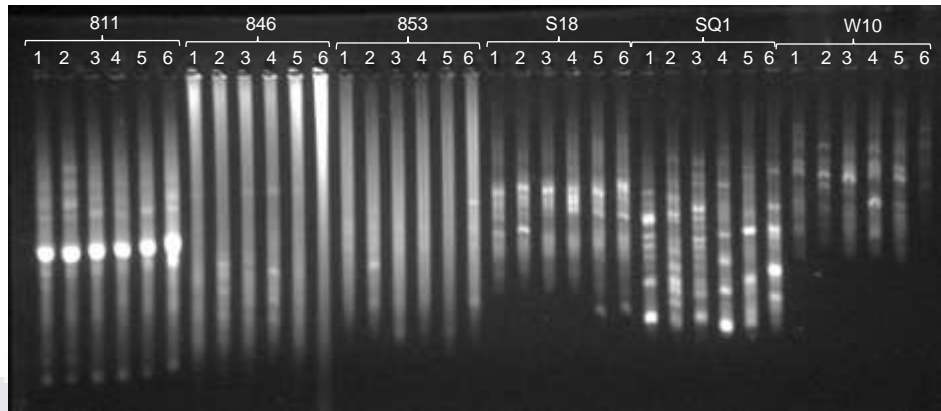


Fig. 19. Electroforesis en gel de agarosa de productos de amplificación con oligonucleótidos para ISSR (811, 846 y 853) y para RAPDs (S18, SQ1, W10) de muestras de *A. guinegola* (1), *A. durangensis* (2), *A. gigantensis* (3), *A. potatorum* (4), *A. parryi* (5) y *A. funkiana* (6). Se puede apreciar la diferencia en los patrones de bandeos.

#### 6.6.4 Marcadores RAMP

Una vez que se identificaron los oligonucleótidos que empleados de manera individual generaron la mayor cantidad de bandas, se efectuaron combinaciones de un oligonucleótido de ISSR con un decanucleótido aleatorio. En la Fig. 20 se muestra, a manera de ejemplo, los patrones de bandeo que se obtuvieron al realizar una reacción de PCR con los oligonucleótidos SQ1 y 34.

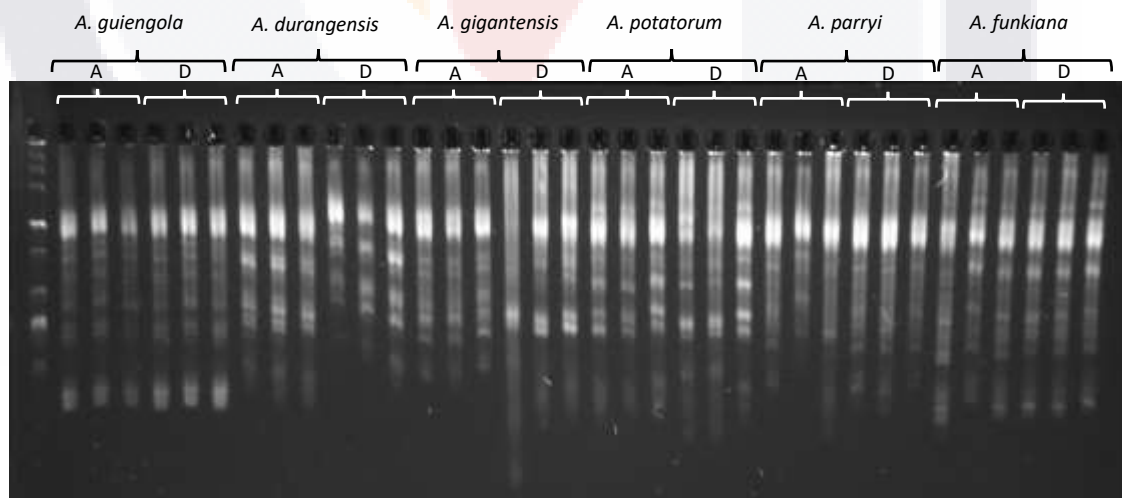


Fig. 20. Electroforesis en gel de agarosa de productos de amplificación obtenidos al emplear simultáneamente los oligonucleótidos SQ1 y 34 de muestras de ADN de las seis especies de *Agave* incluidas en el estudio. Para cada especie se utilizaron muestras de ADN de tres brotes generados en medio semisólido (A) y tres brotes generados en BIT (B).

Se analizaron los patrones de bandeo obtenidos empleando las combinaciones de oligonucleótidos S18 / 811, SQ1 / 811 y W102 / 811 y se construyeron matrices binarias considerando solo las bandas claramente visibles. En la tabla 14 se muestra la cantidad de bandas totales, polimórficas y monomórficas que se presentaron con estas combinaciones de oligos.

Tabla 14. Bandas generadas mediante RAMPs en seis especies de *Agave*, de brotes generados en medio semisólido y en BIT con medio líquido adicionado con RCVs.

Combinación de primers	Número total de bandas	Bandas polimórficas	Bandas monomórficas	% de polimorfismo
S18 / 811	13	8	5	61.54 %
SQ1 / 811	9	9	0	100.00 %
W102 / 811	15	12	3	80.00 %
TOTAL	37	29	8	78.38 %

A partir de las matrices binarias se calcularon los índices de Jaccard (Tabla 16) y se generaron dos dendrogramas (Fig. 14) a partir de dos conjuntos de individuos: el primero con datos de los individuos de cada especie no sometidos cultivo en BIT ni a RCVs; y el segundo con datos de los individuos que si fueron sometidos a estas condiciones. También se calculó la diversidad beta de cada conjunto de individuos (tabla 15).

Tabla 15. Índices de diversidad beta global de brotes de agaves cultivados en medio semisólido sin RCVs y brotes de agaves cultivados en BITs en presencia de RCVs.

Método de cultivo de los individuos analizados	INDICES							
	Whittaker	Harrison	Cody	Routledge	Wilson-Shmida	Mourelle	Harrison 2	Williams
Medio líquido en BIT / RCV	1.3324	0.0476	220.0	0.2222	17.105	0.6109	0	0
Medio semisólido sin RCV	1.7537	0.0566	187.5	0.2750	17.804	0.5743	0	0

Tabla 16. Índices de Jaccard basados en datos RAMP de cinco individuos generados en medio semisólido sin RCVs (a), y cinco individuos cultivados en BIT empleando RCV (d) de cada especie.

	a1	a2	a3	a4	a5	d1	d2	d3	d4	d5
<i>A. durangensis</i> (Adu)	a1	1.00								
	a2	0.40	1.00							
	a3	0.64	0.71	1.00						
	a4	0.60	0.67	0.93	1.00					
	a5	0.64	0.60	0.86	0.93	1.00				
	d1	0.47	0.30	0.47	0.53	0.47	1.00			
	d2	0.53	0.33	0.53	0.50	0.44	0.75	1.00		
	d3	0.57	0.35	0.56	0.53	0.47	0.80	0.92	1.00	
	d4	0.62	0.29	0.50	0.47	0.50	0.73	0.85	0.92	1.00
	d5	0.73	0.33	0.57	0.53	0.57	0.60	0.69	0.75	0.82
<i>A. funkiana</i> (Atk)	a1	1.00								
	a2	0.62	1.00							
	a3	0.57	0.92	1.00						
	a4	0.50	0.85	0.92	1.00					
	a5	0.57	0.92	1.00	0.92	1.00				
	d1	0.31	0.50	0.47	0.50	0.47	1.00			
	d2	0.31	0.50	0.47	0.50	0.47	1.00	1.00		
	d3	0.36	0.47	0.44	0.47	0.44	0.83	0.83	1.00	
	d4	0.38	0.47	0.53	0.56	0.53	0.67	0.67	0.77	1.00
	d5	0.47	0.47	0.53	0.56	0.53	0.67	0.67	0.77	0.86
<i>A. gigantensis</i> (Agi)	a1	1.00								
	a2	0.80	1.00							
	a3	0.71	0.73	1.00						
	a4	0.73	0.92	0.79	1.00					
	a5	0.59	0.71	0.63	0.64	1.00				
	d1	0.32	0.29	0.33	0.31	0.29	1.00			
	d2	0.26	0.24	0.21	0.25	0.31	0.58	1.00		
	d3	0.37	0.35	0.25	0.29	0.35	0.62	0.67	1.00	
	d4	0.38	0.36	0.31	0.38	0.27	0.55	0.60	0.64	1.00
	d5	0.35	0.33	0.29	0.36	0.25	0.50	0.70	0.73	0.88
<i>A. guiangola</i> (Agu)	a1	1.00								
	Agu-a1	0.83	1.00							
	Agu-a2	0.83	0.76	1.00						
	Agu-a3	0.72	0.87	0.75	1.00					
	Agu-a4	0.72	0.65	0.87	0.73	1.00				
	Agu-a5	0.67	0.83	0.83	0.77	0.64	1.00			
	Agu-d1	0.60	0.71	0.61	0.69	0.50	0.60	1.00		
	Agu-d2	0.79	1.00	0.83	0.73	0.53	0.77	0.80	1.00	
	Agu-d3	0.55	0.65	0.56	0.73	0.44	0.64	0.93	0.86	1.00
<i>A. parryi</i> (Apy)	a1	1.00								
	a2	0.75	1.00							
	a3	0.69	0.92	1.00						
	a4	0.64	0.85	0.92	1.00					
	a5	0.47	0.64	0.71	0.79	1.00				
	d1	0.29	0.44	0.41	0.39	0.33	1.00			
	d2	0.21	0.33	0.39	0.37	0.39	0.56	1.00		
	d3	0.24	0.38	0.44	0.50	0.35	0.35	0.50	1.00	
	d4	0.29	0.44	0.41	0.39	0.33	0.60	0.67	0.44	1.00
	d5	0.33	0.50	0.47	0.44	0.38	0.47	0.64	0.50	0.83
<i>A. potatorum</i> (Apo)	a1	1.00								
	a2	0.92	1.00							
	a3	0.50	0.53	1.00						
	a4	0.60	0.64	0.60	1.00					
	a5	0.69	0.75	0.69	0.83	1.00				
	d1	0.44	0.38	0.35	0.44	0.40	1.00			
	d2	0.30	0.32	0.30	0.44	0.33	0.47	1.00		
	d3	0.53	0.47	0.37	0.63	0.50	0.47	0.56	1.00	
	d4	0.53	0.47	0.44	0.53	0.50	0.56	0.40	0.75	1.00
	d5	0.53	0.47	0.35	0.64	0.50	0.57	0.47	0.79	0.56

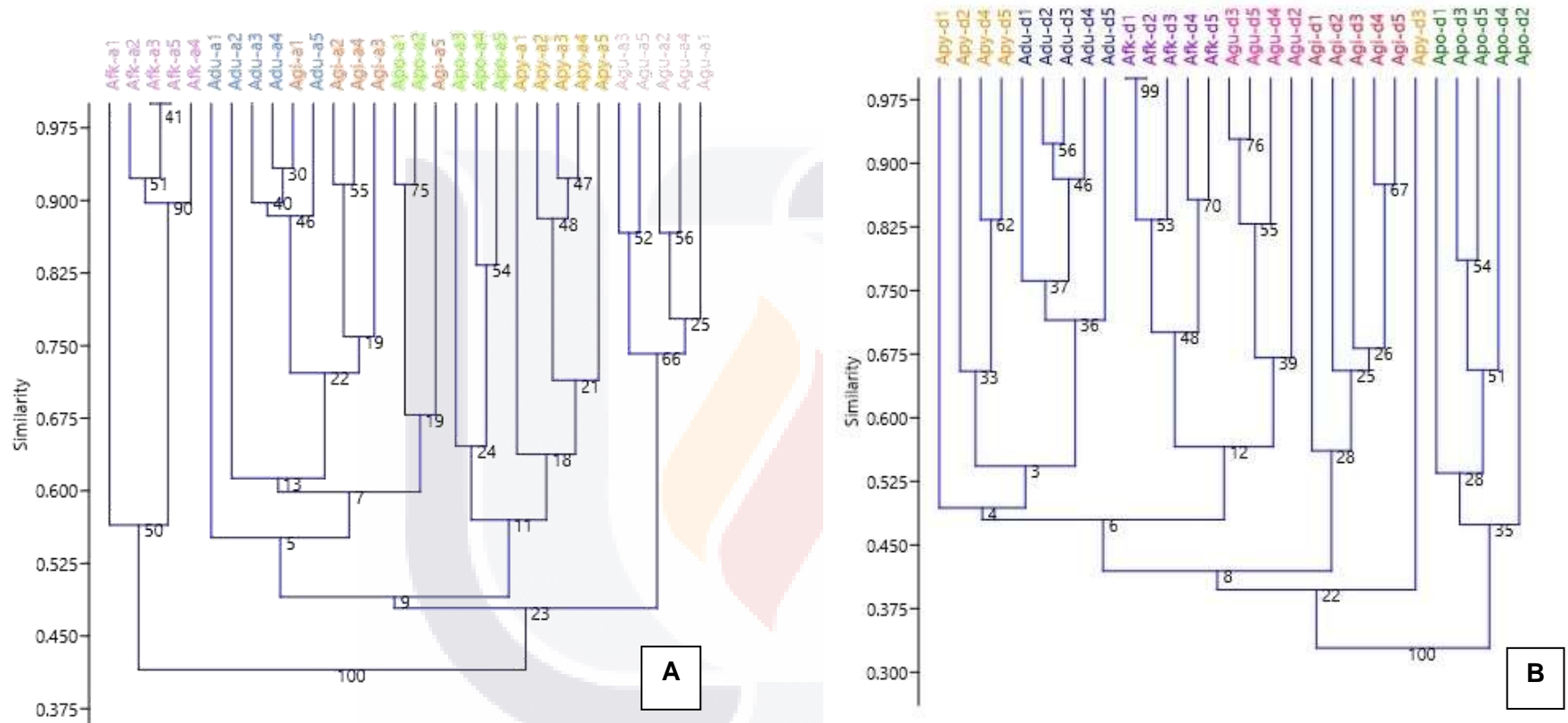


Figura 21. Dendrogramas generados con el software PAST basados en el análisis de datos obtenidos de RAMP, empleando un agrupamiento clásico e índices de Jaccard, con un Bootstrap de 1000. Se analizaron cinco individuos de cada especie no sometidos a condiciones de cultivo en BIT ni a RCVs (A), y cinco individuos de cada especie generados en BIT y sometidos a RCVs.



## VII. DISCUSION

### 7.1 Respuestas morfogénicas a las combinaciones de auxinas/citocininas en medio semisólido

En *A. guineensis* y *A. potato* se diseñaron experimentos utilizando combinaciones de una auxina (2,4-D) y una citocinina. En la primera especie se probaron la auxina 2,4-D combinada con la citocinina BA. En la segunda especie se probaron la auxina Picloran con BA. Esto para averiguar si al combinar una citocinina con concentraciones relativamente pequeñas de auxina se lograba obtener una mayor producción de brotes, o si los brotes obtenidos eran más vigorosos, como lo han reportado varios autores para otras especies de *Agave* (Robert *et al.*, 1987; Ramírez-Malagón *et al.*, 2008; Bihn *et al.*, 1990; Valenzuela-Sánchez *et al.*, 2006; Silos-Espino *et al.*, 2010; Puente-Garza *et al.*, 2015); los resultados no fueron los esperados. Para ambas especies, en todos los tratamientos con BA se presentan pocos brotes; mientras que en todos los tratamientos con 2,4-D, solo o en combinación con BA, la generación de brotes fue nula o marginal (tablas 9 y 10).

Sin embargo, en *A. guineensis* en todos los tratamientos con 2,4-D, solo o combinado con BA, se obtuvo tejido calloso, particularmente en 3.0 mg/L BA y 0.1 mg/L 2,4-D. Aún más interesante es el hecho de que varios tratamientos produjeron callo nodular (Fig. 5 b, f, g, k, l, p) en el que se presentan estructuras de aspecto globular que podrían ser embriones somáticos, así como estructuras unipolares, tubulares, con superficie pilosa (Fig. 7). Se realizó una tinción a las estructuras globulares en la que se observó que las células del embrión, en rápida proliferación, son teñidas por el acetocarmín, mientras que las células del suspensor se tiñen con azul de Evans (Gupta y Holmstrom, 2005). Otras células del callo se pueden teñir de rojo debido a su rápida proliferación, pero al no presentar suspensor es fácil distinguir los embriones somáticos (Fig. 8).

*A. potato* exhibió resultados aún menores en cuanto a formación de brotes (tabla 10). En la mayoría de los tratamientos se obtuvo tejido calloso, incluso en algunos casos se presentó callo nodular (Fig. 6 f, h, i, n, p) pero en mucho menor cantidad que lo observado en *A. guineensis*. En algunos tratamientos los explantes se oxidaron (Fig. 6 i [2.0 mg/L BA], j [2.0 mg/L BA y 0.1 mg/L 2,4-D]). Debido a la pobre respuesta, tanto en formación de brotes como de callo nodular, y a la oxidación observada en varios tratamientos, se probaron combinaciones de BA y picloran, con resultados similares para los tratamientos que combinaban ambos reguladores. Sin embargo, en los tratamientos con BA el promedio de brotes por explante fue mayor que en el primer experimento. La respuesta de un explante a uno o más RCVs agregados al medio de cultivo resulta de la suma de fenómenos que incluyen el transporte, la percepción y la señalización del RCV, en los que participan un gran número de genes (Hurný y Benková, 2017); así pues, el efecto que observamos depende no solo del RCV y la concentración que empleamos, sino del genotipo de cada

explante, lo cual es la razón de las diferencias, a veces muy amplias, en la respuesta de diferentes individuos de una misma especie a un tratamiento específico.

Por otra parte, se presentó el enraizamiento de 76.7 % de los explantes en el grupo control para *A. guiengola*, y 60 % para *A. potatozum*. Este hallazgo resultó relevante, pues ya no fue necesario efectuar otros experimentos para inducir la generación de raíces, pues quedó claro que para el enraizamiento basta con colocar los brotes en medio MS semisólido y no es necesario utilizar reguladores de crecimiento vegetal.

## **7.2 Elección de las especies con mayor capacidad de adaptación a los biorreactores, y elección del tipo de explante**

Doce especies de agaves se colocaron en BITs con el fin de evaluar su respuesta inicial a las condiciones de inmersión temporal en medio líquido. En este punto se descartaron las especies que presentaron un menor número de brotes, o problemas para ser establecidas en los BITs; tal fue el caso de *A. victoriae-reginae* que presentó contaminación persistente. Estos resultados no significan necesariamente que las especies descartadas no sean aptas para ser cultivadas en BITs, pero probablemente requerirán de condiciones más especiales, que quedan fuera de los alcances de este trabajo.

Inicialmente se contempló tomar resultados a los 60 días, y así se hizo en los primeros experimentos; en algunos de ellos, después de tomar resultados se decidió regresar los explantes al sistema BIT, y se encontró que a los 90 días puede aumentar la cantidad de brotes, además de que estos presentan mayor talla, lo que facilita no solo la toma de resultados, sino su manipulación y subcultivo (Tabla 11).

En cuanto al tipo de explante, en el caso de *A. guiengola* se probaron tanto brotes individuales como masas de brotes, y resultó mucho más eficiente el uso de masas de brotes; el uso de BIT en realidad no induce una mayor generación de brotes, sino que permite el desarrollo de los brotes demasiado pequeños generados en la etapa previa (cultivo en medio semisólido). No obstante, esto representa una ventaja respecto al sistema de propagación en medio semisólido, pues muchos de los brotes contenidos en la masa no logran elongar mientras estén adheridos al explante original, y no es posible separarlos debido a su pequeño tamaño.

En *A. gigantensis* se generaron un promedio de 5.3 brotes al utilizar como explante brotes individuales, mientras que al usar una masa como explante inicial se generaron 7.0 brotes por explante (Tabla 11); debido a que la cantidad de brotes es muy similar con ambos tipos de explantes, y no se contaba con una cantidad suficiente de masas de brotes, se decidió continuar con los siguientes experimentos empleando brotes individuales como fuente de explantes. Para el resto de las especies solo se emplearon explantes individuales

### 7.3 Condiciones del biorreactor y otros factores

Uno de los factores decisivos en el establecimiento de cultivos en BITs es la elección del tiempo y frecuencia de inmersión apropiados para cada especie, con el objeto de reducir la proporción el fenómeno de hiperhidricidad (Ziv, 2005). Debido a que los agaves son plantas adaptadas a condiciones de baja disponibilidad de agua, y considerando que en plantas de arquitectura arbustiva o arbórea se utilizan frecuencias de inmersión muy largas, se determinó que el tiempo de inmersión debe ser el menor posible (1 min), y se hipotetizó que la frecuencia de inmersión debía ser un tiempo de medio (6 h) a largo (24 h). Por esta razón se decidió probar frecuencias de inmersión de 6, 12 y 24 h.

Aunque para desarrollar un protocolo de micropropagación en biorreactores es conveniente partir de un protocolo de micropropagación establecido en medio semisólido, se debe tener en cuenta que la respuesta de una especie a las mismas condiciones (por ejemplo, a un RCV) puede diferir entre el medio semisólido y el biorreactor, debido a que hay mayor disponibilidad de los RCV agregados al medio de cultivo y es mayor el área de absorción del explante (Berthouly y Etienne, 2005). Por esa razón, en los BIT inicialmente se emplearon los RCVs que resultaron óptimos en experimentos previos en medio semisólido, y posteriormente se probó con una segunda citocinina (2iP).

También se decidió probar el efecto de NPsAg en las especies de agaves incluidas en este proyecto. Aunque algunos investigadores han encontrado que las NPsAg tienen un efecto negativo en algunas especies vegetales, otros estudios han reportado efectos positivos en otras. Por ejemplo, Spinoso-Castillo *et al.* (2017) emplearon NPsAg para el cultivo de *Vainilla planifolia* Jacks. Ex Andrews en BITs; observaron un efecto antimicrobiano, y también registraron efectos positivos en la tasa de crecimiento, un incremento en la capacidad antioxidante, y encontraron evidencia de una mayor eficiencia en el uso de nutrientes. Es evidente que el efecto de las NPsAg es distinto entre diferentes especies vegetales, y no es posible generalizar, afirmando que las respuestas que causan son benéficas o deletéreas, sino que se debe ponderar caso por caso. Por esta razón se decidió evaluar si los cultivos en BITs del género *Agave* exhiben una respuesta positiva o negativa a las NPsAg.

Una vez que se probaron todos estos tratamientos, se pudo realizar un análisis global de todos ellos para determinar cuál es el mejor para cada especie.

En *A. durangensis*, *A. funkiana* y *A. gigantensis* la cantidad de brotes generados por explante es mayor en el tratamiento control (3.94, 3.07 y 2.90 brotes por explante, respectivamente), aunque la diferencia no resultó estadísticamente significativa al resto de los tratamientos. Sin embargo, el uso de biorreactores tipo tanque gemelo supone un ahorro importante de recursos, considerando que el gelificante es el componente más costoso de un medio de cultivo.

En *A. potatorum* la cantidad de brotes si fue mayor en BIT-24 h y BIT-6 h (5.60 y 4.86 brotes por explante, respectivamente), y la proporción de brotes hiperhidratados en ambos casos es cercana al 20 %.

El uso de 2iP redujo la cantidad de brotes generados en *A. durangensis*, *A. funkiana*, *A. gigantensis*, *A. guiengola* y *A. potatorum*; el tamaño de los brotes en este tratamiento fue menor en comparación al resto, excepto en *A. funkiana*. En cambio, para *A. parryi* este tratamiento con 2iP fue el que mayor cantidad de brotes por explante generó (1.9), y en cuanto a la longitud de los brotes solo fue superado por BA – 12 h. Sin embargo, el 84.2 % de los brotes generados en 2iP se hiperhidrató, mientras que en el resto de los tratamientos no se presentó hiperhidratación, excepto BA – 12 h con solo un 8 % de brotes hiperhidratados. Así pues, no es aconsejable utilizar 2iP en estas especies, resultó mejor emplear BA en todas ellas.

El uso de NPsAg solo mostró un efecto positivo en la generación de brotes en *A. guiengola* y *A. potatorum*, además de que su longitud fue mayor. En ambas especies, este tratamiento fue el que presentó un mayor número de brotes hiperhidratados, 35 % para *A. guiengola* y 85 % para *A. potatorum*; en esta última la hiperhidratación si representa un serio inconveniente. En *A. durangensis* y *A. funkiana* se obtuvieron brotes de mayor tamaño con este tratamiento que con cualquier otro, pero el número de brotes por explante fue menor.

El porcentaje de explantes que generaron brotes es un factor importante que considerar en un protocolo de propagación *in vitro*, y fue fuertemente influenciado por la cantidad de explantes que se necrosaron o presentaron hiperhidratación (tabla 12). Vale la pena comentar dos fenómenos que se observaron: 1) los explantes que se necrosaron evidentemente no produjeron brotes, pero los explantes hiperhidratados en ocasiones sí lo hicieron, en su mayoría también hiperhidratados; y 2) entre los explantes que se colocaron en un mismo biorreactor, en varias ocasiones se observó que algunos conservaron una morfología normal, mientras que otros se necrosaron o hiperhidrataron (Fig. 11B, 11D, 11I). Así pues, podemos descartar una falla en los biorreactores para explicar la hiperhidratación o necrosis de los explantes; esta respuesta, aunque negativa, también depende del genotipo del individuo.

La especie que presentó mayores problemas de hiperhidratación de explantes fue *A. durangensis*, que alcanzó hasta 86.7 % de explantes hiperhidratados con NPsAg, seguida por *A. parryi* con 60 % en el tratamiento con 2iP, lo que se tradujo en una menor formación de brotes en *A. durangensis*, y una proporción muy grande de brotes hiperhidratados en *A. parryi*. Mientras que *A. funkiana* y *A. guiengola* sólo registraron explantes hiperhidratados con las NPsAg, y en el resto de los tratamientos no se presentó este fenómeno.

En cuanto a la necrosis de los explantes, ocurrió con mayor frecuencia en *A. durangensis* y *A. gigantensis*, hasta en un 40 % y 58 % respectivamente, en el tratamiento con 2iP; justamente fue este tratamiento el que produjo menor cantidad de brotes en ambas

especies. En *A. funkiana* se presentó un 28.6 % de explantes necrosados en el tratamiento BIT – 6 h, sin embargo, fue uno de los tratamientos que generaron la mayor cantidad de brotes, apenas superado por el tratamiento control. En el resto de las especies, la proporción de explantes necrosados fue nula o muy baja.

*A. guiengola* mostró una capacidad notablemente mayor para generar brotes que todas las demás especies, lo cual se puede atribuir a características genéticas y fisiológicas propias. Por otro lado, también fue la especie cuyos brotes mostraron el tamaño promedio más pequeño (solo 1.56 cm con el mejor tratamiento, NPsAg), lo que podría deberse a que los nutrientes en el medio fueron distribuidos entre los numerosos brotes que se desarrollaron. En investigaciones posteriores sería conveniente explorar alternativas para lograr un incremento en el tamaño de los brotes, por ejemplo, incorporar medio fresco con una frecuencia de 15 ó 30 días, con el fin de proporcionar a los brotes una concentración de nutrientes óptima y un poco más constante.

En resumen, el uso de biorreactores de inmersión temporal de tipo tanques gemelos es recomendable en las seis especies de agaves evaluadas: en *A. guinegola* y *A. potatorum* se generaron más brotes empleando BITs que en medio semisólido; y aunque en *A. durangensis*, *A. funkiana*, *A. gigantensis* y *A. parryi* la cantidad de brotes obtenidos fue un poco mayor en medio semisólido, la diferencia no fue estadísticamente significativa, y el ahorro que implica no usar gelificante justifica con suficiencia la elección a favor del uso de BITs.

#### **7.4 Aclimatación y adaptación a suelo**

Esta etapa dependía completamente de los resultados de propagación *in vitro*, tanto en BITs como en medio semisólido (tratamiento control). Por tal motivo, el número de individuos y el momento en que se aclimataron no fue homogéneo.

Se efectuó el primer protocolo de adaptación que consistió en una aclimatación gradual en el propio recipiente de cultivo, aflojando paulatinamente la tapa durante una semana, con brotes que presentaron raíces largas y vigorosas de *A. gigantensis*, *A. guiengola* y *A. potatorum* generados en BITs, y con brotes de *A. guiengola* provenientes del tratamiento control. Después de 8 meses, sobrevivieron el 90 % de los brotes de *A. potatorum*, el 100 % de *A. gigantensis*, mientras que para *A. guiengola* solo el 45.8 y 57.1 % de las generadas en BIT y en medio semisólido, respectivamente. En *A. guiengola* no hubo diferencia entre plantas generadas en BIT o en tratamiento control, y la alta tasa de mortalidad se atribuye a que el hábitat natural de *A. guiengola* es más húmedo y templado que para el resto de los agaves, ya que en la formación Guiengola se registran temperaturas que van de los 10 a los 20 °C y precipitaciones anuales de 600 – 1000 mm (INEGI, 2005). Así pues, se consideró necesario diseñar otro protocolo de aclimatación y adaptación a suelo que



garantizara una mayor humedad a las plantas de agave durante las primeras semanas de haber sido transferidas a suelo.

El segundo protocolo de aclimatación consistió en abrir de golpe el recipiente de cultivo, sacando los brotes enraizados de inmediato, colocarlos sobre papel de estraza dentro de una bolsa de plástico, durante 24 horas, con el propósito de mantener las plantas con una humedad relativa mayor a la ambiental. Después se pasaron a suelo, empleando charolas de germinación con 50 divisiones, la que a su vez se colocó sobre una segunda charola que se mantuvo con un nivel de agua de al menos el 50 % de su capacidad total, para que las plantas la tomaran por absorción y así procurar que el sustrato tuviera una humedad óptima durante todo el tiempo. Durante las dos primeras semanas, las charolas se mantuvieron dentro de bolsas de plástico. Este protocolo se aplicó a brotes enraizados originarios tanto de BIT como del tratamiento control para todas las especies incluidas en este trabajo, excepto para *A. parryi* (solo plantas generadas en BIT) y *A. potatorum* (solo plantas generadas en tratamiento semisólido). Para todas las especies se empleó peat-moss:vermiculita como sustrato; mientras que para *A. guiengola* se probaron dos sustratos: solo peat-moss y peat-moss:vermiculita. Después de nueve meses, con este tratamiento se logró aumentar el índice de supervivencia de *A. guiengola* alrededor de 75 % para plantas generadas en BIT y tratamiento control, en ambos sustratos. Sin embargo, el índice de supervivencia disminuyó en *A. gigantensis* (aproximadamente 60 %) y *A. potatorum* (30 %), en comparación con el primer protocolo de aclimatación y adaptación a suelo. *A. funkiana* tuvo alrededor de 50 % de supervivencia, y *A. durangensis* 25 % para las plantas originadas en BIT y 55.6 para las originadas en medio semisólido. Ninguna planta de *A. parryi* sobrevivió. En todas las especies se observó que las plantas que murieron presentaron pudrición del tallo y de la base de las hojas; es importante encontrar el balance en los patrones de riego durante las primeras semanas después de la adaptación a suelo, para mantener en un óptimo estado de hidratación a los brotes, pero sin regar en demasía, pues cualquier planta generada *in vitro*, más aún plantas de especies adaptadas a condiciones de baja disponibilidad de agua, pueden presentar daño por ahogamiento, pero también hay que evitarles el estrés por la baja humedad atmosférica, ya que al haber sido recién tomados de un ambiente totalmente controlado, no están lo suficientemente endurecidos para tolerar condiciones de sequía.

Se probó un tercer tratamiento en *A. durangensis*, *A. funkiana* y *A. gigantensis* (BIT y control) y *A. parryi* (BIT), que consistió en una aclimatación gradual por 7 días dentro del recipiente de cultivo, para luego sacar los explantes y colocarlos sobre papel estraza dentro de bolsas de plástico por un día. Después de dos meses, los índices de supervivencia mejoraron, aunque se espera que la mortalidad de estas plantas aumente en los siguientes meses.

La metodología para aclimatar y adaptar a suelo los brotes generados y enraizados *in vitro* debe validarse para cada especie. Mientras que una aclimatación gradual es adecuada para *A. durangensis*, *A. funkiana*, *A. gigantensis* y *A. potatorum*, una aclimatación de más corta



duración, pero que garantice una alta humedad ambiental y un sustrato permanentemente hidratado, es lo óptima para *A. guiengola*. Sin duda, el hábitat natural al que está adaptada cada especie marca la pauta para las condiciones apropiadas para el desarrollo de cada una de ellas.

Ninguno de los protocolos probados fue apropiado para *A. parryi*; este agave se distribuye de manera natural en laderas rocosas de pastizales, chaparrales, bosques de pino y de encino, donde hay precipitaciones anuales de 500-1000 mm, con una larga sequía durante la primavera (Gentry, 1982). Así pues, se considera conveniente probar en un futuro otros sustratos que simulen el tipo de suelo rocoso al que está adaptado este agave.

Al sacar los brotes enraizados de sus recipientes de cultivo, se registraron diámetro, la longitud de la parte aérea y de la raíz, la longitud de la hoja de mayor tamaño, y el número de hojas. No hubo correlación entre ninguno de estos parámetros y la supervivencia de las plantas.

Para dar seguimiento a su desarrollo, periódicamente se midieron y registraron nuevamente el diámetro, la longitud de la parte aérea y de la hoja de mayor tamaño, y el número de hojas. En general, en los primeros dos meses se observa un pequeño incremento en el diámetro promedio, que decrece a los nueve meses, y en los casos en los que se cuenta con observaciones durante más tiempo, aumenta a los 18 meses.

Para los ejemplares aclimatados con el segundo protocolo, se calculó la tasa de elongación foliar (TEF) durante nueve meses. La tendencia en todas las especies fue un decremento en TEF los primeros 30 días; valores cercanos a cero del día 60 al 180, y en algunos casos un ligero aumento (menor al 0.05) en TEF a los 120 días. Lo anterior describe una tendencia general, pero al analizar especie por especie, los cambios en TEF en realidad son muy erráticos (Fig. 17).

Ninguno de los parámetros monitoreados aporta datos significativos respecto al desempeño *in vitro*; la razón es que las hojas generadas *in vitro* fueron muriendo de manera paulatina, y las nuevas hojas generadas en condiciones *ex vitro*, aunque más vigorosas, tenían menos longitud que las de origen *in vitro*; por tal motivo, se redujo el diámetro, longitud aérea, longitud de la hoja de mayor longitud (que en el caso de los agaves es la hoja más vieja, y la primera que muere) y, desde luego, el número de hojas. Estas hojas como órganos individuales fueron incapaces de adaptarse al ambiente externo; primero adquirieron tonalidades rojizas, después perdieron su turgencia, y finalmente murieron (Fig. 16). Este fenómeno se ha reportado en varias especies vegetales: a las hojas generadas *in vitro* les resulta imposible desarrollarse en condiciones *ex vitro*, y son reemplazadas por hojas nuevas (Chandra *et al.*, 2010). En todas las especies de agaves incluidas en este trabajo, las hojas desarrolladas *in vitro* no presentaron succulencia, su cutícula resultó muy delgada y con muy poca cera depositada en la superficie; se ha reportado que las plantas desarrolladas *in vitro* tienen atrofiado el sistema de apertura-cierre de estomas (Ivanova y

Van Staden, 2010), por lo que les es difícil mantener el balance hídrico una vez que se sacan de los recipientes de cultivo.

Las hojas de los agaves son altamente especializadas, y no es factible que las hojas que desarrollaron características para adaptarse al ambiente *in vitro*, una vez transferidas a condiciones *ex vitro* sean capaces de cambiar drásticamente su morfología. Por otra parte, si se considera que los agaves son plantas de crecimiento muy lento, el reemplazo de las hojas generadas *in vitro* por hojas generadas *ex vitro* lleva mucho más tiempo que para otras especies vegetales de crecimiento más rápido, y en consecuencia no se observará un crecimiento neto a corto plazo.

A pesar de no lograr sobrevivir a las condiciones externas, las hojas generadas *in vitro* cumplieron una importante función, ya que mantuvieron con vida a la planta mientras esta generaba nuevas hojas, estas sí adaptadas a las condiciones de invernadero; estas hojas generadas *ex vitro* presentaron succulencia, cutículas cerasas bien desarrolladas, y su coloración y morfología corresponden a las señaladas por Gentry (1982), salvo la longitud de las espinas, lo que probablemente se deba a que las hojas aún están muy lejos de alcanzar su longitud definitiva.

Las hojas de *A. guiengola* generadas *ex vitro* mostraron una morfología similar a la descrita en bibliografía, sin embargo, conservaron una coloración rosácea en el envés y en el margen del haz. Gentry (1982) reportó que es común encontrar individuos que crecen a la sombra en condiciones silvestres, y sugirió que podrían tolerar condiciones de sombra ligera sin deformarse como otras especies de *Agave*. En este mismo orden de ideas, también se puede suponer que sometidas a alta intensidad luminosa y a temperaturas mucho más altas que las que experimentaron en el cuarto de cultivo, experimentaron estrés fotooxidativo; se ha reportado que en respuesta a este tipo de estrés las plantas acumulan pigmentos fotoprotectores como antocianinas, que confieren a las hojas coloraciones rosáceas o purpúreas (Holmes, 2006).

### **7.5 Evaluación de la estabilidad genética de las plantas micropropagadas.**

Los RAPDs amplifican secuencias genómicas de manera aleatoria, y han sido ampliamente utilizados para la caracterización genética de clones, híbridos somáticos y mutantes; por su parte, los microsatélites se han empleado para evaluar la variación genética intra e interespecífica, y se ha observado que son específicos para grupos de especie, por lo que son adecuados para el estudio entre especies de un mismo género (Eguiarte *et al.*, 2007).

En la práctica, al emplear RAPDs e ISSR *a priori* no hay certidumbre de cuáles oligonucleótidos generarán un patrón de bandas útiles, incluso hay algunos que generan una cantidad demasiado pequeña de bandas o ninguna en absoluto, por lo que es necesario probar varios iniciadores y seleccionar aquellos que generen patrones de bandeado que permitan identificar polimorfismos. Después de identificar por separado cuáles de los

iniciadores para RAPDs e ISSR generaron patrones de bandeo adecuados, capaces de detectar polimorfismos entre individuos, se diseñaron y probaron combinaciones de iniciadores para ambos tipos de marcadores moleculares (Fig. 13).

Los patrones de bandas observados se emplearon para la construcción de matrices binarias, utilizando únicamente las bandas visibles de manera inequívoca.

Para cada especie, se calcularon los índices de similitud de Jaccard para comparar a cinco individuos cultivados en medios semisólido sin RCV (SS) entre sí; también se compararon entre sí los cinco brotes generados en BIT con medio adicionado con RCV (BIT/RCV); y finalmente, se compararon todos los brotes SS contra los brotes BIT/RCV (tabla 12).

Torres-Morán *et al.* (2010) utilizaron ISTR (sequence-tagged repeat) como marcadores moleculares para analizar la fidelidad genética entre plantas progenitoras y plantas hijas de *A. tequilana* propagadas asexualmente mediante rizomas contra plantas obtenidas de cultivos *in vitro* por embriogénesis somática y por proliferación de yemas axilares. Encontraron que, dentro de cada método de proliferación, las plantas hijas no eran idénticas a la planta madre, y este fenómeno no solo se observó en las producidas *in vitro*, sino también las propagadas de manera natural; aún más, las plantas que mostraron una mayor fidelidad genética fueron las propagadas *in vitro* mediante yemas axilares. Sánchez-Teyer *et al.* (2009) emplearon AFLP para estudiar poblaciones silvestres de *A. angustifolia*; encontraron que había variación genética entre las plantas madre y plantas hijas generadas del rizoma.

En este trabajo no se analizaron clones provenientes de la misma planta madre, sino que se eligieron al azar cinco plantas de cada especie que se mantuvieron en medio semisólido, y no fueron expuestas a RCV (SS), y cinco plantas que fueron generadas en BIT empleando medio líquido adicionado con BA (BIT/RCV). El objetivo era evaluar si la variación genética observada en el grupo SS era igual a la variación observada en BIT/RCV.

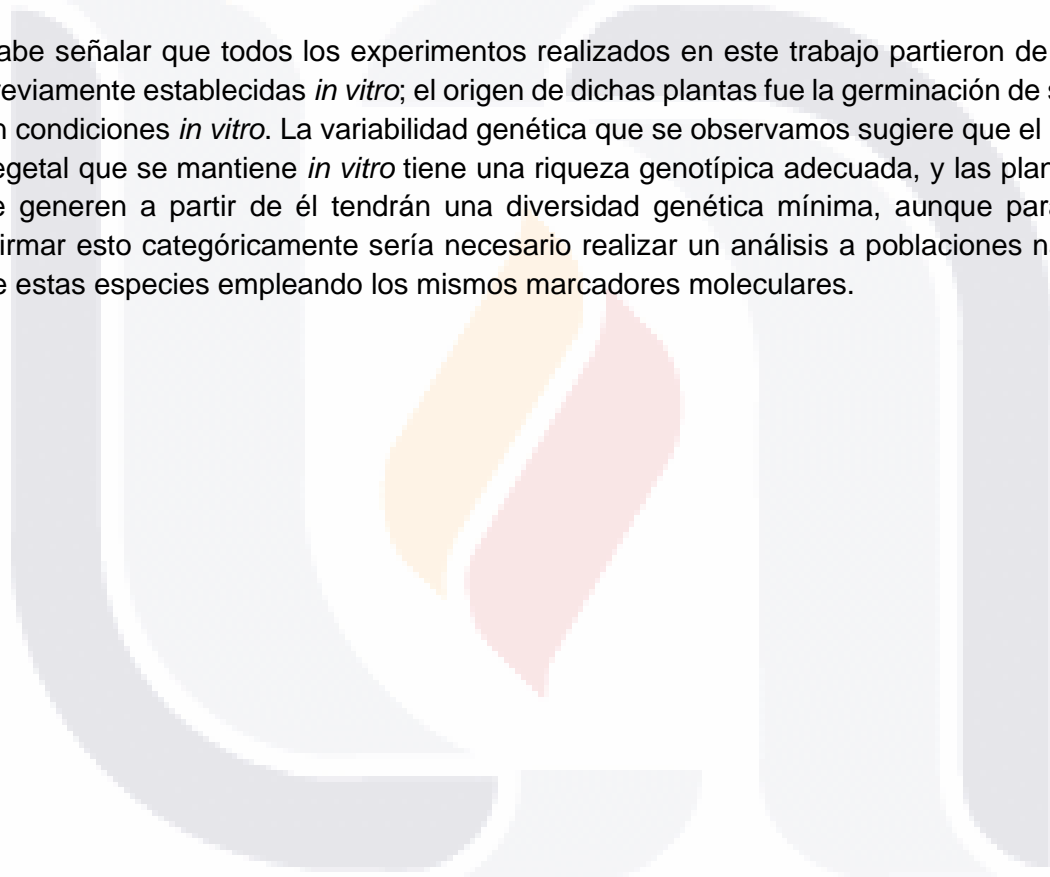
Los índices de Jaccard muestran una variación genética similar entre el grupo SS y el grupo BIT/RCV en todas las especies; la especie que mostró una diferencia mayor entre ambos grupos fue *A. parryi* con un índice de Jaccard promedio de 0.74 para el grupo SS y de 0.56 para el grupo BIT/RCV.

Ahora bien, los índices de Jaccard resultantes de comparar los patrones de bandeo de individuos del grupo SS con los de individuos del grupo BIT/RCV, en general muestran diferencias mayores que las observadas en índices intragrupal. Estas diferencias son más pronunciadas en *A. gigantensis* (0.21-0.38) y *A. parryi* (0.21-0.50), que en el resto de las especies (*A. quiengola* (0.44-1.00), *A. durangensis* (0.29-0.73), y *A. potatorum* (0.30-0.64), *A. funkiana* (0.31-0.56)).

Los dendrogramas se construyeron analizando los datos de las seis especies de manera simultánea; el agrupamiento de individuos de la misma especie es más consistente entre los del grupo BIT/RCV que entre los del grupo SS, ya que en este último hay uno o dos individuos de *A. durangensis*, *A. giganteensis*, y *A. potatorum* que se agrupan más cercanamente con individuos de otras especies que con el resto de los de la suya propia. Pero los dendrogramas para ambos grupos (SS [a] y BIT/RCV [d]) son muy similares.

El análisis de todos estos hallazgos nos permite afirmar que el uso de BIT y BA no es una fuente significativa de variación genética en las seis especies de *Agave* analizadas, esto al menos en el número de ciclos de cultivo llevados a cabo en este trabajo.

Cabe señalar que todos los experimentos realizados en este trabajo partieron de plantas previamente establecidas *in vitro*; el origen de dichas plantas fue la germinación de semillas en condiciones *in vitro*. La variabilidad genética que se observamos sugiere que el material vegetal que se mantiene *in vitro* tiene una riqueza genotípica adecuada, y las plantas que se generen a partir de él tendrán una diversidad genética mínima, aunque para poder afirmar esto categóricamente sería necesario realizar un análisis a poblaciones naturales de estas especies empleando los mismos marcadores moleculares.



## VIII. CONCLUSIONES

1. La combinación de BA con auxinas (2,4-D en *A. guiengola* y *A. potatorum*, y con Pic en *A. potatorum*) no fue capaz de inducir la generación ni desarrollo de brotes adventicios en estos agaves, pero sí la generación de callo. En particular los tratamientos que consistieron en  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de BA combinado con 0.1 o  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  de 2,4-D generaron callo nodular potencialmente embriogénico en ambas especies.
2. En *A. guiengola* se obtuvieron masas de brotes empleando 1 y  $3 \text{ mg L}^{-1}$  BA. Estas masas de brotes son el mejor explante a utilizar en BITs, y cuando estén disponibles, es altamente recomendable emplearlas en lugar de brotes individuales.
3. Con el uso de BITs de tipo tanque gemelo se obtienen menos brotes en comparación al control (uso de medio semisólido) para *A. durangensis*, *A. funkiana* y *A. gigantenses*; sin embargo, la diferencia en el promedio de brotes generados no es estadísticamente significativa, mientras que el hecho de no requerir adición de gelificantes si supone una notoria ventaja debido a la reducción de costos.
4. El uso de BITs, en comparación con el control, incrementó el promedio de brotes por explante: de 11.67 a 38.33 en *A. guiengola*, y de 3.80 a 5.60 en *A. potatorum*. En *A. guiengola* los brotes generados en BIT tuvieron una longitud promedio de 1.27 cm, 1.7 veces mayor al control.
5. La adición de NPsAg al medio líquido ocasionó un decremento en el promedio de brotes por explante en *A. durangensis*, *A. funkiana*, *A. gigantensis* y *A. parryi*. La diferencia no es estadísticamente significativa.
6. La adición de NPsAg al medio líquido causó un incremento estadísticamente significativo en el promedio de brotes por explante generados en *A. potatorum* (8.47), pero el 85 % de ellos presentaron hiperhidratación.
7. En *A. guiengola*, la adición de NPsAg al medio líquido incrementó el promedio a 130.67 brotes por explante, lo que es 288 % mayor en comparación con el uso de medio líquido adicionado solo con  $1 \text{ mg L}^{-1}$  BA, y los brotes obtenidos presentaron una longitud promedio de 1.56 cm, mayor al resto de los tratamientos.
8. El uso de 2iP no es recomendable para ninguna de estas especies, pues el número de brotes generados por explante es menor que al emplear BA; la excepción es *A. parryi*, donde sí se incrementó el promedio de brotes por explante de 1.35 (control), a 1.90 (2iP); no obstante, la diferencia no fue significativa, y el 84.2 % de los brotes presentaron hiperhidratación.
9. El enraizamiento de *A. durangensis*, *A. funkiana*, *A. gigantensis*, *A. guiengola*, *A. parryi* y *A. potatorum* se logra transfiriendo los brotes a medio semisólido sin necesidad de echar mano de ningún RCV.

10. *A priori* se consideró que las seis especies de agaves incluidas en este proyecto podrían ser aclimatadas al ambiente externo y adaptadas a suelo siguiendo el mismo protocolo. No fue así: *A. guiengola* y *A. parryi* tienen requerimientos distintos a las otras especies evaluadas, debido a que, en su hábitat natural, las condiciones a las que están adaptadas presentan diferencias importantes con respecto a los otros agaves.
11. A raíz de los resultados obtenidos, en el caso de *A. guiengola* proponemos una estrategia de propagación en dos pasos: primero obtener masas de brotes en medio semisólido adicionado con BA, y segundo lograr la diferenciación y elongación de esos pequeños brotes en BITs tipo tanques gemelos, adicionando al medio líquido BA y NPsAg.
12. Paulatina pero inevitablemente las hojas generadas *in vitro* mueren una vez que las plantas son transferidas a suelo, pues son incapaces de modificar su morfología, y tal vez su fisiología, al ambiente externo; consideramos que la clave del éxito en la adaptación consiste en que estas hojas sobrevivan hasta que la planta comience a generar hojas *in vivo*.
13. El uso de BITs y BA no generan una variación genética en las plantas de agave micropropagadas, por lo que se puede afirmar que el material genético de los brotes generados mantiene la fidelidad genética con respecto a las plantas madre.



## IX. BIBLIOGRAFIA

1. Afreen, F., 2008. Temporary immersion bioreactor. En: Plan Tissue Culture Engeneering. Gupta, S.D., Ibaraki, Y. (Eds). Springer. 187-201
2. Alfaro-Rojas, G., Legaria-Solano, J.P., Rodríguez-Pérez, J.E. 2007. Diversidad genética en poblaciones de agaves pulqueros (*Agave spp.*) del nororiente del Estado de México. Revista Fitotecnia Mexicana. 30:1:1-12
3. Arizaga, S., Ezcurra, E. 2002. Propagation mechanisms in *Agave macroacantha* (Agavaceae), a tropical arid-land succulent rosette. American Journal of Botany. 89: 632-641.
4. Avendaño-Arrazate, C.H., Iracheta-Donjuan, J., Godínez-Aguilar, J.C., López-Gómez, P., Barrios-Ayala, A. 2015. Caracterización morfológica de *Agave cupreata*, especie endémica de México. Revista Internacional de Botánica Experimental. 84:148-162
5. Benson, E., 1999. An Introduction to Plant Conservation Biotechnology. En: Plant Conservation Biotechnology. Benson, E. (Ed). Taylor & Francis. 3-10
6. Berthouly, M., Etienne, H. 2005. Temporary immersion system: a new concept for use liquid médium in mass propagation. En: Liquid Culture Systems for *in vitro* Plant Propagation. Hvoslef-Eide, A.K., Preil, W. (Eds). Springer. 165-195
7. Binh, L.T., Muoi, L.T., Oanh, H.T.K., Thank, T.D., Phong, D.T. 1990. Rapid propagation of agave by *in vitro* tissue culture. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 23:67-70.
8. Carneiro-Vieira, M.L., Santini, L., Lima-Diniz, A., de Freitas-Munhoz, C. 2016. Microsatellite markers: what they mean and why are so useful. Genetics and Molecular Biology. 39:312-328.
9. Cervantes-Ramírez, M.C. 2005. Plantas de importancia económica en zonas áridas y semiáridas de México. Anais do X Encontro de Geógrafos da América Latina. Universidade de São Paulo. 3388-3407
10. Chandra, S., Bandopadhyay, R., Kumar, V., Chandra, R. (2010). Acclimatization of tissue cultured plantlets: from laboratory to land. Biotechnology Letters. 32:9:1199-1205
11. Chase, M.W., Reveal, J.L., Fay, M.F. 2009. A subfamilial classification for the expanded asparagalean families Amaryllidaceae, Asparagaceae and Xanthorrhoeaceae. Botanical Journal of the Linnean Society. 161:2:132-136
12. Das, T. 1992. Micropropagation of *Agave sisalana*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 31:253-255
13. De-la-Peña, C., Nic-Can, G., Ojeda, G., Herrera-Herrera, J., López-Torres, A., Wrobel, K., Robert-Díaz, M.L. 2012. *KNOX1* is expressed and epigenetically regulated during *in vitro* conditions in *Agave spp.* BMC Plant Biology. 12:203
14. Delgado-Lemus, A., Casas, A., Téllez, O. 2014. Distribution, abundance and traditional management of *Agave potatorum* in the Tehuacán Valley, México: bases for sustainable use of non-timber forest products. Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine. 10:63:1-12
15. Dewir, Y.H., Indoliya, Y., Chakrabarty, D., Paek, K.Y. 2014. Biochemical and Physiological Aspects of Hyperhydricity in Liquid Culture System. En: Production of

- Biomass and Bioactive Compounds Using Bioreactor Technology. Paek, K.Y., Murthy, H.N., Zhong, J.J. (Eds.). Springer. 693-709
16. Diario Oficial de la Federación. 2001. Resolución por la que se modifica la declaración general de protección de la denominación de origen mezcal, publicada el 28 de noviembre de 1994. R.-154006. México, D.F.
  17. Diario Oficial de la Federación. 2003. Modificación a la declaración general de protección de la denominación de origen mezcal, publicada el 28 de noviembre de 1994. R.-174603. México, D.F.
  18. Diario Oficial de la Federación. 2012. Modificación a la Declaración General de Protección de la Denominación de Origen Mezcal. R.-356898. México, D.F.
  19. Diario Oficial de la Federación. 2015. Resolución por la que se modifica la Declaración General de Protección de la Denominación de Origen Mezcal. R.-419872. México, D.F.
  20. Diario Oficial de la Federación. 2015. Resolución por la que se modifica la Declaración General de Protección de la Denominación de Origen Mezcal. R.-424649. México, D.F.
  21. Diario Oficial de la Federación. 2018. Resolución por la que se modifica la Declaración General de Protección de la Denominación de Origen Mezcal, para incluir municipios del Estado de Aguascalientes que en la misma se indican. R.-471440. México, D.F.
  22. Diario Oficial de la Federación. 2018. Resolución por la que se modifica la Declaración General de Protección de la Denominación de Origen Mezcal, para incluir municipios del Estado de México que en la misma se indican. R.-471442. México, D.F.
  23. Diario Oficial de la Federación. 2018. Resolución por la que se modifica la Declaración General de Protección de la Denominación de Origen Mezcal, para incluir municipios del Estado de Morelos que en la misma se indican. R.-471443. México, D.F.
  24. Domínguez-Rosales, M.S., Alpuche-Solís, A.G., Vasco-Méndez, N.L., Pérez-Molphe-Balch, E. 2008. Efecto de citocininas en la propagación *in vitro* de agaves mexicanos. Revista Fitotecnia Mexicana. 31:4:317-322
  25. Eguiarte, L.E., Souza, V., Aguirre, X. (2007). Ecología Molecular. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. México, D.F. 592 pp.
  26. Eibl, R., Eibl, D. 2008. Design of bioreactors suitable for plant cell and tissue cultures. Phytochemistry Reviews. 7:593-598
  27. Escalante, A., López-Soto, D.R., Velázquez-Gutiérrez, J.E., Giles-Gómez, M., Bolívar, F., López-Munguía, A. 2016. Pulque, a traditional mexican alcoholic fermented beverage: historical, microbiological, and technical aspects. Frontiers in Microbiology. 7:1026.
  28. Escalona, M., Lorenzo, J.C., Gonzalez, B., Daquinta, M., Gonzalez, J.L., Desjardins, Y., Borroto, C.G. 1999. Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) micropropagation in temporary immersion systems. Plant Cell Reports. 18:743-748.
  29. Gaba, V.P. 2005. Plant Growth Regulators in Plant Tissue Culture and Development. En: Plant Development Biotechnology. Trigian, R.N., Gray, D.J. (Eds). CRC Press LLC. 87-99
  30. García-Mendoza, A.J. 2007. Los agaves de Méxco. Ciencias. 87:14-23

31. García-Mendoza, A.J. 2011. Agavaceae. En: Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Instituto de Biología. Universidad Autónoma de México. 88:1-95
32. Gentry, H.S. 1982. Agaves of Continental North America. The University of Arizona Press. Tucson, U.S.A. 661 pp.
33. Georgiev, M.I. 2014. Design of Bioreactors for Plant Cell and Organ Cultures. En: Production of Biomass and Bioactive Compounds Using Bioreactor Technology. Paek, K., Murthy, H.N., Zhong, J. (Eds.). Springer. 3-15
34. Gil-Vega, K., González-Chavira, M., Martínez-de-la-Vega, O., Simpson, J., Vandemark, G. 2001. Analysis of genetic diversity in *Agave tequilana* var. Azul using RAPD markers. Euphytica. 119:3:335-341
35. Granados-Sánchez, D. 1993. Los agaves de México. Universidad Autónoma de Chapingo. México. 252 p.p.
36. Gupta, P.K., Holmstrom, D. 2005. Double staining technology for distinguishing embryogenic cultures. En: Protocol for Somatic Embryogenesis in Woody Plants. Jain, S.M., Gupta, P.K. (Eds.). Springer. 573-575
37. Harding, K. 1999. Stability Assessments of Conserved Plant Germplasm. En: Plant Conservation Biotechnology. Benson, E. (Ed.). Taylor & Francis. 97-108
38. Harris, S.A. 1999. Molecular Approaches to Assessing Plant Diversity. En: Plant Conservation Biotechnology. Benson, E. (Ed.). Taylor & Francis. 11-24
39. Holmes, M.G. (2006). Non-damaging and positive effects of UV radiation on higher plants. En: Environmental UV Radiation: Impact on Ecosystems and Human Health and Predictive Models. Ghetti, F., Checcucci, G., Bornman, J. (Eds.). Springer. 159-177
40. Hurný, A., Benková, E. 2017. Methodological Advances in Auxin and Cytokinin Biology. En: Auxins and Cytokinins in Plant Biology. Paek, K.Y., Murthy, H.N., Zhong, J.J. (Eds.). Springer. 1-30
41. INEGI (2005) Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos. Santo Domingo Tehuantepec, Oaxaca. [http://www3.inegi.org.mx/contenidos/app/mexicocifras/datos\\_geograficos/20/20515.pdf](http://www3.inegi.org.mx/contenidos/app/mexicocifras/datos_geograficos/20/20515.pdf)
42. Irish, M., Irish, G. 2000. Agaves, Yuccas and related plants. Portland, Oregon, U.S.A. Timber Press. 312 pp.
43. Ivanova, M., Van Staden, J. (2010). Natural ventilation effectively reduces hyperhydricity in shoot cultures of *Aloe polyphylla* Schöland ex Pillans. Journal of Plant Growth Regulation. 60:2:143-150
44. Jasso-Padilla, I., Juárez-Flores, B., Alvarez-Fuentes, G., De la Cruz-Martínez, A., González-Ramírez, J., Moscosa-Santillán, M., González-Chávez, M., Oros-Ovalle, C., Prell, F., Czermak, P, Martínez-Gutiérrez, F. 2017. Effect of prebiotics of *Agave salmiana* fed to healthy Wistar rats. J of the Science of Food and Agriculture. 97:556-563
45. José-Jacinto, R., García-Moya, E. 2000. Remoción cuticular ("Mixiote") y Desarrollo Foliar en los Agaves Pulqueros (*Agave salmiana* y *A. mapisaga*). Boletín de la Sociedad Botánica de México, 66.
46. Kalia, R.K., Rai, M.K., Kalia, S., Singh, R., Dhawan, A.K. 2011. Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. Euphytica. 177:309-334

47. 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., Serna-Saldivar, S.O., Tovar, A.R. 2016. Agumiel concentrate from *Agave salmiana* and its extracted saponins attenuated obesity and hepatic steatosis and increased *Akkermansia muciniphila* in C57BL6 mice. *Scientific Reports*. 6:34242
48. Liao, Z., Chen, M., Sun, X., Tang, K. 2016. Micropropagation of Endangered Plant Species. En: *Plant Cell Culture Protocols. Methods in Molecular Biology*, vol. 318. 2nd Edition. Loyola-Vargas, V.M., Vázquez-Flota, F. (Eds.) Inc. New Jersey, U.S.A. Humana Press. 179-185
49. Loyola-Vargas, V.M., Ochoa-Alejo, N. 2012. An Introduction to Plant Cell Culture: The Future Ahead. En: *Plant Cell Culture Protocols*. Loyola-Vargas, V.M., Ochoa-Alejo, N. (Eds.). New York, U.S.A. Humana Press. 1-8
50. Lynch, P.T. 1999. Tissue Culture Techniques in *In Vitro* Plant Conservation. En: *Plant Conservation Biotechnology*. Benson, E. (Ed.). London, U.K. Talor & Francis. 41-62
51. Mamun, N.H.A., Egertsdotter, U., Aidun, C.K. 2015. Bioreactor technology for clonal propagation of plants and metabolite production. *Front. Biol.* 10:177
52. Martínez-Palacios, A., Ortega-Larrocea, M.P., Chávez, V.M., Bye, R. 2003. Somatic embryogenesis and organogénesis of *Agave victoriae-reginae*: Considerations for its conservation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 74:135-142
53. Márquez-Aguirre, A.L., Camacho-Ruíz, R.M., Gutiérrez-Mercado, Y.K., Padilla-Camberos, E., González-Ávila, M., Gálvez-Gastélum, F.J., Díaz-Martínez, N.E., Ortuño-Sahagún, D. 2016. Fructans from *Agave tequilana* with a lower degree of polimerization prevent weight gain, hyperglycemia and liver steatosis in high-fat diet-induced obese mice. *Plant Foods for Human Nutrition*. 71:416-421
54. Monja-Mio, K.M., Robert, M.L. 2016. Somatic Embryogenesis in *Agave*: An Overview. En: *Somatic Embryogenesis: Fundamental Aspects and Applications*. Loyola-Vargas, V., Ochoa-Alejo, N. (Eds). Springer. 283-296
55. Murashige, T., Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 15:473-497
56. Nava-Cruz, N.Y., Medina-Morales, M.A., Martínez, J.L. Rodríguez, R., Aguila, C.N. 2015. Agave biotechnology: an overview. *Critical Reviews in Biotechnology*. 35:546-559
57. Norma Oficial Mexicana NOM-070-SCFI-2016. 2016. Bebidas alcohólicas-Mezcal-Especificaciones. Diario Oficial de la Federación. México, D.F.
58. Núñez-Paleniús, H.G., Manjarrez-Rodríguez, E.J., Juárez-Gómez, A., Murillo-Yáñez, L.E., Ramírez-Malagón, R., Salazar-Solís, E., Herrera-Isidró, L. 2014. Micropropagation of *Agave victoriae-reginae* (T. Moore) in a temporary immersion system. En: *Sustainable and Integral Exploitation of Agave*. A. Gutiérrez-Mora (Ed.), B. Rodríguez-Garay, S. M. Contreras-Ramos, M. R. Kirchmayr, M. González-Ávila (Comps.). Recuperado de: <http://www.ciatej.net.mx/agave/1.7agave.pdf>
59. Paek, K. Y., Chakrabarty, D., Hahn, E.J. 2005. Application of bioreactor systems for large scale production of horticultural and medicinal plants. En: *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation*. Hvoslef-Eide, A. K., Preil, W. (Eds). Springer. 95-116



60. Pence, V.C. 1999. The Application of Biotechnology for the Conservation of Endangered Plants. En: Plant Conservation Biotechnology. Benson, E. (Ed.). London, U.K. Taylor & Francis. 227-250
61. Pérez-Molphe-Balch, E., Ramírez-Malagón, R., Núñez-Palenius, H.G., Ochoa-Alejo, N. 1999. Introducción al cultivo de tejidos vegetales. Aguascalientes, México. Universidad Autónoma de Aguascalientes.
62. Powers, D.E., Backhaus, R.A. 1989. In vitro propagation of *Agave arizonica* Gentry & Weber. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 16:57-60
63. Prail, W. 2005. General introduction: a personal reflection on the use of liquid media for *in vitro* culture. En: Liquid Culture Systems for *in vitro* Plant Propagation. Hvoslef-Eide, A. K., Preil, W. (Eds). Springer. 1-18
64. Puente-Garza, C.A., Gutiérrez-Mora, A., García-Lara, S. 2015. Micropropagation of *Agave salmiana*: Means to production of antioxidant and bioactive principles. Frontiers in Plant Science. 6:1026.
65. Ramírez-Tobías, H.M., Peña-Valdivia, C.B., Trejo, C., Aguirre R., J.R., Vaquera H., H. 2014. Seed germination of *Agave* species as influenced by substrate water potential. Biological Research. 47:11.
66. Ramírez-Malagón, R., Borodanenko, A., Pérez-Moreno, L., Salas-Araiza, M.D., Núñez-Palenius, H.G., Ochoa-Alejo, N. 2008. *In vitro* propagation of three *Agave* species used for liquor distillation and three for landscape. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 94:201.
67. Robert, M.L., Herrera, J.L., Contreras, F., Scorer, K.N. 1987. *In vitro* propagation of *Agave fourcroydes* Lem (Henequen). Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 8:37-48.
68. Robert, M.L., Herrera-Herrera, J., Castillo, E., Ojeda, G., Herrera Alamillo, M.A. 2006. An efficient method for the micropropagation of *Agave* species. Methods Mol Biol. 318:165-178.
69. Robert, M.L., Herrera-Herrera, J.L., Castillo, E., Ojeda, G., Herrera-Alamillo, M.A. 2016. An Efficient Method for the Micropropagation of *Agave* Species. En: Plant Cell Culture Protocols. Methods in Molecular Biology, vol. 318. 2nd Edition. Loyola-Vargas, V.M., Vázquez-Flota, F. (Eds.). New Jersey, U.S.A. Humana Press Inc.
70. Rocha, M., Valera, A., Eguiarte, L.E. 2005. Reproductive ecology of five sympatric *Agave Littaeae* (Agavaceae) species in Central Mexico. American Journal of Botany. 92:8:1330-1341
71. Salas T., J., Hernández S., L.Y. 2015. Mezcal cupreata, fuente de admiración. Ciencia. Julio-Septiembre: 40-47
72. Sánchez-Teyer, F., Moreno-Salazar, S., Esqueda, M., Barraza, A., Robert, M.L. (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
73. Santacruz-Ruvalcaba, F., Gutiérrez-Pulido, H., Rodríguez-Garay, B. 1999. Efficient *in vitro* propagation of *Agave parrasana* Berger. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 56:164-167.

74. Santos-Zea, L., Rosas-Pérez, A.M., Leal-Díaz, A.M., Gutiérrez-Urbe, J.A. 2016. Variability in saponin content, cancer antiproliferation activity and physicochemical properties in concentrated Agave sap. *Journal of Food Science*. 81:8:2069-2075
75. Sidana, J., Singh, B., Sharma, O.P. 2016. Saponins of Agave: Chemistry and bioactivity. *Phytochemistry* 130:22-46
76. Silos-Espino, H., Tovar-Robles, C.L., González-Cortés, N., Méndez-Gallegos, S.J., Rossel-Kipping, D. 2010. Estudio integral del maguey (*Agave salmiana*): propagación y valor nutricional. *Revista Salud Pública y Nutrición. Edición Especial*. 5:75-82
77. Spinoso-Castillo, J.L., Chavez-Santoscoy, R.A., Bogdanchikova, N., Pérez-Sato, J.A., Morales-Ramos, V., Bello-Bello, J.J. 2017. Antimicrobial and hormetic effects of silver nanoparticles on *in vitro* regeneration of vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. Ex Andrews) using a temporary immersion system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 129:2:195-207
78. Taiz, L., Zeiger, E. 2002. *Plant Physiology*. 3th Edition. Sinauer Associates. 623 p.p.
79. Takayama, S., Akita, M. 2005. Practical aspects of bioreactor application in mass propagation of plants. En: *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation*. Hvoslef-Eide, A. K., Preil, W. (Eds). Springer. 6-78
80. Thorpe, T. 2012. History of Plant Tissue Culture. En: *Methods in Molecular Biology*, vol. 877: *Plant Cell Culture Protocols*. 3th Edition. Loyola-Vargas, V.M., Ochoa-Alejo, N. (Eds.). New York, E.U.A. Humana Press. 9-27
81. Torres, I., Blancas, J., León, A., Casas, A. 2015. TEK, local perception of risk and diversity of management practices of *Agave ineqoidens* in Michoacán, México. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*. 11-61
82. Torres-Moran, M.I., Escoto-Delgadillo, M., Molina-Moret, S., Rivera-Rodríguez, D.M., Velasco-Ramírez, A.P., Infante, D., Portillo, L. (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
83. Valenzuela-Sánchez, K.K., Juárez-Hernández, R.E., Cruz-Hernández, A., Olalde-Portugal, V., Valverde, M.E., Paredes-López, O. 2006. Plant regeneration of *Agave tequilana* by indirect organogénesis. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*. 42:336-340
84. Zhang, L., Zheng, Y.L., Wei, Y.M., Liu, S.G., Zhou, Y.H. 2005. The Genetic Diversity and Similarities Among *Kengyilia* Species Base on Random Amplified Microsatellite Polymorphism (RAMP). *Genetic Resources and Crop Evolution*. 52:1011-1017.
85. Ziv, M. 2005. Simple bioreactors for mass propagation of plants. En: *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation*. Hvoslef-Eide, A. K., Preil, W. (Eds). Springer. 79-93