



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES**

**CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

**Desarrollo de herramientas biotecnológicas
para la propagación masiva y mejoramiento
de especies del género *Agave*.**

TESIS
Que para obtener el título de
Doctor en Ciencias Biológicas
Presenta

MANUEL SALVADOR DOMÍNGUEZ ROSALES

TUTOR: DR. EUGENIO PÉREZ MOLPHE BALCH

**COMITÉ TUTORAL: Dra. Nora Lilia Vasco
Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís**

Aguascalientes, Ags. Julio de 2009

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada, número de becario198066

A la Universidad Autónoma de Aguascalientes por el apoyo financiero brindado al proyecto (PIBT- 06- 3)

Al Dr. Eugenio Pérez Molphe Balch, por todo el apoyo incondicional para la realización y conclusión del trabajo de tesis

A mi Comité Tutorial: Dra. Nora Lilia Vasco Méndez (UAA), Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís (IPICYT), por la revisión y recomendaciones realizadas al trabajo de tesis

A los miembros de mi Comité Tutorial Ampliado: Dra. María Elena Siqueiros Delgado (UAA), Dr. Fidel Guevara Lara (UAA), por su valiosa contribución al trabajo de tesis

DEDICATORIAS

A mis amados padres Aurelia Rosales Rosas y Gabriel Domínguez Manríquez, por todo el apoyo para convertirme en lo ahora soy

A mi amada esposa Elia Adame Salgado, por el tiempo que me haz dedicado y el apoyo incondicional para realizarme como profesionista y ser humano

A mis amados hijos, Sheila Gabriela, Emmanuel y Andrea, quienes han sido mi inspiración para lograr mis metas propuestas

Mis queridos suegros, Isabel Salgado Romero y Plutarco Adame Vega, por su gran aprecio que han demostrado conmigo

A mi gran amigo Félix Torres Guzmán, por su decidido apoyo en todo el tiempo que hemos permanecido en Aguascalientes

A mi hermano Pedro Cortés Genchi, por amistad incondicional y apoyo que siempre me haz demostrado



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES



DR. FRANCISCO JAVIER ÁLVAREZ RODRÍGUEZ
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

Por este medio le informamos que el M. en C. Manuel Salvador Domínguez Rosales, alumno del Doctorado en Ciencias Biológicas, ha concluido satisfactoriamente su proyecto de tesis titulado "Desarrollo de herramientas biotecnológicas para la propagación masiva y mejoramiento de varias especies del género *Agave*". Del mismo se ha derivado el siguiente artículo en revista indizada:

Domínguez-Rosales, M.S., Alpuche-Solis, 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.

Por otro lado, el M. en C. Domínguez Rosales ha concluido también su escrito de tesis en el formato que fija nuestra Institución. Hemos revisado dicho escrito, y una vez hechas las correcciones sugeridas, estamos de acuerdo en que cumple ya con los requisitos de calidad para un documento de este tipo. Por todo lo anterior, y dado que el M. en C. Domínguez Rosales ha cubierto ya todos los requisitos necesarios, le solicitamos que se proceda con los trámites necesarios para su examen de grado.

Sin otro asunto a tratar, quedamos a su disposición para cualquier aclaración o información adicional que se requiera y nos despedimos enviándole un saludo.

ATENTAMENTE
"SE LUMEN PROFERRE"
Aguascalientes, Ags. a 18 de Junio de 2009

COMITÉ TUTORAL



Centro de Ciencias Básicas

M. en C. MANUEL SALVADOR DOMÍNGUEZ ROSALES
ALUMNO (A) DEL DOCTORADO EN
CIENCIAS BIOLÓGICAS
P R E S E N T E .

Estimado (a) Sr. Domínguez:

Por medio de este conducto me permito comunicar a Usted que habiendo recibido los votos aprobatorios de los revisores de su trabajo de tesis titulada **“Desarrollo de herramientas biotecnológicas para la propagación masiva y mejoramiento de especies del género *Agave*”**, de acuerdo con su contenido y para dar cumplimiento a los establecido en el Artículo 162 (Fracciones I, II y III) y Artículo 175 (Fracciones I y II) del Reglamento de docencia de la U.A.A., me permito comunicarle que puede imprimir dicho documento y continuar con los trámites para la presentación de su examen de grado.

Sin otro particular me permito saludarle muy afectuosamente.

ATENTAMENTE
Aguascalientes, Ags., 29 de junio de 2009
“SE LUMEN PROFERRE”
EL DECANO

DR. FRANCISCO JAVIER ALVAREZ RODRÍGUEZ



c. c. p.- Archivo
FJAR,mjda



TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

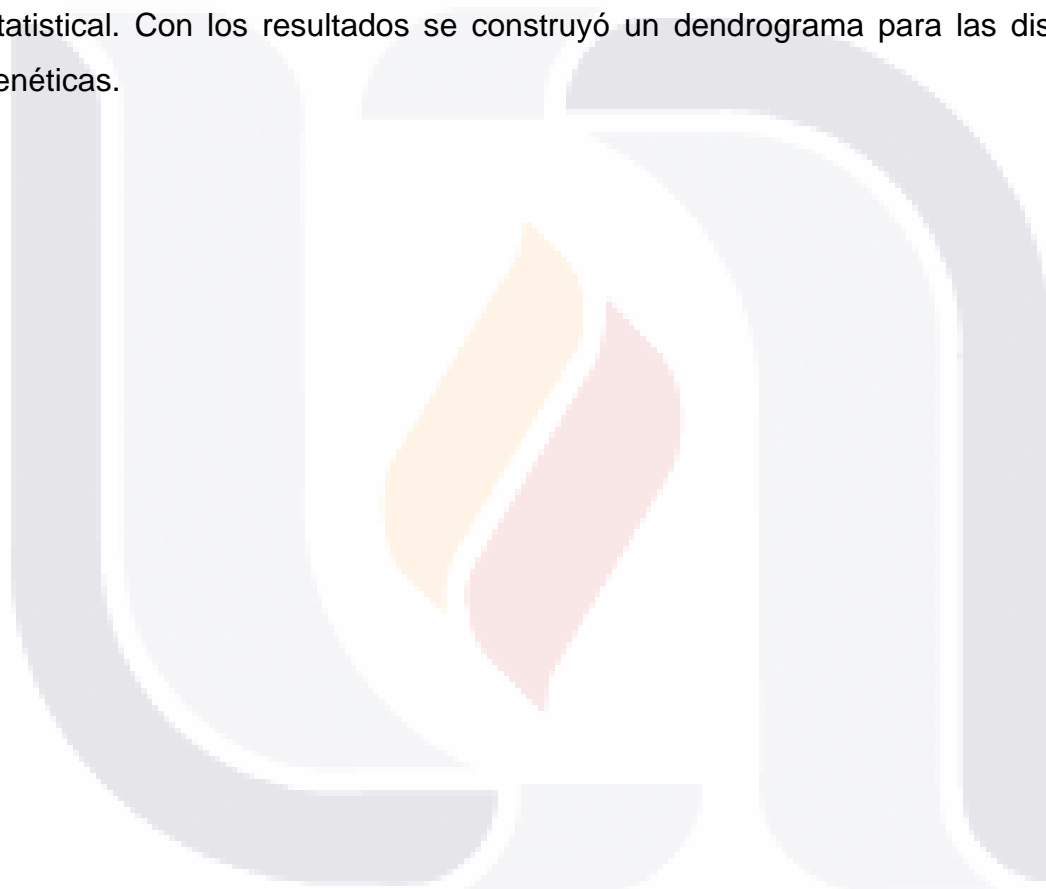
DESARROLLO DE HERRAMIENTAS BIOTECNOLÓGICAS PARA LA PROPAGACIÓN MASIVA Y MEJORAMIENTO DE ESPECIES DEL GÉNERO AGAVE

Manuel Salvador Domínguez Rosales

RESUMEN

La falta de sistemas eficientes de propagación es un factor que limita el aprovechamiento racional de varias especies de *Agave*, que en muchos casos han tenido una reducción peligrosa de sus poblaciones debido a la sobreexplotación de materiales silvestres. En este estudio se desarrollaron protocolos para la propagación *in vitro* de *A. cupreata*, *A. difformis*, *A. karwinskii*, *A. obscura* y *A. potatorum*. Como explantes se utilizaron tejidos meristemáticos extraídos de plántulas germinadas *in vitro*. Se logró la formación de brotes múltiples en explantes basales en medio MS adicionado con 30 g L⁻¹ de sacarosa, 8 g L⁻¹ de agar y varios tratamientos con citocininas [6-bencilaminopurina (BA), 6-γ,γ-dimetil amino purina (2iP), cinetina (Cin), tidiazurón (TDZ) y meta-topolina o N⁶-(meta-hidroxibencil)adenina (MT)]. Para *A. cupreata* el mejor tratamiento resultó ser 1.5 mg L⁻¹ de BA, con un promedio de 10.5 brotes por explante. Para *A. difformis*, el tratamiento que mejores resultados proporcionó fue 0.2 mg L⁻¹ de TDZ con un promedio de 8.5 brotes por explante. El mayor número de brotes por explante, para *A. karwinskii* se generó con la concentración de 1.0 mg L⁻¹ de BA, con un promedio de brotes por explante de 6.1. La especie *A. obscura*, produjo el mayor número de brotes por explante con el tratamiento cuya concentración fue de 0.2 mg L⁻¹ de TDZ, con un promedio de brotes por explante de 11.0. El tratamiento con la concentración 3.0 mg L⁻¹ de Cin, propició el mayor número de brotes por explante en la especie *A. potatorum* con un promedio de 6.9. Los resultados obtenidos demuestran que es posible la propagación masiva *in vitro* a través de la brotación partiendo de meristemos basales de las cinco especies de *Agave* propuestas. Las plántulas obtenidas se transfirieron a suelo y fueron trasladadas a

condiciones de invernadero, lográndose una sobrevivencia de 53.33 al 100 %. Se desarrolló tejido caloso de todas las especies, pero sólo de *A. cupreata* se generó organogénesis indirecta a partir de tejido caloso obtenido. Se aisló ADN de buena calidad en todas las especies y se aplicó la técnica RAPD. Se obtuvieron las amplificaciones por PCR para varios oligos, y se eligieron las bandas obtenidas con los oligos OPA-01, OPA-02, OPA-03, OPA-10 y OPA-13 para realizar el análisis genético. Para esto se utilizaron los programas Arlequín, S-plus y Statistical. Con los resultados se construyó un dendrograma para las distancias genéticas.



CONTENIDO

	página
RESUMEN	i
CONTENIDO	iii
LISTA DE CUADROS	v
LISTA DE FIGURAS	vi
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	5
2.1. Descripción del género <i>Agave</i>	5
Ciclo de vida y reproducción	6
Relaciones filogenéticas del género <i>Agave</i> .	7
Adaptación a ambientes áridos	9
Usos e importancia económica	10
Producción de mezcal y tequila	11
Factores que limitan la producción de <i>Agave</i> : Plagas y enfermedades	12
Situación actual y conservación de las especies del género <i>Agave</i>	15
2.2 Descripción de las especies seleccionadas para el trabajo	16
2.3. Papel de la Biotecnología en el manejo de los Agaves	20
2.3.1. Generalidades acerca del cultivo de tejidos vegetales	20
Medios de cultivo	22
Reguladores del crecimiento vegetal	23
Micropropagación	25
Variación somaclonal	28
Conservación <i>in vitro</i> de germoplasma	30
2.3.2. Generalidades acerca de los Marcadores moleculares	31
ADN Polimórfico Amplificado al Azar (RAPD)	32
2.3.3. Antecedentes referentes al cultivo <i>in vitro</i> del Género <i>Agave</i>	34
2.3.4. Antecedentes sobre el uso de marcadores moleculares para evaluar la variabilidad genética de agaves y otras plantas en el cultivo <i>in vitro</i>	46
3. JUSTIFICACIÓN	56
4. HIPÓTESIS	57
5. OBJETIVOS	58
5.1. Objetivo general	58
5.2. Objetivos particulares	58
6. METAS	59
7. METODOLOGÍA	61
8. RESULTADOS	65
8.1. Obtención de material vegetal y establecimiento <i>in vitro</i> de las especies seleccionadas	65
8.2. Desarrollo de sistemas para la propagación <i>in vitro</i> de las especies seleccionadas a través de la generación de brotes a partir de tejido meristemático	66
8.3. Desarrollo de sistemas para la regeneración <i>in vitro</i> de las especies seleccionadas a través de la organogénesis y/o	77

embriogénesis somática	
8.4. Análisis de la variabilidad genética de las especies trabajadas mediante el uso de marcadores moleculares	79
9. DISCUSIÓN	85
10. CONCLUSIONES	89
11. BIBLIOGRAFÍA	90
12. ANEXOS	97
12.1. Protocolo de extracción de ADN	97
12.2. Artículo científico	98
13. GLOSARIO	99



LISTA DE CUADROS

Cuadro	Título	Página
1	Cuadro 1. Listado de las especies del género <i>Agave</i> incluidas en la NOM-059-ECOL-2001.	16
2	Cuadro 2. Antecedentes sobre el cultivo y propagación <i>in vitro</i> de especies del género <i>Agave</i> .	42
3	Cuadro 3. Efecto del tipo de citocininas probadas en la generación de brotes a través de la activación de meristemos basales en <i>Agave cupreata</i> .	69
4	Cuadro 4. Efecto del tipo de citocininas probadas en la generación de brotes a través de la activación de meristemos basales en <i>Agave difformis</i> .	70
5	Cuadro 5. Efecto del tipo de citocininas probadas en la generación de brotes a través de la activación de meristemos basales en <i>Agave karwinskii</i> .	71
6	Cuadro 6. Efecto del tipo de citocininas probadas en la generación de brotes a través de la activación de meristemos basales en <i>Agave obscura</i> .	72
7	Cuadro 7. Efecto del tipo de citocininas probadas en la generación de brotes a través de la activación de meristemos basales en <i>Agave potatorum</i> .	73
8	Cuadro 8. Enraizamiento en medio MS basal de los brotes obtenidos de cinco especies de <i>Agave</i> , y supervivencia de plántulas en suelo.	77
9	Cuadro 9. Resultados de las absorbencias del ADN, de las especies estudiadas.	81

LISTA DE FIGURAS

Figura	Título	Página
1	<p>Figura 1. a). <i>Agave cupreata</i> (www. rarepalmseeds.com/images/AgaCup.jpg); b). <i>A. difformis</i> (www.rarepalmseeds.com/images/AgaDif.jpg); c). <i>A. karwinskii</i> (www.agavepages.co.uk/pictures/pict10/); d). <i>A. obscura</i> (www.cactus-succulents.com/agave-obscura.jpg); e). <i>A. potatorum</i> (www.agavepages.co.uk/pictures/pict10)</p>	19
2	<p>Figura 2. a) Cápsulas, b) semillas, c) germinación y d) contaminación de plántulas de <i>A. cupreata</i>.</p>	67
3	<p>Figura 3. Generación de brotes sobre explantes basales cultivados en medio con citocininas (Izquierda), brotes separados del explante original antes de su transferencia a medio de enraizamiento (Centro) y brotes ya enraizados <i>in vitro</i> y listos para su transferencia a suelo (Derecha). a) <i>Agave cupreata</i>, b) <i>A. difformis</i>, c) <i>A. karwinskii</i>, d) <i>A. obscura</i>, y e) <i>A. potatorum</i>.</p>	75
4	<p>Figura 4. Arriba a la izquierda, brotes de <i>A. cupreata</i> generados con 0.2 mgL⁻¹ de TDZ; arriba a la derecha, brotes de <i>A. karwinskii</i> generados con 0.4 mgL⁻¹ de TDZ; abajo a la izquierda, brotes de <i>A. obscura</i> generados con 2.0 mgL⁻¹ de MT; abajo a la derecha, brotes de <i>A. potatorum</i> generados con 1.5 mgL⁻¹ de MT.</p>	75
5	<p>Figura 5. Plantas generadas <i>in vitro</i> creciendo ya en invernadero cuatro meses después de su transferencia a suelo. a) <i>Agave cupreata</i>, b) <i>A. difformis</i>, c) <i>A. karwinskii</i>, d) <i>A. obscura</i>, y e) <i>A. potatorum</i>.</p>	78
6	<p>Figura 6. Plantas generadas <i>in vitro</i> creciendo ya en invernadero ocho meses después de su transferencia a suelo. a) <i>Agave cupreata</i>, b) <i>A. difformis</i>, c) <i>A. karwinskii</i>, d) <i>A. obscura</i>, y e) <i>A. potatorum</i>.</p>	79
7	<p>Figura 7. <i>A. cupreata</i>; organogénesis indirecta en medio MS adicionado con 1 mgL⁻¹ de BA más 1 mgL⁻¹ de 2,4-D.</p>	80
8	<p>Figura 8. Gel de agarosa para determinar la integridad del ADN de las especies consideradas en el proyecto. Carril 1: <i>Agave cupreata</i>[*], carril 2: <i>A. difformis</i>[*], carril 3: <i>A. karwinskii</i>[*], carril 4: <i>A. obscura</i>[*], carril 5: <i>A. potatorum</i>[*], carril 6: <i>A. cupreata</i>^{**}, carril 7: <i>A. difformis</i>^{**}, carril 8: <i>A. karwinskii</i>^{**}, carril 9: <i>A. obscura</i>^{**}, carril 10: <i>A. potatorum</i>^{**}, carril 11: <i>A. difformis</i>[*], carril 12: <i>A. cupreata</i>[*]</p>	83
9	<p>Figura 9. Gel de agarosa para visualizar las amplificaciones por PCR de los RAPDs en el ADN de las especies consideradas en el proyecto. Carril 1 Marcador de peso</p>	

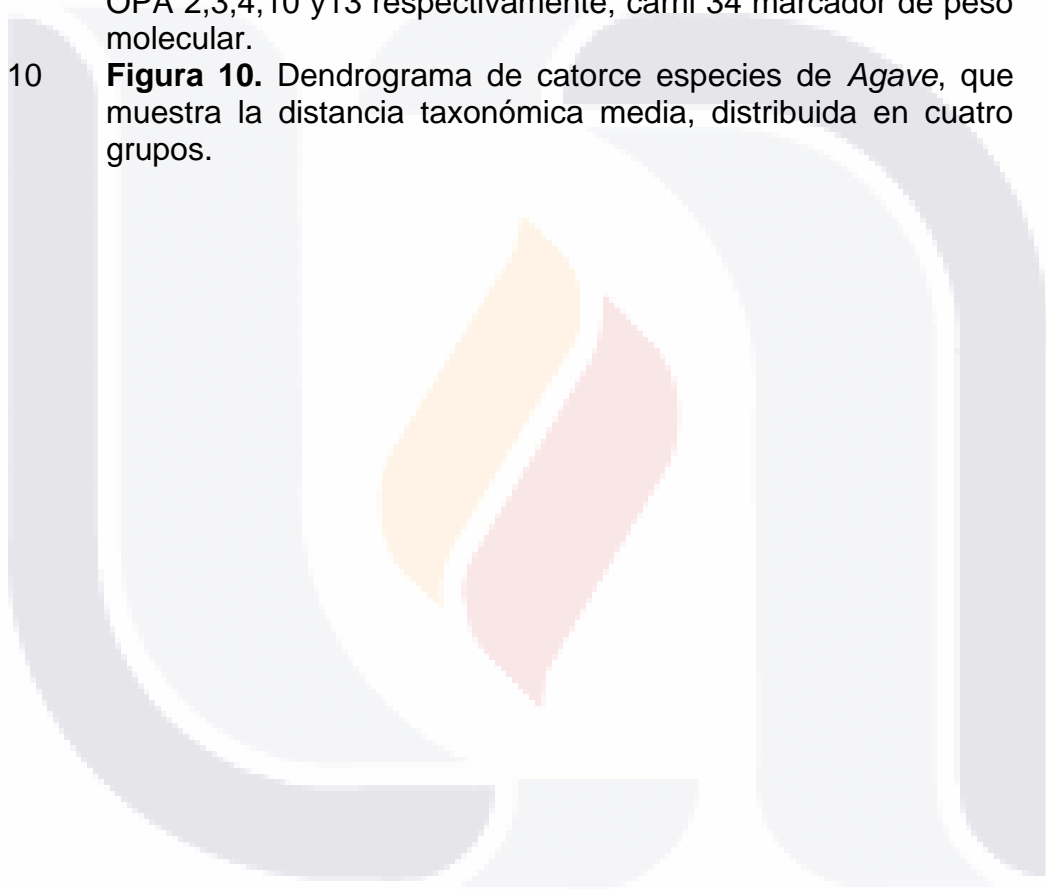
molecular(8 bandas de 50 a 2000 pb); del carril 2-6 *Agave cupreata* con los oligos OPA 2,3,4,10 y13 respectivamente; del carril 7-11, *A. difformis* con los oligos OPA 2,3,4,10 y13 respectivamente; del carril 12-16 *A. karwinskii* con los oligos OPA 2,3,4,10 y13 respectivamente; carril 17 marcador de peso molecular Carril 18 marcador de peso molecular; del carril 19-23 *A. obscura* con los oligos OPA 2,3,4,10 y13 respectivamente; del carril 24-28 *A. potatorum* con los oligos OPA 2,3,4,10 y13 respectivamente; del carril 29-33 *Turbinicarpus schmiedickeanus* var. *schwarzii* con los oligos OPA 2,3,4,10 y13 respectivamente; carril 34 marcador de peso molecular.

84

10

Figura 10. Dendrograma de catorce especies de *Agave*, que muestra la distancia taxonómica media, distribuida en cuatro grupos.

85



1. INTRODUCCIÓN

El género *Agave* se ubica en la familia Agavaceae, incluye varias especies de plantas adaptadas a condiciones de aridez. Tienen una forma característica de roseta y poseen raíces muy ramificadas, cutícula gruesa, hojas suculentas con estomas hundidos y metabolismo fotosintético tipo CAM. Este último le permite abrir sus estomas sólo durante la noche disminuyendo así la pérdida de agua. Se reportan 197 de especies de *Agave*, incluidas dentro de los dos subgéneros reconocidos (*Littaea* y *Agave*). Del total de especies, 136 las podemos encontrar en México. Por lo anterior, nuestro país es considerado como centro de origen del género. Numerosas especies del género *Agave* han sido utilizadas como alimento por los pobladores de Mesoamérica desde hace por lo menos 9000 años. Son muchos los hallazgos arqueológicos que confirman el papel fundamental que estas plantas jugaron en el desarrollo de los pueblos autóctonos de la parte central de México. Con la llegada de los conquistadores españoles, el cultivo de los agaves fue llevado a otras regiones de Norteamérica, e incluso a otros continentes. Un ejemplo de esto es la especie *Agave americana*, llevada por los europeos a las islas Azores, Canarias y gran parte de la cuenca del Mediterráneo, en donde se convirtió en una especie ornamental muy importante. En este aspecto destacan también las especies productoras de fibra como *A. cantala* y *A. sisalana*, que fueron la base de industrias coloniales de gran importancia en Indonesia, Filipinas y África del Este.

La estrecha relación establecida entre los mexicanos y el *Agave* permanece aun hoy en nuestros días. Estas plantas satisfacen varias de las necesidades de los pobladores de las zonas áridas y semiáridas del país, e incluso llegan a ser el soporte de importantes actividades económicas generadoras de riqueza como lo son la industria tequilera, la mezcalera y la de las fibras naturales. Actualmente, los tallos (piñas), quiotes (inflorescencias inmaduras), bases de las hojas y flores son aun parte de la dieta en muchas regiones del país, mientras que las hojas se usan como forraje para el ganado. El aguamiel, obtenido de la piña y de la base

del quito de varias especies de Agave, ha sido un complemento muy importante en la dieta de los pobladores de las zonas áridas. El aguamiel también es la base de una industria, ya que puede fermentarse para obtener pulque, o bien concentrarse para obtener miel de maguey. También puede ser procesado para obtener fructosa.

Como puede verse, los agaves son plantas de gran importancia para nuestro país. A pesar de lo anterior, se han hecho relativamente pocos esfuerzos por estudiarlos, mejorarlos y conservarlos. La mayoría de los trabajos en este sentido se han realizado con aquellas especies ya consideradas como cultivadas, como las usadas para la producción de tequila, mezcal, aguamiel, pulque, fibras, etc. Otras especies, que no son cultivadas, y que tienen hábitats más restringidos, han sido descuidadas al grado de que muchas de ellas se encuentran en riesgo de extinción. La NOM-059-ECOL-2001 reconoce la existencia de 18 especies dentro del género cuya supervivencia se ve severamente amenazada en estos momentos. Esta situación se debe principalmente a la sobreexplotación de poblaciones silvestres, el saqueo ilegal de plantas jóvenes para ser usadas como ornamentales, y la destrucción de su hábitat.

Por otro lado, el crecimiento muy lento de estas plantas, así como sus bajas tasas de reproducción asexual y reproducción sexual limitada por problemas de polinización y viabilidad de las semillas, son factores que hacen a los agaves difíciles de multiplicar masivamente por métodos convencionales. Estos mismos factores limitan las posibilidades de mejoramiento de las especies cultivadas. Una alternativa prometedora para la resolución de estos problemas es la aplicación en estas especies de las técnicas de propagación y mejoramiento derivadas de la Biotecnología Vegetal. En estos momentos, la técnica más usada en este campo es la llamada micropropagación o propagación *in vitro*, la cual consiste en la propagación asexual de plantas utilizando las técnicas de cultivo de tejidos vegetales.

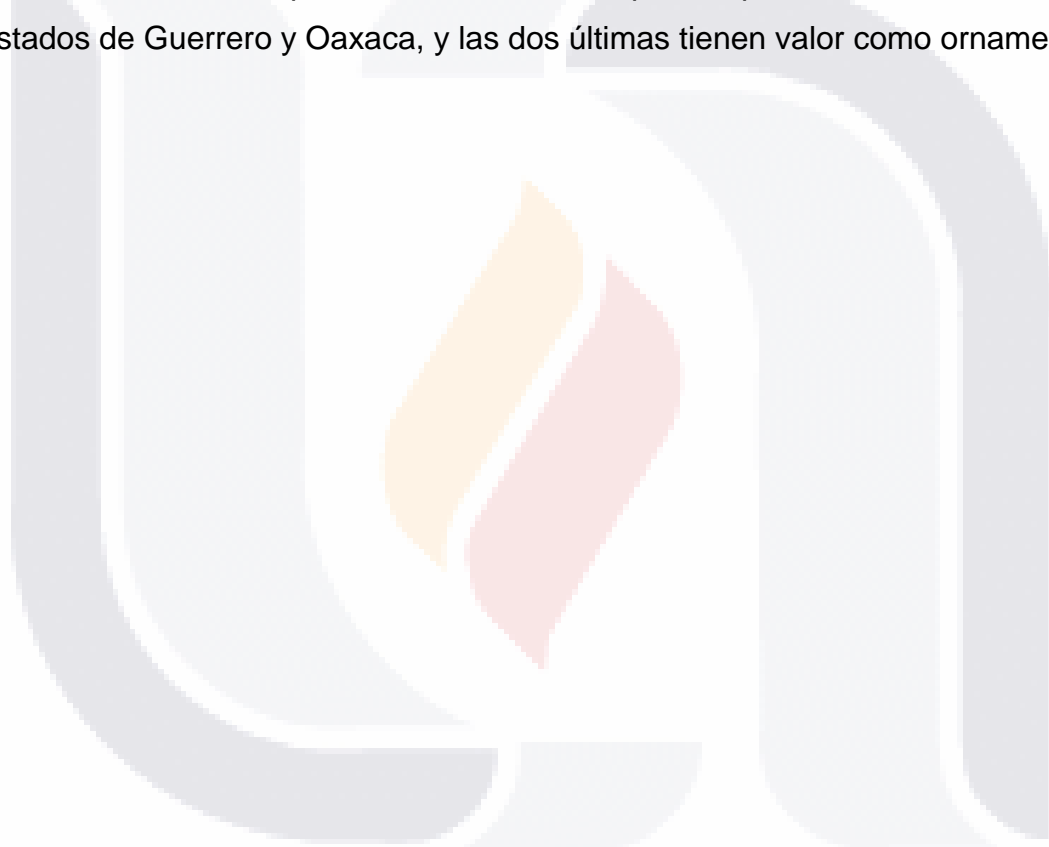
Las ventajas que ofrece la micropropagación con respecto a los métodos convencionales de propagación son las siguientes:

- Se trata de un sistema de propagación clonal, es decir que mantiene todas las características genotípicas del material inicial seleccionado.
- Debido a que se realiza todo el proceso en un laboratorio, bajo ambientes controlados, se trata de un sistema totalmente independiente de las condiciones externas, por lo que no se ve afectado por las estaciones del año, sequías, heladas, altas temperaturas u otros factores ambientales.
- El número de plantas que se puede obtener mediante micropropagación es por su naturaleza prácticamente ilimitado.
- El espacio que se requiere es mínimo, y el tiempo en que puede realizarse el proceso es relativamente corto.
- Las plantas que se obtienen están libres de bacterias, hongos y nemátodos fitopatógenos, y con técnicas más específicas se pueden liberar incluso de virus y viroides. En el caso particular de los agaves, la propagación asexual por hijuelos tiene la desventaja de que estos llevan de inicio los patógenos que pudieran estar afectando a la planta madre.

Además de la micropropagación, la Biotecnología aporta otras técnicas que pueden resultar importantes para el estudio, mejoramiento y conservación de los Agaves. Entre estas, destacan los marcadores moleculares o de ADN, que son diferencias entre las secuencias homólogas de ADN de dos organismos. Éstas pueden ser el resultado de translocaciones, inversiones, inserciones, deleciones o mutaciones puntuales. Los marcadores moleculares pueden ser visualizados a través del uso de diversas técnicas como RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) y Microsatélites. Esta tecnología tiene aplicaciones importantes, por ejemplo la generación de huellas genéticas en variedades cultivadas, la selección de caracteres deseables ligados a

ciertos marcadores en programas de mejoramiento, los análisis filogenéticos y el estudio de la variabilidad genética presente en poblaciones.

A pesar de todo lo anterior, son pocos los antecedentes que se tienen acerca de la aplicación de la Biotecnología al género *Agave*, por lo que este trabajo se centró en el desarrollo de herramientas biotecnológicas para la propagación masiva y mejoramiento de las especies *A. cupreata*, *A. karwinskii*, *A. potatorum*, *A. difformis* y *A. obscura*; las tres primeras son utilizadas para la producción de mezcal en los Estados de Guerrero y Oaxaca, y las dos últimas tienen valor como ornamentales.



2. ANTECEDENTES

2.1. Descripción del género *Agave*

El género *Agave* L. pertenece a la familia Agavaceae, al orden Asparagales. Se encuentra dividido en dos subgéneros, *Littaea* y *Agave*, con 197 especies agrupadas de acuerdo a sus semejanzas morfológicas. Este sistema, sin embargo, es aun discutible y no refleja fielmente las relaciones naturales entre especies (Gentry, 1982).

El centro de origen y diversidad del género *Agave* se limita a México. Sin embargo, desde el siglo XVII, los agaves se han llevado prácticamente a todas las áreas subtropicales del mundo, principalmente con propósitos ornamentales. A excepción de algunas formas arborescentes tales como *Agave karwinski* Zucc., los vástagos de estas plantas son cortos y gruesos. El tamaño y la forma de los rosetones van de pequeño, compacto, y globoso (*A. parryi* Engelm.) a las plantas gigantes (*A. mapisaga* Tres.) que pueden alcanzar una altura de 2-2.5 m. Las hojas tienen forma de espada con una espina aguda en la extremidad, aunque algunas plantas tienen hojas largas, estrechas y flexibles; son generalmente gruesas y suculentas con un parénquima esponjoso para almacenar agua y tienen una cubierta cerosa que evita la pérdida de agua y les da un aspecto blanquecino; inflorescencias en espiga o panoja con escapo largo semileñoso; las flores son de color amarillo verdoso, protándricas con perianto infundibuliforme de tubo de longitud variable y seis segmentos casi iguales; seis estambres filamentosos filiformes, más largos que los segmentos del perigonio, con anteras amarillentas; ovario ínfero trilocular, tricarpelar, con placentación axilar, multiovulada; fruto capsular leñoso alargado, dehiscente con tres alas con numerosas semillas aplanadas algo triangulares de testa negra (Gentry, 1982).

Ciclo de vida y reproducción:

Los agaves viven por periodos que van de 8 a 25 años de acuerdo a la especie. Hasta que alcanzan la madurez sexual generan de manera constante hojas nuevas y al paso del tiempo se deshacen de las hojas viejas. Algunos agaves del grupo de los Polycephalae (*A. celsii* Hook) son policárpicos perennes que florecen en varias ocasiones a partir de los ejes excéntricos a las hojas. Sin embargo, la mayoría son monocárpicos multianuales, que florecen solamente una vez hacia el final de su vida. Las flores de algunos agaves tal como *A. palmeri* son de 30-50 mm de largo, tubulares y marcadamente protándricas (en el transcurso de una semana una panícula hace la transición desde una condición primordialmente masculina a un estado pistilado femenino). El estigma es tripartido y viscoso. Los botones florales abren en la noche, las anteras son exsertas y los estambres desplegados exponen el polen maduro. La dehiscencia ocurre alrededor de las ocho de la noche. Fuera de este tiempo las suturas de las anteras permanecen cerradas y el polen no es viable. Durante la noche los animales del desierto remueven el polen en las anteras; por la mañana el polen virtualmente no está presente. La producción de néctar es principalmente nocturna, las panículas florales abren secuencialmente durante cuarenta días aproximadamente. En las poblaciones del desierto sonoreño, la floración se presenta desde junio hasta septiembre. Después de la floración, la planta rápidamente envejece y muere. Después de la polinización el ovario se desarrolla en una cápsula seca persistente, que contiene cientos de semillas de forma triangular de unos 5-8mm de largo. En *A. deserti*, cada fruto maduro contiene aproximadamente 216 semillas, cada rama lateral produce 18 frutos maduros (una planta con 17 ramas laterales produce en promedio alrededor de seis mil semillas); sin embargo y a pesar de la gran cantidad de semillas, muy pocas logran generar una planta adulta. Del total de semillas producidas por una planta, aproximadamente el 84% son consumidas por roedores y hormigas; y otro porcentaje sufre mortalidad por desecación. Las semillas que logran germinar, producen plántulas que tienen poca probabilidad de sobrevivir, sobre todo en áreas de escasa lluvia. Algunos autores

calculan que de medio millón de semillas, únicamente una tiene la posibilidad de sobrevivir, llegar a la edad adulta y reproducirse (Robert *et al.*, 1992; Granados-Sánchez, 1993).

Relaciones filogenéticas del género Agave.

Según Rocha *et al.* (2006), los miembros de la familia Agavaceae han sido objeto de varios estudios filogenéticos, tanto morfológicos como moleculares (con las secuencias del gen *rbcL* de cloroplasto, análisis enzimático de restricción del genoma de cloroplasto). Las relaciones filogenéticas entre los grupos principales es congruente con los diferentes estudios. En cambio ha sido bastante difícil establecer la filogenia dentro de los géneros incluido el género *Agave sensu lato*, (que incluye a los géneros *Agave sensu. stricto*, *Manfreda*, *Polianthes*, y *Prochnyanthes*), debido a que existe escasa variación genética en el nivel de secuencias de los marcadores en la secuencia del genoma del cloroplasto. Esto se debe al origen relativamente reciente del grupo. Dado el origen reciente de muchas especies en *Agave sensu lato*, la relación filogenética entre dichas especies puede considerarse un problema sin solución, debido al tiempo relativamente corto para la diferenciación de las especies. La familia Agavaceae, donde *Yucca* es el grupo hermano del resto de los miembros de la familia. *Agave sensu lato*, está representado por los subgéneros *Agave*, *Littaea*, *Manfreda*, *Polianthes*, y *Prochnyanthes*, los cuales son los miembros más derivados de la familia. *Agave sensu stricto* es el género mas abundante de la familia con 166 especies, la mayor parte de las especies se encuentran en México. Las especies restantes 15 de ellas se encuentran en el sudoeste de E.E.U.U., principalmente en el estado de Arizona, 12 especies se localizan en las antillas y el resto en América Central y en el norte de Sudamérica (es decir Colombia, Perú y Venezuela). La mayor diversidad se presenta en México, en el Valle de Tehuacan-Cuicatlan, Barranca de Mezquitlán, Sierra Madre Occidental y regiones del desierto de Chihuahua.

Good-Avila, *et al.* (2006), examinan la posibilidad de radiación en el género *Agave sensu lato*. De los nueve géneros de Agavaceae, dos de ellos sobresalen por ser más diversos que el resto. El género *Yucca* posee 49 especies descritas, mientras que *Agave stricto.*, contiene 166 especies y *Agave sensu lato*. 208 especies; así tanto las yucas como los agaves incluyen 257 de las 293 especies de la familia. La hipótesis del reloj molecular se rechaza firmemente para los datos del *rbcL* pero únicamente se rechaza para los niveles de confianza de 0.05% para los datos de *trnL+trnL-trnF*. Existe evidencia de que los miembros de la familia Anthericaceae son un grupo hermano de Agavaceae y que *Camassia*, *Hosta*, y *Chlorogalum* son parte de Agavaceae *sensu lato*. Los métodos de evolución mínima y de máxima parsimonia coinciden en que el “bootstrap” es bajo, pero son consecuentes con la separación de *Agave sensu lato*, *Furcraea*, y *Beschorneria* y proporciona un soporte robusto para distinción de *Yucca* (ambos análisis) y *Hesperaloe* (análisis de máxima parsimonia). Ambos análisis sugieren que *Hosta* y *Camassia* son parafiléticos dentro de Agavaceae según lo encontrado para la filogenia del grupo Angiosperma. Los análisis filogenéticos coinciden con los obtenidos en otros estudios moleculares, lo que confirma la posición filogenético de Agavaceae dentro del grupo de Asparagales, la parafilia con *Camassia*, *Hosta*, y *Chlorogalum* y como un grupo hermano a Anthericaceae, aunque se plantean preguntas sobre los límites filogenéticos de la familia. La edad estimada para la familia está entre los 20 y 26 millones de años y la edad de *Yucca* entre los 13 y 18 millones de años; ambas fechas son considerablemente más recientes a la edad de la coevolución de *Yucca-Yucca-polilla* (en 41.5 millones de años) referida en otros trabajos. A pesar de estas discrepancias, los análisis realizados sugieren de manera robusta un origen de 8-10 millones de años para *Agave sensu lato*. Se obtuvieron fechas similares para todos los nodos utilizando dos métodos independientes de análisis, uno que asume un reloj molecular y otro que no lo hace y con dos genes diferentes que involucran diferente contribución (aunque se ligan). Usando una fecha conservadora de 10 millones de años para el origen de *Agave sensu lato* se obtienen los índices de especiación de 0.32 ± 0.08 especies por millón de años, calculado desde el origen de los agaves hasta el presente.

Estos valores están dentro del rango observado para otros géneros relativamente recientes de plantas que han sido identificados por experimentar índices de rápida especiación. Por ejemplo la tasa de diversificación del linaje desde el inicio de la radiación hasta el presente en los géneros de Poaceae en el sur de África, con tasas de 0.12-0.39 especies por millones de años, aunque el rango de las tasas se extiende desde 0.87-4.18 durante el periodo de radiación rápida. En Sudamérica se identificaron tasas de 0.85 en la radiación de *Gentianella*.

Adaptación a ambientes áridos:

Aunque el grado de adaptabilidad varía considerablemente, la mayoría de los agaves están muy bien adaptados a ambientes áridos (Burgess, 1985). La forma y la distribución de las hojas de la planta ayuda a la captura de la poca precipitación disponible lo más eficientemente posible (Gentry, 1982). Sin embargo, las principales adaptaciones para hacer frente a la desecación y a las altas temperaturas, han sido estudiadas por Nobel en *Agave deserti*, quien estableció cuales son los mecanismos que previenen la pérdida de agua; la capa epicuticular gruesa cerosa y el metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM), una vía de la fijación del CO₂ en el cual la apertura del estoma y la entrada del CO₂ ocurren en la noche, así se previene la pérdida de agua con la evapotranspiración que normalmente ocurre si el estoma está abierto durante el día (Nobel, 1976; Nobel y Hartsock, 1978). En la mayoría de las plantas suculentas con metabolismo CAM como en agaves, la morfología y la fisiología de los organismos fotosintéticos desempeñan un papel relevante en la productividad; por ejemplo, la radiación de actividad fotosintética no puede pasar de un lado a otro de la hoja, por lo que la orientación de cada superficie influye en la cantidad que puede ser absorbida por el clorénquima fundamental; por otro lado, para las típicas hojas delgadas de plantas C₃ y C₄, la radiación puede alcanzar tanto el haz como el envés, aunado a que estas hojas entran en movimiento por el viento o en forma intrínseca, contrario a las hojas de las suculentas que son estables y de una posición vertical desde sus inicios. Se han realizados diversos estudios sobre la orientación de las hojas y

la intercepción de la radiación en plantas de agaves. Las características especiales de la roseta de la planta son: rigidez, opacidad, simetría radial aproximada, almacenamiento de agua y posesión de metabolismo CAM. Donde el CO₂ es absorbido durante la noche por la planta a través de los estomas y fijado por la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa en un compuesto de cuatro carbonos y se almacena en las vacuolas de las células del clorénquima, las plantas CAM deben de tener grandes vacuolas para almacenar todo el ácido acumulado. Los cambios diurnos en los tejidos acidificados medidos en el campo indican la cantidad total de CO₂ fijado, puesto que la producción de dos moles titulables de ácido, usualmente, acompañan la toma de cada mol de CO₂ (Granados-Sánchez, 1993).

Usos e importancia económica:

Los agaves tienen una amplia gama de aplicaciones, incluyendo como plantas de ornato y la prevención de la erosión del suelo, pero su importancia económica principal proviene de ser una fuente de materia prima para la obtención de fibra (sisal) y las bebidas alcohólicas suaves (como pulque) o fuertes (tales como tequila y mezcal). Debido a su alto contenido de azúcar, los tejidos suaves del agave se han masticado en Mesoamérica por cientos de años. El meristemo blanco suave, almidonado de la tapa del vástago y el escape joven de la inflorescencia son los más apetecibles. Sin embargo, este uso se ha mantenido como costumbre local y no se ha explotado comercialmente como en el caso de las extremidades blandas de muchas palmas, que se consideran una delicadeza en muchas partes del mundo. En el noroeste de México las hojas jóvenes de los agaves se utilizan como forraje para el ganado vacuno. Junto con las plantas de nopal, el maguey constituye un importante recurso alimenticio para los animales de los lugares desérticos. En los alrededores de la ciudad de San Luís Potosí, las plantas jóvenes de *Agave salmiana* son destinadas para forraje del ganado. En Baja California, las hojas de *A. shawii* y *A. avellanidens* tienen valor comercial, ya que se venden y pueden ser cambiadas por ganado vacuno. El maguey como

forraje para ganado vacuno se ha desarrollado recientemente, reflejando la presión de la población humana sobre la disponibilidad de la planta como un recurso. Desde el punto de vista industrial, los agaves más importantes son *A. fourcroydes* Lem (henequén) y su pariente cercano *A. sisalana* Perrine (sisal), y en un grado inferior *A. lechuguilla* Torr. (Ixtle) cuyas hojas se cosechan para la extracción de fibra dura, y el *A. tequilana* Weber, que se utiliza para la producción de tequila (Gentry, 1982; Granados-Sánchez, 1993). En una etapa, el henequén cultivado en México era la fuente más importante en el mundo de fibra natural. En 1921 llegó a representar el 88% de la producción de fibra dura del mundo y era la base de la abundancia de Yucatán. Pero de ser uno de los estados más ricos en México al comienzo del siglo, las fortunas de Yucatán han declinado constantemente junto con su producción descendente de henequén. En 1988 el sisal de África y de Sudamérica representó el 71% de la producción total del mundo, mientras que México produjo solamente 12.5%. Aunque las fibras sintéticas han acaparado una porción importante del mercado mundial, todavía hay una demanda constante para las fibras duras naturales, para los sacos que son utilizados para almacenar las cosechas, los bolsos, las alfombras y las cuerdas (Robert *et al.*, 1992).

Producción de mezcal y tequila:

En el siglo VI, cuando los conquistadores entraron al actual territorio mexicano, encontraron que los indígenas tomaban una bebida embriagante a la que llamaban “octili polihqui”, hoy conocida como pulque. El pulque era utilizado con fines medicinales y religiosos. Sin embargo no existían problemas de embriaguez, ya que había un estricto código que sancionaba a aquel que abusara del alcohol. Con la conquista, estas normas tan estrictas se relajaron y se incrementó el consumo del pulque en la población indígena. Los españoles acostumbrados al vino, no aceptaron esta bebida de los indígenas, y sin éxito, trataron de destilarla. Posteriormente se descubrieron otras especies de maguey y algunas de estas se logró un procedimiento para la fermentación y destilación, de lo que se obtuvo un

fuerte licor, al que llamaron mezcal. Esta bebida rápidamente se difundió por el país y tuvo una gran aceptación entre los indígenas. Entre el siglo XVIII y el XIX, el mezcal producido en un pequeño pueblo, al noroeste de la ciudad de Guadalajara, empezó a adquirir gran fama por su extraordinaria calidad. En esta pequeña comunidad, llamada Tequila, las condiciones climatológicas y de la tierra eran ideales para el cultivo de cierta variedad de maguey: el agave azul (*A. tequilana* Weber). Poco a poco, la calidad de este mezcal hecho con agave azul (al que empezó a llamarse tequila) fue más reconocida y los avances del país y la tecnología fueron determinando que la tequila se hiciera más popular, no solo en México, sino en todo el mundo. Un agave tarda aproximadamente ocho años en llegar a su estado óptimo de maduración. Entonces se les cortan las hojas por los jimadores, quienes después separan el centro de la planta, al que llaman piña. Las piñas son transportadas a las destilerías e introducidas en hornos donde son cocidas para convertir el almidón en azúcares no poliméricos. Después se extrae el jugo de éstas, el cual es vaciado en grandes recipientes para lograr la fermentación, es decir convertir el azúcar en alcohol. Una vez que transcurren 40 horas, el líquido fermentado se destila en dos ocasiones, en la primera se obtiene el llamado “ordinario”, en la segunda, “la tequila”. Después de ser filtrado y reducido el porcentaje de alcohol, esta tequila puede ser embotellada para su venta, aunque también puede añejarse por espacio hasta de cuatro años para lograr su máxima calidad (Granados-Sánchez, 1993).

Factores que limitan la producción de Agave: Plagas y enfermedades.

El gusano blanco (*Acentrocne me hesperiaris* Wilk), es una plaga que ataca las regiones magueyeras de Hidalgo, Tlaxcala, Edo. de México, Puebla y Querétaro; esta plaga es una mariposa que oviposita en grupos de 14 huevos en los meses de diciembre a enero, es la larva cuando eclosiona, la que ocasiona el daño a la planta de maguey, mide de aproximadamente 7cm de largo 1.5 cm de diámetro, es de una consistencia blanda y grasienta de color blanco sucio salpicado de pequeños puntos pardos, aunque este organismo se considera una plaga, es

utilizado como alimento y se cotiza muy caro en el mercado. El gusano rojo o “Chinicuil” (*Hipoptha agavis* Blazquez.), al igual que el gusano blanco, es una plaga muy común en las zonas magueyeras del altiplano, también son comestibles, la plaga es una mariposa que oviposita de 70 a 80 huevos en grupos de 5 ó 12 en la parte inferior de las pencas de plantas jóvenes, en los meses de febrero a mayo. Después de de la eclosión del huevo la larva se introduce al interior del tallo, forma galerías en las que viven aproximadamente 5 meses. El ataque de esta plaga ocasiona que el tallo se petrifique y las pencas se tornan de un color rojizo. La larva completa su desarrollo en los meses de julio y agosto. El picudo o barrenador del maguey (*Scyphophorus acupuntatus* Gyll.), esta plaga es un coleóptero que ocasiona severos daños a las plantaciones de henequén de la península de Yucatán en donde se le conoce como “Max”, la especie que ataca las plantaciones de maguey tequilero se le conoce como “torito de maguey” (*Scyphophorus interestiales*), se encuentra ampliamente distribuido en la mesa central; se le encuentra en Ixmiquilpan, Pachuquilla, Huichapan, Acelotla, Hidalgo, Tlaxcala, Huamantla, Atzayanca, Calpulalpan, Atlacomulco, Chalco, Jiquipilco, Otumba, Edo. de México y Acumulco, en Querétaro; los principales daños son ocasionados por las larvas que barrenan y se alimentan de la piña y raíz del maguey, el adulto también se encuentra haciendo perforaciones profundas en la base de la penca, pero así mismo se le encuentra junto con las larvas en el tallo y la raíz. La enfermedad negrilla o fumaginas ocasionada por el hongo (*Asterina mexicana* Ell y Eu.) de la clase Ascomycetes, orden Mycophyrales, familia Mycotheriaceae. Esta enfermedad es importante en la mayoría de las regiones magueyeras del país, debido a que se presenta durante todo el año; sin embargo son raras las ocasiones en que este hongo mata las plantas a no ser que esté asociado con otros organismos. Los primeros síntomas son unas pequeñas manchitas de color amarillento que aparecen sobre las pencas; posteriormente se forman las manchas negras, presentándose primero un tono gris claro y por último cambia a una coloración completamente negra. Cuando el daño es severo, las pencas se encuentran completamente invadidas por el hongo y solo se observa una coloración negra. Realizando un corte en las pencas dañadas se encuentra en

el tejido interno una coloración café que constituye el micelio del hongo, como resultado final del daño, las plantas presentan pencas raquílicas y mal formadas que pueden llegar a secarse. La antracnosis del maguey es una enfermedad ocasionada por el hongo (*Colletotrichum agaves* Cav.), pertenece a la clase Deuteromycetes, al orden Melanconiales, a la familia Melanconiaceae. La antracnosis del maguey llega a constituir un problema grave en este cultivo; en la mayoría de los casos destruye parcial o totalmente a las plantas, sobre todo cuando son pequeñas. Tiene una distribución general en el país; además de atacar el maguey pulquero, puede causar daños al maguey tequilero, mezcalero y al henequén. La sintomatología inicia en las pencas, comienzan a tornarse de un color café oscuro y normalmente la invasión del hongo inicia en la punta de la penca hasta llegar a la base, solo en contadas ocasiones llega a cubrir totalmente el tejido adyacente al ataque; le penca toma una coloración rojiza. Cuando los daños son muy intensos, las plantas pueden podrirse completamente. La pudrición bacteriana de la cabeza del maguey la ocasiona una bacteria (*Erwinia sp.*), los daños de esta enfermedad se manifiestan en el cogollo y las pencas. Esta enfermedad se considera la de mayor importancia económica en las regiones magueyeras del país. También se le conoce como: secadera, bacteriosis y pudrición blanda del meyolote y las pencas. Los síntomas de la enfermedad son fácilmente apreciables, ya que la planta presenta una pudrición suave en la base de las pencas que integra el meyolote, las bacterias avanzan rápidamente sobre la parte afectada hasta matar la planta. Estas no son las únicas enfermedades que afectan al cultivo del maguey, solo que el resto de enfermedades ocasionadas por hongos y bacterias, son de menor importancia económica, hasta ahora (Granados-Sánchez, 1993).

Recientemente se han reportado tres diferentes especies de bacterias que afectan el cultivo de *Agave tequilana* Weber: *Erwinia cacticida*, *Pantoea agglomerans* y *Pseudomonas sp.* Asociadas a la pudrición blanda de las raíz, *E. cacticida* se considera el organismo bacteriano más patogénico que ataca al cultivo de *A.*

tequilana con base a la sintomatología que presentan las plantas muestreadas con este patógeno (Jiménez-Hidalgo, *et al.*, 2004).

Situación actual y conservación de las especies del género Agave

El potencial de uso que tienen las plantas del género *Agave* ha llevado a la sobreexplotación de muchas de ellas. Por otro lado, muchas especies silvestres han sufrido la disminución constante de sus poblaciones naturales debido a la destrucción de su hábitat, o al saqueo ilegal de las mismas para ser usadas como ornamentales o bien para aprovecharlas de otras maneras. Esto ha hecho que muchas especies del género se encuentren actualmente amenazadas en mayor o menor medida. La Norma Oficial Mexicana 059-Ecol emitida en 2001 incluye 18 especies de *Agave* catalogadas como amenazadas, en peligro de extinción o sujetas a protección especial (Cuadro 1).

Cuadro 1. Listado de las especies del género *Agave* incluidas en la NOM-059-ECOL-2001.

Género	Especie	Nombre común	NOM-059-ECOL-2001	
<i>Agave</i>	<i>bracteosa</i>	maguey huasteco	A	no endémica
<i>Agave</i>	<i>congesta</i>	maguey tzotzil	Pr	no endémica
<i>Agave</i>	<i>chiapensis</i>	maguey chamula	Pr	Endémica
<i>Agave</i>	<i>dasyliroides</i>	maguey intrépido	A	Endémica
<i>Agave</i>	<i>guiengola</i>	maguey plateado	A	Endémica
<i>Agave</i>	<i>gypsophila</i>	maguey gipsófilo	Pr	no endémica
<i>Agave</i>	<i>impresa</i>	maguey masparillo	A	Endémica
<i>Agave</i>	<i>kewensis</i>	maguey del Grijalva	Pr	Endémica
<i>Agave</i>	<i>lurida</i>	maguey de la luna	P	Endémica
<i>Agave</i>	<i>nizandensis</i>	maguey de Nizanda	P	Endémica
<i>Agave</i>	<i>ornithobroma</i>	maguey pajarito	Pr	no endémica
<i>Agave</i>	<i>parrasana</i>	maguey de Parras	Pr	Endémica
<i>Agave</i>	<i>parviflora</i>	maguey sóbari	A	no endémica
<i>Agave</i>	<i>peacockii</i>	maguey fibroso	Pr	Endémica
<i>Agave</i>	<i>polianthiflora</i>	maguey de colibrí	A	no endémica
<i>Agave</i>	<i>titanota</i>	maguey del sol	Pr	Endémica
<i>Agave</i>	<i>victoria-reginae</i>		P	Endémica
<i>Agave</i>	<i>vizcainoensis</i>	maguey de El Vizcaíno	Pr	Endémica

A = Amenazadas

P = Peligro de extinción

Pr = Protección especial

2.2. Descripción de las especies seleccionadas para el trabajo

Agave cupreata Trel.& Berger

Subgénero *Agave*

Grupo *Crenatae*

Recibe los nombres indígenas de *papalometl* (náhuatl: maguey mariposa) y *yaabendisi* (mixteco). Son agaves de tamaño medio, con hojas anchas y dentadas de color verde brillante y rosetas de 1 m de ancho y 80 cm de alto (Figura 1a). Sus

panículas alcanzan los 4-7 m de altura. Se trata de una especie endémica de la cuenca del Balsas, se le encuentra en zonas de pendientes montañosas de los estados de Michoacán y Guerrero, en altitudes que van de los 1220 a los 1850 msnm. Su reproducción es básicamente por semillas, ya que es una especie que no produce hijuelos. Esto implica que su supervivencia depende del éxito en la polinización y diseminación, germinación y establecimiento de la semilla, factores que están siendo afectados por la degradación ecológica de su hábitat. Es una de las especies más utilizadas para la elaboración de mezcal en su área de distribución (Gentry, 1982; CONABIO, 2006)

Agave difformis Berger

Subgénero *Littaea*

Grupo Marginatae

Se trata de un agave robusto con hojas largas y muy polimórficas (Figura 1b). Se le encuentra en las regiones más áridas de la vertiente occidental de la Sierra Madre Oriental, esto en los estados de San Luis Potosí e Hidalgo. En este último estado se utilizan las fibras maceradas de esta especie como sustituto del jabón, dándosele el nombre local de *xixi* (Gentry, 1982).

Agave karwinskii Zucc.

Subgénero *Agave*

Grupo Rigidae

Recibe los nombres indígenas de *al-mal-bi-cuish* (chontal), *bicuixe* (zapoteco) y *cachutum* (popoloca). Son plantas arborescentes con tallos de 2-3 m de altura (Figura 1c). Hojas relativamente pequeñas para el tamaño de la planta. Es una de las especies de *Agave* con hábitos más claramente xerófitos, ya que sólo se le encuentra en las partes más áridas y de suelos calizos de Puebla y Oaxaca, entre los 1550 y 1850 msnm. Se puede reproducir por semilla, hijuelos o bulbillos. Es una especie utilizada para la elaboración de mezcal, pero por su tronco también se le usa como leña o para el establecimiento de cercas vivas. También se extrae fibra de sus hojas (Gentry, 1982; CONABIO, 2006).

Agave obscura Schiede

Subgénero *Littaea*

Grupo Marginatae

Son agaves de tamaño pequeño (Figura 1d) que habitan en el norte de Puebla, Veracruz y Este de San Luis Potosí. Su hábitat incluye algunos campos de lava en el llamado Malpaís de la Jolla. Tiene un gran interés como especie ornamental (Gentry, 1982).

Agave potatorum Zucc.

Subgénero *Agave*

Grupo Hiemiflorae

Recibe los nombres indígenas de *tobalá* (zapoteco) y *yauiticushi* (mixteco). Son agaves pequeños (1 m de ancho y 70 cm de alto), muy polimórficos, con alto valor ornamental (Figura 1e). Habitan en las zonas semiáridas de Puebla y Oaxaca entre los 1240 y 2300 msnm. No producen hijuelos ni bulbillos, por lo que dependen de la reproducción por semillas. Se le utiliza para la elaboración del mezcal conocido como tobalá, pero para esto se recurre a poblaciones silvestres ya que la especie no se cultiva (Gentry, 1982; CONABIO, 2006).

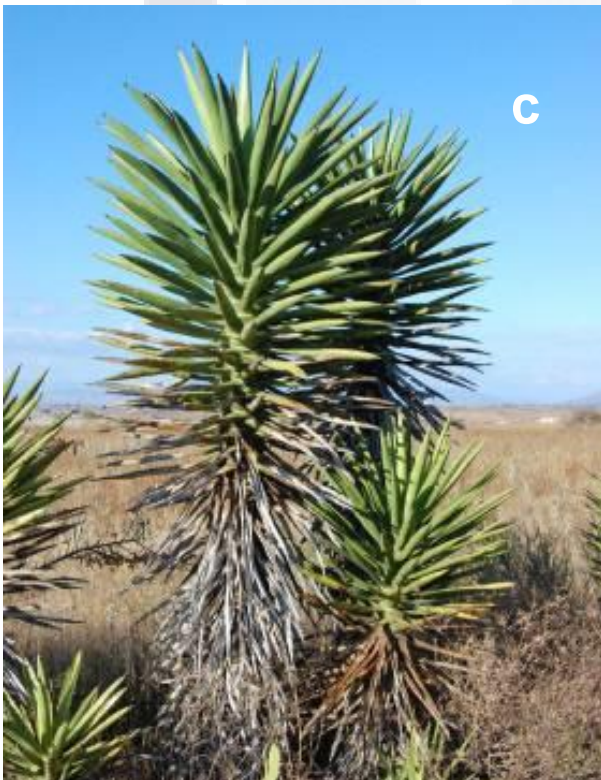


Figura 1. **a).** *Agave cupreata* (www.rarepalmseeds.com/images/AgaCup.jpg); **b).** *A. difformis* (www.rarepalmseeds.com/images/AgaDif.jpg); **c).** *A. karwinskii* (www.agavepages.co.uk/pictures/pict10/); **d).** *A. obscura* (www.cactus-succulents.com/agave-obscura.jpg); **e).** *A. potatorum* (www.agavepages.co.uk/pictures/pict10)

2.3. Papel de la Biotecnología en el manejo de los Agaves

Debido a su lento crecimiento, y a las particularidades de su ciclo vital, los agaves son especies difíciles de manejar y su mejoramiento por métodos convencionales resulta muy complicado. En este sentido, la Biotecnología puede aportar herramientas que faciliten su manejo y conservación, o bien que optimicen su aprovechamiento o el procesamiento de los productos derivados de éstas especies. Las técnicas de cultivo *in vitro* pueden permitir la propagación masiva de estas especies, también pueden aportar sistemas de regeneración que puedan ser acoplados a protocolos de transformación genética con el fin de introducir características de interés. Por otro lado, los marcadores moleculares pueden convertirse en una alternativa interesante para la caracterización genética y mejoramiento de estas especies.

2.3.1. Generalidades acerca del cultivo de tejidos vegetales:

En la horticultura, agricultura y en la industria forestal, la propagación vegetativa es utilizada idealmente para la multiplicación de plantas élite obtenidas de programas de mejoramiento o seleccionadas de poblaciones naturales. Los métodos de propagación tradicionales por esquejes o hijuelos son menos eficientes que el cultivo *in vitro*. El cultivo de tejidos vegetales es un conjunto de técnicas que permiten el establecimiento, mantenimiento y desarrollo de cualquier parte de una planta, desde una célula hasta un organismo completo, bajo condiciones artificiales, axénicas y controladas. Para poder realizar de la manera más adecuada posible el cultivo de tejido vegetal se deben tener en cuenta cuatro principios básicos: elección del explante, elección del medio, condiciones del cultivo y las condiciones asépticas del cultivo. Se han implementado una gran cantidad de métodos de desinfección para un gran extenso rango de especies de vegetales, sin embargo existen especies que presentan dificultad para ser desinfectadas, especialmente cuando los tejidos con meristemas únicamente pueden ser obtenidos de las partes del vegetal que están en contacto con el suelo.

Algunos métodos novedosos para la separación física de las células de la planta y los microorganismos son bastante prometedores, pero solo aquellos que hagan posible la obtención de material axénico de estas especies permanecerán como una herramienta de trabajo para el cultivo de tejido vegetal (Leifert *et al.*, 1995).

Después de elegir el tipo de explante, dependiendo de las condiciones del medio en donde se desarrolla, se pueden generar las siguientes respuestas: organogénesis, embriogénesis somática, tejido calloso (del cual se puede obtener organogénesis indirecta o embriogénesis somática), necrosis o desarrollo. La embriogénesis somática es una técnica ideal para la micropropagación a gran escala de material vegetal sano. Cuando se utiliza de manera combinada medios líquidos y sólidos se obtienen tasas altas de embriogénesis somática. Esta técnica se ha utilizado en la obtención de plántulas de cítricos y neem (*Azadirachta indica*) (Cabasson *et al.*, 1997; Su *et al.*, 1997).

El cultivo de tejido vegetal es una manera de producir una gran cantidad de material clonal en tiempo relativamente corto, los costos se puede hacer relativamente bajos por lo valioso del material a multiplicar o porque los métodos convencionales de propagación son poco eficientes. La embriogénesis somática ha sido considerada como el sistema *in vitro* de selección con el potencial para la eventual propagación masiva de especies de árboles que son importantes en la industria maderable, como las coníferas y las de madera dura (Kim *et al.*, 1997; Park *et al.*, 1998).

La embriogénesis somática se ha conseguido con éxito en un menor número de especies que la organogénesis, debido a que es un fenómeno en apariencia más complicado. Sin embargo, cuando ésta es posible, su productividad en cuanto al número de plantas que se pueden generar es mayor. Dado el origen presuntamente unicelular de los embriones somáticos, ésta es una vía de regeneración aplicable a la transformación genética. Por otro lado, la embriogénesis somática sirve como base para la producción de semillas

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

artificiales que no son más que embriones somáticos encapsulados en una matriz que contiene nutrimentos que hace las veces de tejido de reserva, en algunos casos inhibidores como el ácido abscísico que detiene la germinación prematura. Otra ventaja de los embriones somáticos con respecto a los brotes adventicios, es que son estructuras polares, en las cuales siempre son visibles un ápice y una radícula, mientras que en la organogénesis las estructuras formadas son unipolares, conteniendo sólo un ápice (brote adventicio) o raíz. Los embriones somáticos no tienen una conexión vascular con el explante original, por lo que son estructuras relativamente independientes al mismo. Por su parte, los brotes adventicios conservan usualmente su conexión con el sistema vascular del explante inicial (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1999).

Medios de cultivo:

Los factores que determinan el crecimiento de órganos, tejidos, y células *in vitro* obtenidos a partir de plantas completas, son similares a los que limitan el crecimiento de las plantas *in vivo*. Estos factores han sido estudiados ampliamente en los últimos 40 años incluyendo los reguladores del crecimiento vegetal, luz, temperatura, el pH del medio, humedad, intercambio gaseoso, y la presencia de microorganismos parásitos, saprófitos o simbioses. El desarrollo de medios de cultivo que permiten el crecimiento y diferenciación de órganos extirpados de plantas, tejidos, o células aisladas de plantas y protoplastos *in vitro*, fue un proceso lento. Al inicio solo estaban incluidos en su composición los macronutrimentos (N, S, P, K, Mg, Ca) necesarios para el crecimiento de las plantas en medios hidropónicos. La lista completa de micronutrimentos (Fe, Mn, Zn, B, Cu, Mo) era adicionada con los macronutrimentos por la dificultad en la purificación y se compiló en los años 30's del siglo XX. Posteriormente, con investigaciones adicionales, a los medios de cultivo de tejidos vegetales se les adicionaron carbohidratos (normalmente sacarosa o glucosa), vitaminas (inositol, tiamina, ácido nicotínico, nicotinamida, piridoxina, Ca-pantotenato, ácido pantoténico, ácido ascórbico, biotina, ácido fólico, clorhidrocolina, ácido *p*-

aminobenzoico, riboflavina, vitamina B₁₂, y/o vitamina D) y aminoácidos (glicina, alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, ácido glutámico, leucina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, tiroxina, y/o triptofano). Aunque estos últimos compuestos no son esenciales para el crecimiento *in vitro* de células y tejidos, se observó que cuando se agregan al medio la tasa de crecimiento se incrementa (Leifert *et al.*, 1995).

Se ha reportado la influencia de algunos macronutrientes especialmente NH₄ NO₃ y KNO₃ en el desarrollo de raíces en cultivo de manzana *in vitro*. A altas concentraciones de NH₄⁺ se reduce el enraizamiento de *Chrysanthemum* spp. Lo que sugiere que el nitrógeno exógeno posee mayor influencia en la formación de raíces que algunos de los otros macronutrientes adicionados en el medio, sin embargo también bajas concentraciones de nitrógeno en el medio generan enraizamiento en rosales. Esto sugiere que la influencia del nitrógeno en el enraizamiento en el medio es tan importante tanto como la del potasio. La relación entre los niveles de macronutrientes tanto de origen exógeno como endógeno y el efecto sobre el enraizamiento, requiere de más trabajo de investigación para precisar la influencia de cada uno de ellos (Sriskandarajah *et al.*, 1990).

Reguladores del crecimiento vegetal:

Los reguladores del crecimiento vegetal o fitohormonas, son compuestos orgánicos que se sintetizan en alguna parte de una planta y que se mueven a otra parte, en donde en concentraciones muy bajas causan una respuesta fisiológica. Algunos compuestos sintéticos (tales como la benciladenina, el N-fenil-N'-1,2,3-tidiazolil-5-urea [Tidiazurón] entre otros), tienen actividad similar a los reguladores del crecimiento naturales ya que son reconocidos por los receptores celulares. La respuesta en el órgano blanco debido a la hormona vegetal puede variar y no siempre es promotora, ya que procesos como crecimiento o diferenciación en ocasiones el efecto es inhibitorio. En la actualidad se reconocen cinco grupos de hormonas vegetales, aunque se conocen algunas sustancias candidatas que

actúan como hormonas (ácido jasmónico, ácido salicílico, poliaminas oligosacarinas, esteroides, brasinosteroides, sisteminas y turgorinas). Los cinco grupos reconocidos actualmente incluyen las auxinas, las giberelinas, las citocininas, el ácido abscísico y el etileno (Salisbury y Ross, 1994).

Actualmente, el cultivo de tejidos vegetales depende en gran medida de la inclusión de hormonas vegetales y reguladores del crecimiento vegetal en el medio de cultivo, con el propósito de obtener la respuesta deseada de los tejidos. Los efectos de los reguladores del crecimiento vegetales naturales y sintéticos, son pocas veces específicos en su influencia última sobre el crecimiento y desarrollo, y la respuesta de células, tejidos, y órganos *in vitro* pueden variar con las condiciones, el tipo de explante, y el genotipo. Normalmente, se requiere la combinación de dos o más reguladores del crecimiento diferentes, aplicados simultáneamente o secuencialmente. Las auxinas ejercen una fuerte influencia sobre procesos tales como crecimiento y expansión celular, acidificación de las paredes celulares, iniciación de la división celular, así como la organización de meristemas, incremento en la formación de tejido indiferenciado (callo) u órganos definidos (generalmente raíces) y promueve la diferenciación vascular. En tejidos organizados, las auxinas juegan un papel determinante en el mantenimiento de la dominancia apical, afectan la abscisión, promueven la formación de raíces, y las curvaturas por tropismos, retardan la senescencia de las hojas y la maduración de frutos. La auxina natural más comúnmente encontrada es el ácido indol-3-acético (IAA), pero dependiendo de la especie, la edad de la planta, estación, las condiciones bajo las que se encuentran creciendo, otras auxinas naturales han sido identificadas tales como ácido 4-cloroindol-3-acético, ácido indol-3-acrílico, ácido indol-3-butírico (IBA). Dentro del tejido vegetal, el IAA y otras auxinas naturales se encuentran combinadas con moléculas pequeñas (alcoholes, aminoácidos, azúcares) se forma un éster, amido, o glicosídico conjugado. Las auxinas sintéticas comúnmente utilizadas en el cultivo de tejido son el ácido 2,4-dicloro fenoacético (2,4-D); a menudo utilizado para la inducción de callo y cultivos en suspensión), y el ácido 1-naftalenacético (NAA; cuando se requiere

organogénesis) y el picloram (ácido 4-amino-3,5,6-tricloro piridina-2-carboxílico; utilizado comercialmente como un herbicida selectivo) este último es efectivo en la inducción de formación de tejido embriogénico o en el mantenimiento de cultivos en suspensión. Dos propiedades de las citocininas que son utilizadas en el cultivo de tejido vegetal son, la estimulación de la división celular (comúnmente acompañado con auxinas) y la liberación de la latencia de los brotes o yemas laterales. Las citocininas pueden inducir la formación de brotes adventicios (en esquejes y cultivo de tejidos). La división celular es regulada por la acción conjunta de auxinas y citocininas. Las citocininas más utilizadas en el cultivo de tejido son la zeatina, 2-iP, dihidro-zeatina, y robósido de zeatina. Las giberelinas promueven la floración (particularmente en especies con requerimientos de días largos y/o frío), la iniciación de los conos en algunas coníferas, germinación de semillas, y elongación del tallo (por incremento de la división celular y alargamiento). El ácido abscísico (ABA), juega un papel importante en el cierre y apertura de los estomas (reduciendo la transpiración), en el control de la toma de agua y de iones por la raíz (en parte por el incremento en la conductividad hidráulica) y, con otras fitohormonas, promueve la abscisión y senescencia de las hojas. El ABA es importante en la maduración de de las semillas, induciendo la síntesis de las proteínas de almacenaje en el desarrollo de las semillas. En cultivo de tejido, la aplicación exógena de ABA tiene efecto (generalmente positivamente a bajas concentraciones, aunque a altas concentraciones inhibe) en el crecimiento de callo y organogénesis (brotes, raíz, embriones). El etileno, conjuntamente con otras fitohormonas, promueve la maduración de frutos, senescencia y abscisión de hojas. Algunas de las respuestas de las plantas a auxinas podrían ser ocasionadas por el incremento de la síntesis de etileno en respuesta a tratamiento con auxinas (Gaspar *et al.*, 1996)

Micropropagación:

La micropropagación es un procedimiento mediante el cual se realiza la propagación asexual de los vegetales, utilizando para ello las técnicas de cultivo

de tejido vegetal *in vitro*. Es un sistema de propagación clonal que permite mantener todas las características genotípicas del material inicial seleccionado. No depende de las condiciones ambientales, ya que todo el proceso se realiza en el laboratorio, bajo condiciones controladas. El número de plantas que pueden obtenerse, es teóricamente ilimitado, depende de la capacidad del laboratorio que realiza el proceso. El espacio que se requiere es mínimo y el tiempo en que se realiza el proceso es relativamente corto. El material que se obtiene mediante este procedimiento, está libre de bacterias, hongos y nemátodos fitopatógenos, y con técnicas más específicas se puede liberar incluso de virus y viroides. La micropropagación, permite la multiplicación de plantas en peligro de extinción, plantas que poseen semillas con bajo porcentaje de germinación, propagar especies que produce pocos ejemplares por los métodos convencionales de propagación, obtener un gran número de plántulas a partir de material con características sobresalientes. La selección de las plantas para realizar la micropropagación es una etapa fundamental, ya que este sistema se basa en una propagación clonal, por lo que las plantas generadas poseerán las características genéticas de la planta madre. Otra etapa crítica en este proceso lo representa el establecimiento del cultivo axénico, la elección del explante en esta etapa es fundamental, para la propagación por yemas o meristemos, los explantes iniciales generalmente se toman de individuos adultos. Para la organogénesis, el tipo de explante es variable, pueden ser segmentos de hoja, tallo o tejidos juveniles tomados de plántulas. Para el caso de la embriogénesis somática, los explantes suelen ser, tejidos muy jóvenes o embriones sexuales inmaduros. Otra etapa, consiste, en la multiplicación del tejido, obteniéndose un gran número de nuevos brotes a partir de cantidades mínimas de tejido. La siguiente etapa consiste, en el crecimiento y enraizamiento de los brotes obtenidos. Una última etapa, consiste en la adaptación de las plántulas al medio externo (Teng *et al.*, 1997, Tiwari *et al.*, 2002).

El término organogénesis aplicado al cultivo *in vitro* de tejidos vegetales se refiere a la formación de *novo* de órganos en los explantes cultivados. Entre los órganos que se pueden formar están las raíces o los llamados brotes adventicios, los cuales son estructuras muy similares a una yema y tienen la capacidad de originar una nueva planta después de elongarse y formar raíces. El fenómeno de la organogénesis *in vitro* se basa en la llamada totipotencialidad celular, es decir, cada célula posee toda la información genética necesaria para constituir una planta completa o desempeñar las funciones de cualquier órgano o tejido vegetal. Sin embargo, en condiciones normales este potencial no se expresa, y se requiere condiciones especiales como las que pueden derivarse del cultivo *in vitro* para que una célula exprese su potencial y pueda originar un órgano o una planta completa. La organogénesis puede ser directa, cuando tiene lugar en el explante original, o bien indirecta cuando primeramente se origina tejido calloso y luego se originan los órganos a partir de éste. Aun cuando la organogénesis *in vitro* es un proceso muy utilizado en la actualidad, incluso con fines comerciales para la propagación de plantas, es muy poco lo que se sabe acerca de los fenómenos fisiológicos, bioquímicos y genéticos que la hacen posible (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1999).

La embriogénesis somática ha sido considerada como un sistema *in vitro* para la propagación masiva de árboles con características genóticas sobresalientes, tanto para coníferas como para especies leñosas. Para la embriogénesis somática se utilizan las semillas de los árboles de los que se desean multiplicar, las semillas se germinan en condiciones adecuadas de asepsia, luz, humedad y reguladores de crecimiento vegetal, los embriones somáticos se originan del hipocotilo y de la raíz primaria, después de que se induce la formación de tejido calloso. Una vez realizada la inducción de la formación de los embriones, éstos se colocan sucesivamente en medios para su desarrollo y formación de la plántula enraizada y posteriormente pasarla a suelo para su adaptación (Kim *et al.*, 1997).

A pesar de que las plantas tienen la capacidad de crecer continuamente, no todas sus células se dividen bajo condiciones normales, por lo que el crecimiento de una

planta se debe a la presencia de un tipo especial de tejido que conserva siempre la capacidad de dividirse. A este tipo de tejido se le da el nombre de meristemo o tejido meristemático y está constituido por células pequeñas, no diferenciadas, con una alta relación núcleo/citoplasma, vacuolas muy pequeñas, paredes celulares delgadas y plastidios no diferenciados (proplastidios). Los meristemos se localizan únicamente en ciertas zonas o puntos de crecimiento de la planta como los ápices, axilas, ápices de la raíz, zona del cambium y felógeno. Los meristemos apicales y axilares (contenidos dentro de las llamadas yemas), al ser de manera natural los puntos de crecimiento en los vegetales tienen la capacidad de formar nuevos brotes. Esa capacidad natural la mantienen cuando se establecen y cultivan *in vitro*. Debido a lo anterior, el cultivo de yemas apicales o axilares es una manera sencilla de obtener nuevos brotes, los cuales pueden enraizarse y producir así nuevas plantas. Este sistema de propagación se basa, por lo tanto, en la formación de nuevos brotes a partir de meristemos preexistentes, por lo que no implica fenómenos de dediferenciación y rediferenciación celular como lo que ocurre en la organogénesis y embriogénesis somática (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1999).

Variación somaclonal:

Se ha visto que algunos de los métodos de micropropagación inducen variación en los materiales producidos. Esto debido a un fenómeno conocido como variación somaclonal. En algunas ocasiones estas variaciones podrían resultar en características ventajosas, tales como formas nuevas de hojas y frutos, color de hojas o espinas. Sin embargo, el mantenimiento tanto del genotipo como del fenotipo idéntico es una de los requerimientos indispensables para la propagación masiva. Se ha demostrado que utilizando segmentos nodales (yemas) para la micropropagación hay una mayor probabilidad de mantener la estabilidad genética (Kiss *et al.*, 1995).

Se conoce que ciertos tipos de cultivos *in vitro* tienen un efecto desestabilizante en el genoma de las células que puede dar como resultado la variación genética o citogenética de las plantas generadas a partir de éstas. La inestabilidad aparentemente se presenta sobre todo en los procesos de mantenimiento y duplicación del ADN así como en la mitosis misma. Este tipo de variación que se presenta en las plantas generadas *in vitro*, llamada variación somaclonal, puede ser considerada como un fenómeno negativo si se presenta dentro de los esquemas de propagación masiva de plantas en los cuales se pretende mantener el genotipo exacto de los individuos elegidos como progenitores. En ocasiones, esta variación acumulada durante varios ciclos de subcultivo le resta a los tejidos la capacidad de regeneración de plantas completas a partir de ellos. Por fortuna, esta variación somaclonal no se presenta con la misma frecuencia en todos los sistemas de cultivo *in vitro* y en algunos de ellos es prácticamente inexistente. Por lo general, la variación somaclonal es mucho más frecuente en cultivos compuestos por células o tejidos “desdiferenciados”, como las células en suspensión o el tejido calloso. En estos casos, la variación se va acumulando con el tiempo, lo cual significa que puede ser mucho mayor en los cultivos que se han mantenido por tiempo considerable *in vitro*. Por otra parte, la variación somaclonal está prácticamente ausente cuando se cultivan estructuras organizadas como meristemos y yemas, por lo que puede considerarse que estos son los sistemas ideales para la propagación clonal sin aparición de variantes. Si bien la variación somaclonal puede ser un fenómeno negativo en algunos casos, ésta puede ser utilizada como vía para la obtención de variantes que pueden ser empleadas en esquemas de fitomejoramiento. En estos casos, la variación somaclonal no sólo es deseable sino que incluso puede ser acelerada mediante la utilización de mutágenos y la selección de las variantes buscadas. En cuanto a los mecanismos que desencadenan la aparición de la variación somaclonal, éstos aún no están claros. En cuanto a la frecuencia en que se presenta la variación somaclonal en los cultivos susceptibles a ella, ésta suele ser variable y depende de los factores como la fuente del explante cultivado *in vitro*, el genotipo, el grado de organización del tejido, los componentes del medio (sobretudo reguladores del crecimiento), la

edad del cultivo y la tasa de crecimiento del mismo. Mediante este tipo de variación combinada con esquemas adecuados de selección, ha sido posible obtener líneas con mayor resistencia a herbicidas, a sales, a sequía, a temperaturas extremas, a patógenos (toxinas), entre otros (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1999).

Conservación in vitro de germoplasma:

El cultivo *in vitro* son una serie de técnicas que se utilizan cada vez más para superar las dificultades de almacenamiento de material delicado, especies de cualidades superiores. Estas técnicas de cultivo ofrecen altos índices de multiplicación. Además, en sistemas funcionales los costos de mantenimiento son bajos, el material está disponible para quien lo solicite, los tejidos se encuentran exentos de elementos patógenos y, por consiguiente, pueden transportarse a cualquier parte del mundo. Un factor muy importante es que los cultivos se mantengan en condiciones controladas (Pérez- Molphe- Balch *et al.*, 1999).

Existen, básicamente, dos tipos de almacenamiento del material: los sistemas a corto y mediano plazo, y los sistemas a largo plazo. Para las necesidades inmediatas, los cultivos pueden mantenerse mediante transferencias continuas, multiplicándolos y utilizándolos conforme sea necesario. Para el almacenamiento a mediano plazo, se pueden regular varios factores, como por ejemplo el mantenimiento a bajas temperaturas, la modificación de los recipientes para el cultivo o de los componentes de los sustratos, la reducción del oxígeno y de la presión atmosférica, y la adición de inhibidores del crecimiento como el ácido abscísico (Pérez *et al.*, 1997).

Cuando se trata de mantener los cultivos más allá de un periodo breve, se plantean varios problemas, como la contaminación y la inestabilidad genética y, algunas veces la pérdida del potencial morfológico. El problema más grave es, tal vez, el de la variación genética que puede resultar de un subcultivo frecuente, así

como la “selección” *in vitro* concomitante que engendra el sistema. La variación somaclonal puede generarse, amplificarse y proseguirse con cultivos subsiguientes. Por lo general, los cultivos organizados (puntas radiculares y de retoños) parecen tener mayor estabilidad que los cultivos desorganizados como los callos y las suspensiones celulares. En consecuencia, el crecimiento retardado es más ventajoso, aunque no existe protección contra la variación somaclonal. La criopreservación o la preservación a largo plazo es tal vez el sistema más prometedor para la conservación del plasma germinal. Este método consiste en almacenar el material a temperaturas ultrabajas (por lo general, -196°C), en que cesa el metabolismo celular. De este modo se reduce considerablemente la erosión genética y el material se puede almacenar indefinidamente. Las técnicas de criopreservación suelen adaptarse a cada especie o tipo de tejido, y los problemas parecen relacionarse con la complejidad estructural y heterogeneidad celular del material conservado. Cada etapa de la técnica está destinada a proteger a las células de la formación de cristales de hielo intracelulares que pueden dañar las membranas celulares u organelos. Los daños pueden traducirse en una menor eficacia de la membrana plasmática debido a la formación de hielo intracelular, la lisis inducida por expansión tras la descongelación y la pérdida de respuesta osmótica (Harry y Torpe, 1991). La criopreservación es considerada hoy la alternativa más prometedora para la conservación de germoplasma de especies con semillas recalcitrantes y de plantas propagadas vegetativamente (Pérez-Molphe- Balch *et al.*, 1999).

2.3.2. Generalidades acerca de los marcadores moleculares:

Los marcadores moleculares se basan en el análisis de secuencias de ADN que se expresan y que afectan al fenotipo (genes) o bien segmentos de ADN no codificante. Una característica fundamental en los marcadores moleculares es que deben ser polimórficos, para que sean de utilidad en el mapeo, es decir se deben encontrar formas alternativas entre los individuos para poder detectarlos en la descendencia de una crucea o bien entre los individuos al analizar poblaciones. Los

segmentos polimórficos presentan en promedio variaciones en su secuencia de 300 a 500 pb. La mayoría de las variaciones de los segmentos polimórficos, se localizan dentro de los intrones (secuencias intragénicas que no codifican), por lo que carecen de efecto sobre la fisiología o aspecto de los organismos, por lo que solo es posible detectarlos en el ADN genómico. Dentro de los marcadores moleculares conocidos podemos citar a: RFLP (Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción), RAPD (ADN Polimórfico Amplificado al Azar), STS (Sitios Marcados en la Secuencia) y AFLP (Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos Amplificados). Estos marcadores moleculares son utilizados para establecer la variabilidad genética a nivel de ADN y para darle seguimiento a caracteres heredables de importancia (Pejic *et al.*, 1998).

ADN Polimórfico Amplificado al Azar (RAPD):

Los marcadores moleculares pueden ser utilizados para: a) Verificar si los sistemas de propagación masiva son capaces de generar por si mismos cambios genéticos en los materiales, lo cual sería un fenómeno indeseable; b) Conocer el grado de variabilidad genética presente en una población de plantas micropropagadas y comparar la variabilidad genética presente en una población silvestre. Esto es importante si se pretende la reintroducción al ambiente natural de plantas generadas *in vitro*; c) Contribuir a resolver algunas dudas que puedan existir acerca de la taxonomía o de las relaciones evolutivas entre las especies. Uno de los marcadores moleculares más utilizados son los denominados RAPDs (*Random Amplified Polymorphic DNA*). El método RAPD es un procedimiento que detecta polimorfismos en secuencias de nucleótidos, en un ensayo basado en la amplificación por PCR de ADN usando solo un iniciador único de secuencia corta (10 bases) de nucleótidos arbitraria. En esta reacción, especies únicas de iniciadores, se unen al ADN genómico en dos diferentes sitios en cadenas y orientaciones opuestas del molde de ADN. Si estos sitios están dentro de una distancia amplificable, se forma un producto de ADN mediante el uso de una Taq polimerasa y utilizando un termociclador. La presencia de cada producto

amplificado, identifica completa o parcialmente secuencias homólogas de nucleótidos, entre el ADN genómico y el iniciador, al final de cada producto amplificado. En promedio, cada iniciador dirigirá la amplificación de varios loci separados en el genoma, haciendo de esta prueba, una manera eficiente de clasificar por polimorfismo en la secuencia de nucleótidos entre individuos. Polimorfismos en la técnica de RAPD, son el resultado de un cambio en la base del nucleótido que altera el sitio de unión del iniciador, o bien, una inserción o deleción dentro de la región amplificada. Por lo tanto, los polimorfismos son generalmente notables por la presencia o ausencia de un producto de amplificación de un locus único. Esto incluso significa que la técnica RAPD tiende a proveer solo marcadores dominantes. Individuos que tienen dos copias de un alelo, no se pueden distinguir cuantitativamente de aquellos que contienen solo una copia del alelo (CIMMYT, 1995).

La técnica RAPD detecta polimorfismo en las secuencias de nucleótidos de segmentos de ADN genómico, se basa en la amplificación por PCR de un segmento de ADN, utilizando un iniciador de secuencia de nucleótidos aleatoria. Las técnicas de marcadores moleculares están basadas en el estudio directo de la molécula de ADN, por lo tanto los resultados obtenidos son totalmente independientes de las condiciones ambientales, pudiendo ser utilizados para identificar correctamente un individuo, para establecer grados de similitud entre individuos o para detectar la presencia de un gen o alelo en particular. Como se mencionó anteriormente, uno de los usos de la técnica RAP es detectar la huella y estimar la variabilidad genética presente en los organismos en estudio. El RAP usa técnicas moleculares basadas en la PCR (Polimerasa Chain Reaction, en inglés; Reacción en cadenas de la Polimerasa), y presenta una serie de ventajas entre las que destacan:

- La rapidez en la obtención de los resultados,

- No es necesario conocer la secuencia genética del ADN que se va a amplificar,
- No requiere de sondas específicas para especies ni el uso de material radiactivo,
- Requiere poca cantidad de ADN , el cual no necesita ser de alta pureza
- Relativamente bajo costo en comparación con otros tipos de marcadores (Goto, *et al.*, 1998).

Una fase importante en la estandarización de la técnica de RAPDS es la prueba de al menos 20 diferentes decámeros para establecer cual o cuales nos producen el mayor grado de bandas polimórficas en nuestro material a analizar.

2.3.3. Antecedentes referentes al cultivo *in vitro* del género *Agave*:

A pesar del gran potencial que pueden tener estas técnicas, existen escasos reportes sobre el cultivo *in vitro* y la micropropagación de Agaves. A continuación se detallan los trabajos más importantes realizados en este campo, mientras que el cuadro 2 se muestra un resumen del estado actual del conocimiento en el cultivo *in vitro* del género *Agave*.

Chrispeel y Sadava 2003. Realizaron una revisión de los trabajos sobre micropropagación del agave para tequila (*Agave tequilana* Weber var. Azul), a partir de 1998 se tenía una gran demanda y por ende se estaban realizando año con año plantaciones cada vez mayores. Las estadísticas de siembra indicaban necesidades de hasta 30 millones de plantas al año. Este hecho fue el detonador de que AGROMOD, una subsidiaria de Savia en México, a través de su organismo de investigación científica (CIICA, A.C.) iniciara el desarrollo de la tecnología de micropropagación de agave a través de las técnicas de cultivo de tejidos. En 1999 ya se había declarado una fuerte necesidad de material vegetal de siembra sano para esta industria, dado que las enfermedades propias del cultivo estaban

acabando con gran parte de las plantaciones. Esto, aunado al hecho de que la gran necesidad de agaves por parte de la industria tequilera propició la cosecha temprana de muchas plantaciones, preocupó a los industriales del tequila y productores de agave, propiciando, entre otras cosas, un acercamiento con AGROMOD, lo que se tradujo en el inicio de la experiencia de micropropagar agaves a gran escala. La manera más rápida de obtener material de siembra seleccionado por su calidad, libre de enfermedades y homogéneo, es precisamente a través de las técnicas de micropropagación, utilizando el cultivo de tejidos y las técnicas bioquímicas y moleculares que permiten certificar la sanidad de las plantas producidas. Ha sido un reto desarrollar una tecnología eficiente y rentable para producir agaves micropropagados a gran escala (con un objetivo de diez millones de plantas en tres años). Ello ha requerido llevar los conceptos académicos y los resultados de la investigación científica que se han desarrollado en nuestro país, a escala industrial, en donde los procesos deben ser rigurosos, eficientes, robustos y rentables. En este caso, llevar una metodología del artículo científico a la práctica no fue difícil. Lo difícil consistió en llevarlo a gran escala comercial. El primer mérito fue conceptualizar, paso a paso, lo que más tarde conformaría el protocolo de trabajo. Esto implicó la actualización de la información tecnológica, la ingeniería del proceso, la introducción a la ingeniería de calidad y el diseño robusto (planeación de experimentos por medio de las técnicas Taguchi) que permitiera, en el corto plazo, definir los parámetros para poner en marcha el proceso de manufactura de las vitroplantas de agave, del campo a la probeta y de la probeta al campo, en donde las plantas habrán de pasar largos años. Una vez definido este proceso, el siguiente reto fue el de entrar formalmente al ritmo de producción industrial, a la organización de una fábrica, sin relación con la parte académica o los laboratorios de un centro de investigación, capacitando a las más de cien personas que trabajan en laboratorio e invernaderos, confrontando los pormenores de una planta rústica, que nunca antes había sido micropropagada en estas dimensiones en ninguna parte del mundo, siendo el principal de los retos, sin duda, el control de la contaminación microbiana. Ahora que se ha entrado en la etapa de control y dominio del proceso industrial, se pueden resumir los

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

principales logros de micropropagación e invernaderos de la manera siguiente: El primer año de funcionamiento, se produjeron 400 mil plantas. En el año 2002 se lograron dos millones y para 2003 se tenía proyectado superar los 4.5 millones, tomando en cuenta tres especies: Cordyline, banano y agave. AGROMOD es la primera empresa en el mundo en haber producido más de dos millones de agaves y se está iniciando la entrega del tercer millón. En el campo hay actualmente 500 mil agaves micropropagados, entregados por AGROMOD a la industria tequilera, cuyo desempeño agronómico ha sido excelente, superando al mejor material de siembra tradicional (Chrispeel y Sadava, 2003).

Groenewald *et al.* (1977), fueron los primeros en regenerar plántulas de una especie no identificada de *Agave*. El callo de embriones obtenidos de semilla fue inducido y mantenido en el medio enriquecido de Linsmaier y de Skoog complementado con 1 mgL^{-1} de 2,4-D y 5 mgL^{-1} de cinetina. La organogénesis se obtuvo después de 12 semanas y dos resiembras en medio de cultivo con menor concentración de reguladores de crecimiento (0.2 mgL^{-1} de 2,4-D y 1 mgL^{-1} de cinetina).

Binh *et al.* (1990) reportaron la formación de callo en las superficies del corte de los explantes de la parte basal de las plántulas una vez removidas todas las hojas (un cilindro de 1.5 cm de altura), después de la incubación de dos semanas en medio de cultivo MS. La adición de 0.1 mgL^{-1} 2,4-D (ácido diclorofenoacético) y 0.1 mgL^{-1} BAP (6-Bencilaminopurina) estimuló una gran proliferación de tejido calloso, del cual se generaron brotes de las especies estudiadas (*Agave cantala* Robx, *A. fourcroydes* Lem. y *A. sisalana* Perrine). Todos los brotes de más de 3cm fueron separados de los aglomerados y transferidos al medio para enraizamiento; el enraizamiento se produjo después de 4-5 semanas. Cuando las raíces alcanzaron un tamaño de 5-8 cm las plántulas fueron transferidas a camas con arena para su aclimatación durante 4 semanas.

Das, en 1992 reporta la micropropagación de *Agave sisalana*, a partir de rizoma y hojas jóvenes de plantas del jardín experimental de Jute Agricultural Research Institute, Barrackpore. La desinfección se realizó con Teepol (MR) al 5% y cloruro de mercurio 0.1% por 30 minutos. Utilizaron explantes de rizoma de 5-7 mm de grosor y explantes de 6-8 mm rebanadas de la región distal de la hoja, colocados en tubos (25 mm x 150 mm) con medio MS (Murashige & Skoog 1962) o SH (Schenk & Hildebrant 1972) adicionados con BA (benciladenina) (a 0.89, 2.2, 4.4, 8.9, 22.2 y 44 μM). Los explantes obtenidos de las hojas no respondieron a los tratamientos probados. Después de 60 días los explantes obtenidos de rizoma, creciendo en medio MS no respondieron a los tratamientos probados, mientras que 2-4 nódulos verdes fueron observados en cada uno de los 10 explantes creciendo en medio SH con las concentraciones más altas de BA (22.2 y 44.0 μM). Estas regiones nodulares fueron extirpadas y subcultivadas en el mismo medio. En este paso, de 2-4 brotes pequeños aparecieron por cada región nodular. Estos explantes cuando fueron transferidos en el tercer paso (un paso = 60 días) a partir de 22.2 μM a un nivel inferior de BA (2.2 o 4.4 μM) produjo 8-12 brotes y brotes pequeños de longitud variable. Los brotes pequeños a partir de 44.0 μM de BA no se desarrollaron más, después de que fueron transferidos a cualesquiera de las concentraciones de BA indicadas arriba. Los brotes fueron cortados cuando tenían una longitud de la hoja de 2.0 centímetros o más, enraizaron en un plazo de 30 días en el medio basal SH sin reguladores de crecimiento.

Nikam, en 1997 realiza una serie de experimentos para obtener el cultivo de callo del *Agave sisalana* a partir de rizoma, los explantes del vástago en los medios de cultivo MS, SH, Gamborg y de White adicionados con diversas concentraciones de BA, de cinetina, de NAA, de IAA y de 2,4-D en combinación o solos. Los brotes se obtuvieron de explantes del vástago y del rizoma directamente o de tejido calloso. La capacidad para la regeneración de brotes seguía siendo constante en el tejido calloso por más de 32 meses. Los explantes y el tejido calloso derivado de éstos se subcultivaron en medio adicionado con 0.1 a

2.0 mgL⁻¹ de 2,4-D y 0.1 a 5.0 mgL⁻¹ de BA, no se observó organogénesis. Sin embargo, cuando se adicionó al medio de 0.2 a 2.0 mgL⁻¹ de cinetina se generaron brotes en los explantes de rizoma y vástago entre la tercera y cuarta semana. El mayor número de brotes en los explantes de rizoma (5.0 ± 1.3) y en los explante del vástago (5.7 ± 1.97) se observó cuando el medio fue adicionado con 0.5 mgL⁻¹ de cinetina. En niveles más altos del cinetina, la formación del callo ocurre en los extremos del explante y una reducción del en el número de brotes por explantes.

Santacruz-Ruvalcaba, *et al.* en 1999 realizaron la propagación *in vitro* de *Agave parrasana* Berger que es una especie ornamental importante, nativa del estado de Coahuila México, los explantes utilizados se obtuvieron a partir de semillas de plantas del Jardín Botánico de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo, México. Se utilizó medio MS adicionado con BA (0, 13.3, 26.6, 39.9 y 53.2 μ M) y 2,4-D (0, 0.04, 0.11 y 0.18 μ M), el mayor número de brotes se obtuvieron con las combinaciones de 2,4-D (0 y 0.04 μ M) y de BA (13.3, 26.6, 39.9 y 53.2 μ M). El enraizamiento se logró usando medio basal MS adicionado con IBA (9.8, 19.6, 29.5 y 39.3 μ M) en combinación con dos intensidades de iluminación (25 μ mol m⁻² s⁻¹ y 100 μ mol m⁻² s⁻¹).

Hazra, *et al* en 2002, establecieron un sistema para la regeneración *in vitro* vía organogénesis de *Agave sisalana* Perr. Ex. Engelm. El tejido calloso se inició a partir hojas inmaduras creciendo *in vitro* y de hojas maduras y rizoma creciendo *ex vitro*, de plantas de *A. sisalana* Perr. Ex. Engelm. Todos los explantes de 1-2 cm de diámetro se obtuvieron de tejido calloso bien establecido, subcultivado por 45 días en tres diferentes medios [MS, MS + (NH₄NO₃: 1500 mgL⁻¹) y MS + hidrolizado de caseína (1000 mgL⁻¹)], todos los medios adicionados con 2,4-D (9.05 μ M) y cinetina (4.6 μ M), 30 g/L de sacarosa y 8 gL⁻¹ de Bacto-agar, las fitohormonas se esterilizaron por filtración. Cada tipo de explante produjo diferente tejido calloso. Las hojas inmaduras produjeron callo friable y amarillento, el tejido

calloso compacto y verde se obtuvo de rizoma y hojas inmaduras creciendo en medio enriquecido y adicionado con BA (8.9-44.0 μM) después 30-60 y 75-90 días de cultivo respectivamente. El tratamiento que produjo mejores resultados fue el de BA (26.6 μM) con 40-80% de brotes por explante.

Nikam, *et al.* en 2003, desarrollaron una metodología para la producción de plántulas de sisal (*Agave sisalana* Perr. Ex. Engelm), a partir de embriogénesis somática. La primera etapa consistió en inducir la formación de callo a partir de explantes del vástago de la región del bulbo, en medio adicionado con 2,4-D (0.5-1 mgL^{-1}) más BAP o cinetina (1-2 mgL^{-1}), los brotes formados fueron transferidos a medio adicionado con 0.5 mgL^{-1} de cinetina. Después de 2 semanas de incubación, el tejido calloso formado en la base de los brotes jóvenes producidos *in vitro*, se transfirió a medio de cultivo adicionado con fitohormonas de los que el mejor tratamiento para la formación de embriones somáticos fue al que se adicionó 0.1 mgL^{-1} de cinetina. Después de que maduraron los embriones, las plántulas obtenidas por esta metodología se colocaron en medio para el enraizamiento, posteriormente se transfirieron a suelo para su aclimatación. Una vez transcurrido este periodo las plántulas se transfirieron a condiciones de campo donde el 100% se desarrollaron adecuadamente, alcanzando 60-85 cm en un año.

Enríquez *et al* 2005, indujeron el enraizamiento de brotes adventicios de *Agave angustifolia* obtenidos *in vitro* de segmentos de médula de tallo. El enraizamiento se obtuvo en medio de cultivo adicionados con distintas concentraciones de las sales minerales de Murashige y Skoog (1962), manteniendo el resto de los componentes constante, también se adicionó al medio de cultivo distintas concentraciones de ácido indolbutírico (AIB). El total de brotes enraizaron incluso aquellos que se colocaron en medio de cultivo sin AIB. El número de raíces por brote aumentó en relación a la concentración creciente de AIB y la concentración decreciente de las sales minerales inorgánicas en el medio. El enraizamiento óptimo se observó en el medio con 75% de sales y 0.75 mg L^{-1} de AIB.

Valenzuela-Sánchez *et al* 2006, desarrollaron organogénesis indirecta en *Agave tequilana*. Se utilizaron segmentos de hojas y tejido meristemático de la región central de la roseta (piña), para evaluarlos como explantes. Cada explante fue sometido a diferente tratamiento utilizando distintas concentraciones de ácido naftalenacético (NAA) y ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). El desarrollo de callo fue mejor con los tratamientos con (NAA) en contraste con los tratamientos de 2,4-D. La mejor respuesta para la regeneración de tejido calloso se dio con la combinación 1.1 μM de 2,4-D y 44 μM de 6-bencilaminopurina (BA). La capacidad de regeneración de callo se mantuvo durante 3 meses. Los brotes obtenidos, se enraizaron en medio MS libre de hormonas y las plántulas ya enraizadas fueron aclimatadas en un invernadero con un 100% de supervivencia.

Portillo *et al.* (2007), lograron desarrollar embriogénesis somática indirecta a partir de hojas de *Agave tequilana* Weber cultivar azul utilizando medio MS suplementado con vitaminas L2 y la adición de citocininas: 6-bencilaminopurina (BA), 1-fenil-3 (1,2,3-tiadiazol-5-il) urea (TDZ), 6 - (γ - γ -dimetilamino) purina (2ip) y 6-furfurilaminopurina (CIN), junto con el auxina ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). Se encontraron diferencias entre los seis genotipos estudiados con respecto a su respuesta embriogénica. Los embriones producidos por el genotipo S3 bajo un régimen de alta concentración de la hormona citocinina (44.4 a 66.6 μM BA) en comparación con la auxina (4.5 μM 2,4-D) contiene clorofila, mientras que los producidos con altas concentraciones de auxina en combinación con citocinina (9.0 y 13.6 μM 2,4-D y 1.3 4.0 μM BA, respectivamente) son blanquecinos y morfológicamente similares a sus homólogos cigóticos. Los embriones somáticos germinaron y maduraron después de la transferencia del callo embriogénico en medio sin reguladores de crecimiento y enriquecido con nitrógeno orgánico. Las observaciones microscópicas demostraron un origen unicelular para la producción de embriones somáticos indirecta.

Flores-Benítez *et al.* (2007), obtuvieron plantas transgénicas de *Agave salmiana*, utilizando dos protocolos: co-cultivo con *Agrobacterium tumefaciens* y bombardeo de partículas. El gen uidA (b-glucoronidasa) fue utilizado como gen reportero para ambos métodos mientras que los genes npt II y bar se utilizan como marcadores para seleccionar las transformaciones con *A. tumefaciens* y biobalística respectivamente. A partir de callo embriogénico obtenido de hojas jóvenes de *A. salmiana* se realizó la transformación. Los transgenes fueron detectados por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en plántulas de 11 meses de edad. El carácter transgénico de las plántulas también fue confirmado con el ensayo histoquímico GUS. La transformación a través del co-cultivo de explantes con *Agrobacterium* fue el método más eficaz de la transformación, se produjeron 32 plantas transgénicas y con una eficiencia de 2.7%.

Rodríguez *et al.* (2007), indujeron la formación de raíces transformadas por *Agrobacterium rhizogenes* en *Agave salmiana* Otto, así como su posterior colonización por un hongo micorrízico de las mismas. Para conseguirlo, inocularon plantas germinadas *in vitro* con diferentes concentraciones de bacterias y de acetosiringóna en varios sitios (hoja, tallo y raíz). Después de 25 días de cocultivo en la oscuridad se obtuvieron las raíces transformadas, con una eficiencia de 63%. La capacidad de colonización de *G. intraradices* quedó demostrada con una eficiencia de 70%.

Cuadro 2. Antecedentes sobre el cultivo y propagación *in vitro* de especies del género *Agave*.

Especie de <i>Agave</i>	Avance Reportado	Medio de Cultivo / Reguladores del crecimiento utilizados	Referencia
<i>Agave sp.</i>	Regeneración de plantas a través de organogénesis indirecta.	Linsmaier y Skoog con 1 mg L ⁻¹ de 2,4-D y 5 1mg L ⁻¹ de cinetina para la generación de tejido calloso. Mismo medio con 0.2 mg L ⁻¹ de 2,4-D y 1 mg L ⁻¹ de cinetina para la generación de brotes a partir del callo.	Groenewald y col. (1977)
<i>A. fourcroydes</i>	Regeneración de plantas a través de organogénesis indirecta.	SH adicionado con BA en un rango de 2.2 a 22.2 µM	Robert y col. (1987)
<i>A. arizonica</i>	Regeneración de plantas a través de organogénesis indirecta.	MS con 1.4 µM de 2,4-D para la generación de tejido calloso. Diferenciación de brotes en medio con 44.4 µM de BA y 0.5 o 5.4 µM de ANA.	Powers y Backhaus (1989)
<i>A. cantala</i> <i>A. fourcroydes</i> <i>A. sisalana</i>	Regeneración de plantas a través de organogénesis indirecta.	MS con 0.1 mg L ⁻¹ de 2,4-D y 0.1 mg L ⁻¹ de BA para la generación de tejido calloso y brotación.	Binh y col. (1990)
<i>A. sisalana</i>	Regeneración de brotes a partir de meristemos basales (rizomas).	MS o SH con BA (22.2 µM).	Das (1992)

<i>A. victoria-reginae</i>	Embriogénesis somática directa en explantes de hoja.	MS con vitaminas L2 y 2,4-D (1,4 μM) para la generación de embriones, MS o SH al 50% para su germinación.	Rodríguez-Garay y col. (1996)
<i>A. sisalana</i>	Regeneración de brotes a partir de meristemos basales y organogénesis indirecta.	MS, SH, Gamborg y de White adicionados con diversas concentraciones de BA, de cinetina, de NAA, de IAA y de 2,4-D en combinación o solos.	Nikam (1997)
<i>A. amaniensis</i>	Cultivo de tejido calloso y producción de sapogeninas.	MS con Cinetina (23.2 μM) y 2,4-D (2.26 μM).	Andrijany y col. (1999)
<i>A. parrasana</i>	Regeneración de brotes a partir de meristemos basales y organogénesis indirecta.	MS adicionado con BA (13.3, 26.6, 39.9 y 53.2 μM) y 2,4-D (0 y 0.04 μM).	Santacruz-Ruvalcaba y col. (1999)
<i>A. sisalana</i>	Regeneración de plantas a través de organogénesis indirecta.	MS, MS + (NH_4NO_3 : 1500 mg L^{-1}) y MS + hidrolizado de caseína (1000 mg L^{-1}), todos adicionados con 2,4-D (9.05 μM) y cinetina (4.6 μM).	Hazra y col. (2002)
<i>A. victoria-reginae</i>	Regeneración por embriogénesis somática y generación de brotes a partir de meristemos basales.	MS con fue con 2.26 μM de 2,4-D para la inducción de callo. MS con 2.2-4.4 μM de BA para la generación de brotes.	Martínez-Palacios y col. (2003)
<i>A. sisalana</i>	Regeneración por embriogénesis somática.	MS con 2,4-D (0.5-1 mg L^{-1}) más BAP o cinetina (1-2 mg L^{-1}) para la formación de	Nikam y col. (2003)

		callo. MS con 1 mg L ⁻¹ de cinetina para la diferenciación de embriones somáticos.	
<i>A. angustifolia</i>	Generación de brotes de a través de organogénesis directa a partir de segmentos de médula de tallo.	MS con 1 mg L ⁻¹ de BA.	Enríquez del Valle y col. (2005)
<i>A. tequilana</i>	Regeneración de plantas a través de organogénesis indirecta y generación de brotes a partir de meristemos.	Para la formación de callo el mejor tratamiento fue con ANA. La regeneración a partir de mersitemos y de callo se logró con 1.1 µM de 2,4-D y 44 µM de BA.	Valenzuela-Sánchez y col. (2006)
<i>A. salmiana</i>	Generación de brotes a partir de meristemos.	MS con 2.0 mg l ⁻¹ BA y 0.25 mg L ⁻¹ AIA.	Silos-Espino y col. (2007)
<i>A. tequilana</i>	Regeneración por embriogénesis somática.	Se utilizaron MS más combinaciones de 2,4-D/BA µM para la formación de callo. MS más distintas concentraciones de BA, cinetina, 2iP y TDZ para la diferenciación de embriones somáticos	Portillo y col. (2007)
<i>A. vera-cruz</i>	Regeneración por embriogénesis somática.	Se utilizó MS adicionado con 4.52 µM de 2,4-D para la formación de callo. MS adicionado con 5.37 µM de NAA más 0.91 µM de zeatina.	Tejavathi y col. (2007)
<i>A. salmiana</i>	Regeneración de plantas transformadas	Reportan la transformación genética del a través de dos técnicas diferentes, cocultivo	Flores-Benítez y col. (2007)

		con <i>Agrobacterium tumefaciens</i> y bombardeo con micropartículas cargadas con ADN. Se usaron genes reporteros y marcadores y la regeneración de plantas transgénicas se hizo a través de embriogénesis somática.	
<i>A. salmiana</i>	Generación de raíces transformadas	Generación de raíces transformadas a través del cocultivo con <i>Agrobacterium rhizogenes</i> . Se demostró la capacidad de estas raíces para ser colonizadas por el hongo micorrícico <i>Glomus intraradices</i> .	Rodríguez-Hernández y col. (2007)
<i>Agave duranguensis</i> <i>A. obscura</i> <i>A. pigmaea</i> <i>A. salmiana subs. crassispina</i> <i>A. tequilana</i> <i>A. victoria-reginae</i>	Regeneración de plantas a través de organogénesis indirecta y generación de brotes a partir de meristemos.	Se utilizó medio MS más combinaciones de AIB con BA o 2,4-D para la generación de brotes.	Ramírez-Malagón y col. (2008)

2.3.4. Antecedentes sobre el uso de marcadores moleculares para evaluar la variabilidad genética de agaves y otras plantas en el cultivo *in vitro*:

Keb-Llanes *et al.* (2002), desarrollaron una metodología para la obtención de una manera rápida y eficiente ADN, extraído de plantas de *Agave*, las especies estudiadas fueron: *A. angustifolia*, *A. americana*, *A. sisalana* y tres variedades de henequén (*A. fourcroydes*). El protocolo propuesto, tiene la ventaja de poder realizar la extracción simultánea de ADN de hasta 80-100 muestras diarias a un bajo costo también con un gran ahorro de reactivos. Las muestras obtenidas mediante este procedimiento se utilizaron de manera exitosa para el análisis tipo AFLP.

Existen escasos trabajos con marcadores moleculares del tipo RAPD, para especies del género *Agave*, aquí se presenta un trabajo para *Agave tequilana* Weber y otros para otras especies de plantas.

Gil-Vega *et al.* (2001), realizaron una investigación de la diversidad genética de *Agave tequilana* var. Azul, utilizando análisis marcadores del tipo RAPD. Para llevar acabo el trabajo, hicieron colectas de 10 plantas de cuatro diferentes campos cultivados con esta especie. Dos de los campos elegidos para la colecta de las plantas, se localizaron en cada una de las dos regiones más importantes en México para la producción de *A. tequilana* (separadas por 100 km). De los resultados obtenidos, únicamente el 0.8% de los marcadores resultaron polimórficos y 39 de las 40 plantas incluidas en el estudio resultaron completamente isogénicas. El nivel de polimorfismo encontrado para esta especie, es de los más bajos de los que se tienen reportes para una planta cultivada y es consecuencia de la propagación exclusivamente vegetativa por varias generaciones de un solo material inicial. Así mismo, se realizaron las relaciones genéticas entre la variedad “azul” y las variedades “chato” y “siguin”, la variedad “chato” resultó ser la más alejada de ambas.

Yang, *et al.* 2008, determinaron que los marcadores moleculares RAPD fueron capaces de revelar más información que la tradicional clasificación morfológica, citológica y que otros caracteres, tales como los marcadores bioquímicos isozimas. Sugieren que el análisis RAPD revela un elevado número de alelos polimórficos en especies de *Leymus*. En este estudio, fueron empleados 34 oligos, se identificaron 352 fragmentos amplificados. De los cuales el 95.74% fueron polimórficos entre y dentro de las especies. Esto indica que existe diversidad y riqueza genética en *Leymus*, que tiene que ver con los tipos de alopoloidía y la polinización cruzada. La técnica con marcadores moleculares RAPD es simple, menos costosa y menos laboriosa que otras metodologías para estudiar las relaciones genéticas de diferentes grupos de especies de plantas. Sin embargo presenta algunas limitaciones. El factor más limitante es su sensibilidad, que afecta a la reproducibilidad de los resultados. Pero se puede superar eliminando la variación en la concentración del ADN, teniendo cuidado de garantizar que las condiciones de reacción y temperatura de amplificación se mantengan constante. En este estudio después de se optimizaron las concentraciones de todos los reactivos las reacciones RAPD, después de que se probó dos veces cada oligo, la reproducibilidad fue bastante buena. Por lo que se concluye que los marcadores RAPD es una técnica útil para investigación en genética y las relaciones de la diversidad biosistemática del género *Leymus*.

Martirosyan *et al.* (2008), utilizaron por primera vez el análisis RAPD para evaluar el polimorfismo intergenérico, inter e intraespecífico en la familia Lemnaceae, que crece en el territorio de Rusia. Setenta y cinco accesiones de Lemnaceae representadas en ocho especies (*L. minor*, *L. gibba*, *L. turionifera*, *L. japonica*, *L. trisulca*, *L. aequinoctialis*, *S. polyrhiza*, y *L. punctata*) de tres géneros (*Lemna*, *Spirodela*, and *Landoltia*), fueron analizadas. Los mayores niveles de variabilidad se encontraron en *L. menor*, *L. trisulca* y *S. polyrhiza*, los valores de las distancias genéticas fueron de (0.03-0.20, 0.01-0.18 y 0.03-0.16) respectivamente. El polimorfismo de los niveles más bajos se detectaron para *L. turionifera* (0.01 – 0.11). El dendograma basado en los datos del análisis RAPD, mostró que *L.*

aequinoctialis es la especie más lejana genéticamente del género *Lemna*. La biodiversidad de la familia Lemnaceae ha sido estudiada escasamente por métodos moleculares. De esta manera por primera vez se establecieron los niveles de polimorfismo genómico entre géneros, especies y poblaciones en 75 accesiones de la familia Lemnaceae y se evaluó el grado de similitud entre genomas de varios taxones.

Yadav *et al.* (2007), analizaron quince líneas de germoplasma de *Pisum sativum* L. mediante marcadores de la amplificación inespecífica del polimorfismo del ADN (RAPD). Se utilizaron 12 oligos de los cuales 11 dieron productos amplificados, con los cuales se generaron un total de 133 bandas, 106 fueron polimórficas. Las similitudes genéticas se estimaron utilizando el coeficiente de Jaccard NTSYSpc con el software NTSYSpc 2.0. El índice de similitud osciló entre 0.263 a 0.793, indicando una gran diversidad genética a nivel molecular. Con los datos obtenidos se generó un dendograma por análisis de conglomerados con los quince genotipos de chícharos, se formaron dos grupos A y B. En el grupo A cinco genotipos y en el grupo B nueve genotipos. La importancia de realizar el análisis RAPD, es la de obtener información que permita la selección de genotipos para obtener híbridos con mayores rendimientos, la selección eficiente depende de la magnitud de la diversidad presente en el cultivo. Por lo tanto, se estableció que el método RAPD permite realizar esta selección de manera eficiente y confiable.

Sensoy *et al.* (2007), determinaron la relación genética entre los 56 genotipos de melón (*Cucumis melo* L.) colectados en diversos sitios de Turquía, comparando las características fenotípicas y moleculares. Se utilizaron sesenta y un caracteres fenotípicos y 109 marcadores polimórficos RAPD obtenidos con 33 oligos para determinar la similitud genética entre los genotipos de melón. Hubo bastante correlación ($r \geq 0.97$) entre las cuatro matrices resultantes utilizadas en la caracterización molecular. En el presente estudio se utilizó el método RAPD para la evaluación genética entre los genotipos del melón turco, debido a su simplicidad, costo y eficiencia, los resultados obtenidos son similares a otros

métodos moleculares (AFLP, RAPD y RFLP) reportados en otros trabajos, esto demuestra la eficiencia del método RAPD.

Rajasekar *et al.* (2007), examinaron los niveles y patrones de variación genética del pasto (*Agrostis capillaris* L.) de las regiones templadas de Asia y Europa, así como 27 accesiones de éste pasto obtenidas del Sistema Nacional de Germoplasma Vegetal (NPGS) de EE. UU. Para realizar el análisis utilizaron marcadores de la amplificación inespecífica del polimorfismo del ADN (RAPD). La finalidad de la investigación fue la de poseer información para utilizarla en los programas de mejoramiento genético de *Agrostis capillaris* L. Se analizaron 80 oligos, de los cuales se seleccionaron 16 para realizar el análisis, se obtuvieron 120 productos amplificados polimórficos, los cuales se utilizaron para diferenciar las accesiones del pasto. Los resultados obtenidos, permitieron establecer la relación genética entre las distintas poblaciones de *Agrostis capillaris* L., así como las muestras proporcionadas por los EE. UU., por lo que se puede decir que el método RAPD permite de manera rápida, económica y segura realizar análisis genético de plantas, para planificar programas de mejoramiento genético.

Diederichsen y Yong-Bi (2006), realizaron la diferenciación fenotípica y molecular de cuatro grupos intraespecíficos de cultivares de lino (*Linum usitatissimum* L. subsp. *usitatissimum*), utilizando para ello caracteres fenotípicos (dehiscencia de la cápsula, altura de planta, largo de tallo y peso de 1000 semillas) y análisis RAPD para los marcadores moleculares. Se analizaron 3101 accesiones de cultivo de lino, de la colección de recursos genéticos de plantas en poder de Canadá (CRGP). El propósito de la investigación fue la de conocer la variación fenotípica comparada con el análisis RAPD dentro y entre los cuatro grupos de lino, para entender mejor la diferenciación genética y fenotípica del patrimonio genético de los cultivos de lino. El análisis RAPD no permitió establecer la diferenciación entre las cuatro covariedades. Los alelos que codifican para las evidentes diferencias fenotípicas entre las cuatro covariedades, no fueron incluidas en la muestra del ADN amplificado o su contribución a la totalidad de la serie de productos

amplificados polimórficos observados fue muy pequeña. Por lo que es importante establecer una correlación entre los caracteres fenotípicos y el análisis RAPD en futuros trabajos, para tener una herramienta útil en la caracterización genética eficiente del germoplasma de lino, para el mejoramiento genético de los cultivares en la obtención de fibra de mejor calidad cada vez.

Sun *et al.* (2006), publicó los resultados sobre la variación genética de *Hippophae rhamnoides* subsp.*sinensis*, que es una planta dioica de gran valor ornamental endémica de China. Existen bastantes estudios acerca de las condiciones agrícolas, nutrición, sanidad y valor ornamental, pero se conoce poco de la genética de poblaciones de esta especie. El análisis de la variación genética se llevó a cabo mediante marcadores de la amplificación inespecífica del polimorfismo del ADN (RAPD). Se estudiaron trece poblaciones de *Hippophae rhamnoides* subsp.*sinensis*, quince oligos que produjeron 107 productos amplificados de los cuales 95 fueron polimórficos. La diversidad genética dentro de las poblaciones fue de 0.168, considerablemente más baja que las especies de árboles y la mayoría de las especies perennes. La baja diferenciación genética en *Hippophae rhamnoides* subsp.*sinensis*, puede atribuirse a que la dispersión de las semillas a grandes distancias la realizan las aves, la polinización y su amplia distribución. No se encontró correlación entre la distancia genética y la distribución geográfica. Además *Hippophae rhamnoides* subsp.*sinensis*, exhibe un alto grado de reproducción vegetativa, por lo tanto, el alto nivel de reproducción clonal también puede ser responsable de la relativamente baja diversidad genética entre las poblaciones estudiadas.

Martin *et al.* (2006), realizaron el análisis genético de una variante de plátano (*Musa sp.* cv. Grande Naine) con marcadores de la amplificación inespecífica del polimorfismo del ADN (RAPD). El material analizado fueron plántulas de cultivo *in vitro*, en medio Murashige y Skoog (MS), enriquecido con 13.3 μ M de N-6-benzyladenine (BA), las cuales desarrollaron numerosas variantes morfológicas

después de que fueron transferidas a medio MS con 6.66 μ M de BA. Se evaluaron las características morfológicas de la variante CUDBT-B1; hojas abigarradas, reducción de la altura, disminución de la longitud y ancho de la lámina y floración temprana. Estas características también se manifestaron en el segundo ciclo de la progenie de CUDBT-B1. En este estudio se utilizó el oligo S-20 (50-GGACCCTTAC -30). El ensayo RAPD mostró un marcador de ADN, una banda de 1650 pb y diferencia de intensidad de la banda entre la variante CUDBT-B1 y el clon normal. Este polimorfismo RAPD puede atribuirse a que un nucleótido se insertó o se suprimió, lo que altera el sitio inicial de unión en la región amplificada.

Chen *et al.* (2005), Utilizaron ADN polimórfico amplificado al azar, para medir la diversidad genética de *Coelonema draboides* (Brassicaceae), una especie endémica de la meseta Qinghai- Tíbet. Colectaron 90 muestras de 30 poblaciones de *C. draboides*, en los condados de Datong y Huzhu de la provincia de Qinghai en China. Se obtuvieron 186 bandas amplificadas utilizando 14 oligos RAPD, con un promedio 13.3 bandas por oligo, con un 87% de bandas polimórficas. El análisis de varianza molecular (AMOVA) muestra que una gran proporción de la variación genética (84.2%) reside entre los individuos dentro de las poblaciones, mientras que únicamente el 15.8% reside en las poblaciones. Los RAPDs proporcionan una herramienta útil para evaluar la diversidad genética de especies raras, especies endémicas y para la solución de las relaciones entre poblaciones. Los resultados muestran que la diversidad genética de esta especie es alta, lo que le permite adaptarse más fácilmente a las variaciones ambientales. Este patrón de la variación genética de poblaciones de *C. draboides*, proporciona datos importantes para la estrategia de conservación de la especie. Se sugiere que sólo las poblaciones de diferentes hábitats deben ser estudiadas y protegidas, no todas las poblaciones, a fin de retener la mayor cantidad de diversidad genética como sea posible.

Deshwal *et al.* (2005), evaluaron la divergencia genética con marcadores RAPD, de 29 accesiones de Neem colectadas en dos regiones agroecológicas de la India

(11 subzonas agroclimáticas) que abarcan tres estados, Punjab, Haryana y Rajasthan. Se utilizaron 10 oligos para estudiar la variabilidad genética, generando un total 73 bandas en gel de agarosa, con promedio de 5.21 bandas por oligo, la diversidad genética estimada fue de 0.49. Las relaciones genéticas entre las accesiones se evaluaron mediante la generación de una matriz basada en el coeficiente de similitud de Jaccard, que van desde 0.70 a 0.90. El dendograma fenotípico generado por el análisis UPGMA agrupa a las accesiones en cinco categorías. El grado de variación genética detectada entre las 29 accesiones con el análisis RAPD, sugiere que puede ser utilizado para estudiar la diversidad genética en el Neem.

Nakajima *et al.* (1998), caracterizaron la diversidad genética del genoma nuclear en cultivos *in vitro* de cinco especies de *Daucus* y siete subespecies de *Daucus carota* incluidas 26 ascendientes con DNA polimórfico amplificado al azar (RAPD) y polimorfismo de los fragmentos amplificados (AFLP). Toda la zanahoria cultivada fue incluida dentro del grupo mayor. Los resultados indican que la variación genética dentro de la zanahoria cultivada es relativamente pequeña a pesar que estas variedades son clasificadas como tipos diferentes basándose en sus características morfológicas y origen. El dendograma basado en AFLP fue básicamente el mismo que con RAPD. Así se muestra que el RAPD es también un método apropiado para estimar la variación genética en *Daucus*. Ambos AFLP y RAPD son suficientemente confiables a representar la diversidad genética entre la ascendencia de *Daucus* a pesar de las pequeñas diferencias observadas entre dendrograma derivados de cada conjunto de datos. Estas diferencias podrían ser ocasionadas por diferentes eficiencias en las PCR o el tamaño de la muestra o por el número de bandas polimórficas.

Labra *et al* (2001), verificaron la ocurrencia de cambios en el genoma en plantas de arroz transgénicas producidas por infección con *Agrobacterium tumefaciens* con marcadores moleculares. El análisis de AFLP y RAPD de diez no transgénicas y diez plantas transgénicas muestran homogeneidad genómica entre los controles

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

y comprueba los cambios genómico entre la población transgénica. La comparación del presente análisis y otros anteriores muestran que las diferentes poblaciones obtenidas por distintos métodos de transformación presentan diferentes grados de cambio genómico. La transformación con *A. tumefaciens* se caracteriza por pocos cambios genómicos, comparada con las plantas transformadas por el método de generación de protoplastos, pero los métodos que generan los mayores cambios son el bombardeo con partículas y la electroporación, el uso de uno u otro método repercute en la mayor o menor variación somaclonal del cultivo a menor variación genómica menor variación somaclonal. Los resultados obtenidos muestran que la utilización de RAPD y AFLP pueden ser utilizados en la obtención de datos confiables para el estudio del polimorfismo del ADN genómico.

Guo *et al.* (2002) analizaron los híbridos de *Citrus reticulata* y *Poncirus trifoliata* obtenidos por la fusión de protoplastos con el método de electroporación, con RAPD y AFLP para establecer si el proceso fue exitoso, los resultados obtenidos muestran que las plantas obtenidas después de subcultivar los protoplastos fusionados en un medio apropiado para la brotación, eran tetraploides e híbridos, la técnica de AFLP resultó ser la mejor y más apropiada para la evaluación.

Galderisi *et al* (1999) reportan que la técnica de ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD) ofrece una herramienta práctica para detectar polimorfismo en el ADN. Por lo que puede ser utilizada para detectar las diferentes clonas y cultivares. Se ha desarrollado un procedimiento exhaustivo basado en el análisis de RAPD para la tipificación molecular rutinaria de varios vegetales. En el presente escrito se reporta la aplicación de esta técnica para la identificación correcta de seis cultivares de avellana (*Corylus avellana*) localizados en la campiña del sur de Italia. Los cultivares de avellana analizados se identificaron exitosamente por el marcador molecular RAPD utilizando los iniciadores de ADN U2, U3, U4, U11 y U14. Sin embargo, en cada uno de los cultivares se observó escasa heterogeneidad genética entre las distintas clonas. Desde entonces esta

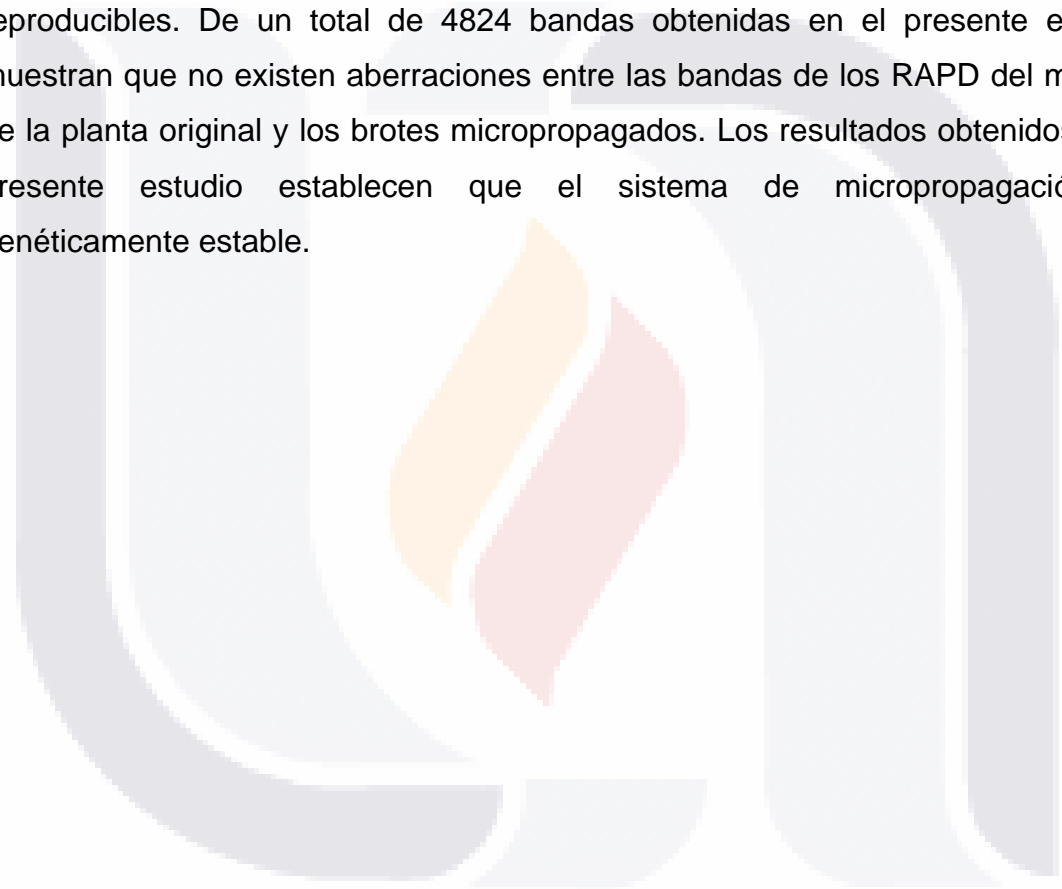
tesis tesis tesis tesis tesis

técnica está entre los métodos más simples y fáciles utilizados como marcadores moleculares, que pueden ser fácilmente adoptados por laboratorios con escasa infraestructura sofisticada (por ejemplo las agencias reguladoras de exportación de cultivos).

Watanabe *et al.* (1998), reportan el análisis de la variabilidad genética de la planta medicinal *Angelica acutiloba*, esta planta llamada Touki se utiliza como una medicina natural, fue propagada a partir de yemas axilares *in vitro*. No se encontraron diferencias significativas en el ADN polimórfico amplificado al azar de la planta original de *A. acutiloba* y las propagadas *in vitro*, lo que sugiere que no hubo cambios en la estructura y secuencia del ADN durante la propagación *in vitro*. Las similitudes genéticas de varias plantas del género *Angelica* fueron analizadas por el polimorfismo en la longitud de los fragmentos restringidos (RFLP) y RAPD. Los RFLP y RAPD de *A. sinensis* Diels fueron significativamente diferentes a los de *A. acutiloba*. Usando diez diferentes enzimas de restricción, no se observaron RFLP en las variedades de *A. acutiloba*. Por el análisis con RAPD, las variedades de *A. acutiloba* pueden ser clasificadas en dos subgrupos mayores. Las variedades de *A. acutiloba* Kitagawa en Japón y *Angelica spp* en el noreste de China exhiben una cercana relación genética entre ellas.

Hashmi *et al.* (1997), analizaron que las plantas de durazno [*Prunus persica* (L.) Batsch] producidas a partir de embriones regenerados a partir de callo de cultivo vegetal con variación somaclonal, con el fin de establecer si presentan variación genética. El análisis se realizó con ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD). Probaron 60 iniciadores de los cuales únicamente 35 produjeron fragmentos de ADN, un total de 418 bandas en geles de agarosa, 10 de los 35 (A03, A09, A18, A19, B03, B08, B09, C02, C03 y C04), revelaron polimorfismo para el total de genotipos estudiados. El estudio reveló la facilidad del uso de marcadores moleculares como el RAPD para la identificación de variantes somaclonales del durazno y aporta evidencias de que existen diferencias genéticas entre estas variantes somaclonales.

Goto *et al.* (1998), establecieron con la ayuda de ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD), la estabilidad genética de los brotes de pino negro japonés (*Pinus thunbergii* Parl.) con más de 10 años de cultivo *in vitro*. Fueron seis repeticiones de treinta brotes con las siguientes morfologías: individuos de agujas cortas medias y largas, fueron elegidos de manera aleatoria de un total de 4000 brotes micropropagados y regenerados de una planta madre resistente a nemátodos. Se probaron 126 iniciadores, 30 de ellos amplificaron 134 bandas las cuales fueron reproducibles. De un total de 4824 bandas obtenidas en el presente estudio, muestran que no existen aberraciones entre las bandas de los RAPD del material de la planta original y los brotes micropropagados. Los resultados obtenidos en el presente estudio establecen que el sistema de micropropagación es genéticamente estable.



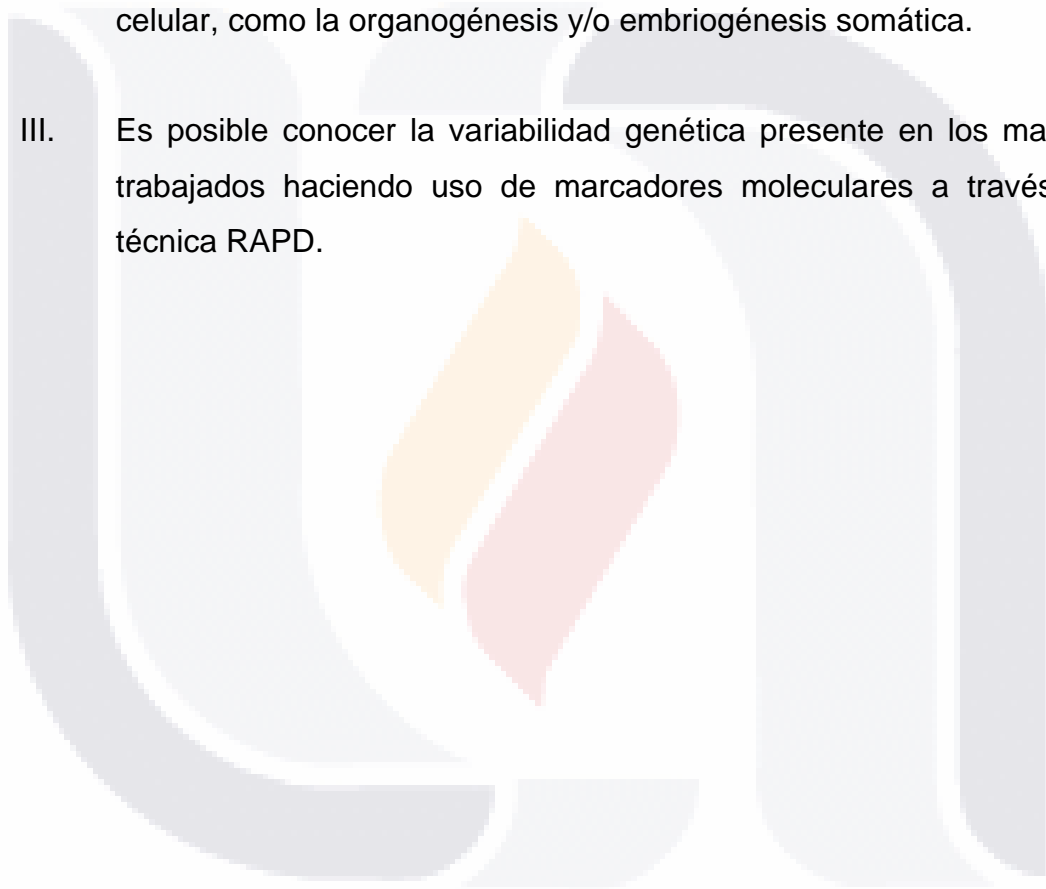
3. JUSTIFICACIÓN

Los agaves representan un recurso natural muy importante para nuestro país. Estas plantas tienen una gran cantidad de usos, tanto en la industria alimenticia, como forraje para el ganado, como fuente de fibras naturales y en la industria de las bebidas alcohólicas. Estas especies también tienen un alto valor ornamental y juegan un papel preponderante en muchos ecosistemas de nuestro país. A pesar de lo anterior, los agaves han sido poco estudiados en muchos aspectos, incluyendo el biotecnológico. Esto a pesar de que la Biotecnología puede contribuir a la resolución de varios de los problemas que afectan la producción de aquellas especies que tienen un uso industrial, y la supervivencia de aquellas especies silvestres que se encuentran amenazadas.

Por lo anterior, el presente proyecto pretende desarrollar herramientas biotecnológicas para el cultivo *in vitro* y mejoramiento de las especies *Agave cupreata*, *A. karwinskii*, *A. potatorum*, *A. difformis* y *A. obscura*; las tres primeras son utilizadas para la producción de mezcal en los Estados de Guerrero y Oaxaca, y las dos últimas tienen valor como ornamentales. Todas estas especies están siendo dañadas por la sobrecolecta de material silvestre y pronto podrían caer en la categoría de amenazadas. Estas herramientas permitirían su propagación masiva, constituirá un paso importante para su mejoramiento genético, y proporcionarían información preliminar acerca de cómo estudiar la variabilidad genética de las mismas. Además, debido a la carencia de estudios de este tipo con las especies seleccionadas, se generará conocimiento científico original, lo cual es un elemento esencial en un trabajo de tesis de Doctorado.

4. HIPÓTESIS

- I. Es posible propagar las especies seleccionadas de una forma eficiente a través del cultivo *in vitro* de tejidos meristemáticos.
- II. Es posible propagar algunas de las especies seleccionadas a través de sistemas *in vitro* que promuevan la dediferenciación y rediferenciación celular, como la organogénesis y/o embriogénesis somática.
- III. Es posible conocer la variabilidad genética presente en los materiales trabajados haciendo uso de marcadores moleculares a través de la técnica RAPD.



5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general:

Desarrollar sistemas biotecnológicos que permitan la propagación masiva y faciliten el mejoramiento, conservación y uso racional de varias especies del género *Agave*.

5.2. Objetivos particulares:

1. Seleccionar, obtener y establecer *in vitro* las especies a incluir en el proyecto.
2. Desarrollar sistemas eficientes para la propagación *in vitro* de las especies seleccionadas a través de la generación de brotes a partir de tejido meristemático.
3. Desarrollar sistemas para la regeneración *in vitro* de las especies seleccionadas a través de la organogénesis y/o embriogénesis somática.
4. Analizar mediante el uso de marcadores moleculares la variabilidad genética de las especies trabajadas.

6. METAS

Para el primer objetivo particular.

- 1.1. Se seleccionó una lista de las especies que fueron incorporadas al proyecto. Estas se seleccionaron tomando en cuenta los siguientes criterios:
 - a) Importancia debida a su uso o a su grado de amenaza.
 - b) Disponibilidad de material vegetal.
 - c) Ausencia de reportes en la literatura acerca de trabajos similares al que se propone.
- 1.2. Se tuvo el material vegetal necesario para establecer cultivos *in vitro* de las especies seleccionadas.
- 1.3. Se obtuvieron cultivos *in vitro* axénicos y vigorosos de las especies seleccionadas.

Para el segundo objetivo particular:

- 2.1. Se conoció la respuesta de meristemas basales de las especies seleccionadas ante medios de cultivo y tratamientos diseñados para estimular la generación de brotes. Con base en estos experimentos, se estableció un tratamiento eficiente para la generación de brotes en cada una de las especies trabajadas.
- 2.2. Se desarrollaron protocolos eficientes para el crecimiento de los brotes generados.
- 2.3. Se desarrollaron protocolos eficientes para la adaptación y transferencias a suelo de las plántulas generadas *in vitro*.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Para el tercer objetivo particular:

- 3.1. Se conoció la respuesta de explantes de las especies seleccionadas ante medios, tratamientos y condiciones de cultivo diseñadas para inducir la organogénesis directa.
- 3.2. Se conoció la respuesta de explantes de las especies seleccionadas ante medios, tratamientos y condiciones de cultivo diseñadas para inducir la producción de tejido calloso.
- 3.3. Se conoció las características y dinámicas de crecimiento de las líneas de tejido calloso generado.
- 3.4. Se conoció el potencial organogénico del tejido calloso generado al transferirlo a medios y tratamientos diseñados con este fin.

Para el cuarto objetivo particular:

- 4.1. Se seleccionó una técnica para la extracción de ADN a partir de tejidos de las cinco especies incluidas en el proyecto. Además se incluyeron en el análisis otras 9 especies de *Agave* mantenidas en el Banco de Germoplasma *in vitro* del Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad Autónoma de Aguascalientes, así como una especie de cactácea como testigo.
- 4.2. Se establecieron las condiciones óptimas para el análisis del ADN obtenido a través de la técnica RAPD, seleccionando los decámetros que produjeron el mayor número de bandas polimórficas. Se obtuvieron los patrones de bandas generados por la técnica RAPD de muestras tomadas de los materiales cultivados *in vitro*.
- 4.3. Se conoció, a través de la técnica mencionada, la variabilidad genética presente en el material cultivado *in vitro*.

7. METODOLOGÍA

De acuerdo a las metas antes descritas, la metodología propuesta es:

1.1. Se seleccionaron las especies de *Agave* usando los siguientes criterios:

- a) Importancia debido a su uso o a su grado de amenaza.
- b) Disponibilidad de material vegetal.
- c) Ausencia de reportes en la literatura acerca de trabajo similares al que se propone.

De acuerdo con estos criterios, las especies seleccionadas son: *Agave cupreata*, *A. karwinskii*, *A. potatorum*, *A. difformis* y *A. obscura*. Su inclusión en el trabajo dependió de la obtención del material vegetal necesario.

1.2. Se realizaron las gestiones necesarias para tener el material vegetal suficiente para establecer el cultivo *in vitro*, axénico y vigoroso de las especies seleccionadas, para el caso de *A. cupreata* las semillas se obtuvieron de cápsulas colectadas en el estado de Guerrero (figura 2a).

1.3. Establecimiento de las especies *in vitro* a incluidas en el proyecto, a partir de la desinfección y germinación *in vitro* de semillas. El proceso de desinfección se realizó con lavados sucesivos con detergente, después se mantuvieron en hipoclorito de sodio, y un agente antifúngico. Se enjuagaron con agua destilada en el ambiente de la campana de flujo laminar, en estas condiciones se colocaron en el medio MS.

2.1. Se desarrollaron series de experimentos para conocer la respuesta de meristemas basales de las especies seleccionadas, ante medios de cultivo y tratamientos para la generación de brotes. Las variables a probar fueron tipo de explante y el tipo y concentración de citocinina (Cuadros 3-7). La respuesta a

evaluar fue el número y grado de diferenciación de los brotes generados por explante. Para decidir que tratamiento es el más eficiente para la generación de brotes en cada una de las especies trabajadas se realizaron los análisis estadísticos pertinentes (ANDEVA y comparaciones de medias).

2.2. Se desarrollaron protocolos eficientes para el crecimiento de los brotes generados, por lo general los brotes que se obtienen son pequeños en la mayoría de los casos carentes de raíz, por lo que se generaron las condiciones adecuadas con reguladores de crecimiento vegetal, medio y factores ambientales para su desarrollo y adaptación (figura 3).

2.3. Se desarrollaron protocolos eficientes para la adaptación y transferencias a suelo de las plántulas generadas *in vitro*, primero se aflojó la tapa del recipiente donde estaban contenidas, posteriormente se trasladaron a una cámara bioclimática, para que finalmente fueran llevadas a un recipiente con una mezcla de suelo adecuada para este tipo de plantas.

3.1. Se desarrollaron series de experimentos para conocer la respuesta de explantes ante medios, tratamientos con auxinas solas o combinadas con citocininas y condiciones de cultivo para inducir la formación de tejido calloso, se probaron distintas concentraciones y combinaciones de BA y 2,4-D [(ácido 2,4-dichlorofenoxiacético) 0.5:1, 1:0.5, 1:1, 2:1 y 1:2 mgL⁻¹], a explantes de hojas de las distintas especies utilizadas en el trabajo.

3.2. Se transfirió el tejido calloso a medio MS sin reguladores de crecimiento para conocer el potencial organogénico del tejido calloso generado.

3.3. Se transfirió el tejido calloso a medio MS sin reguladores de crecimiento para conocer el potencial embriogénico del tejido calloso generado.

4.1. Se revisó, seleccionó una técnica para la extracción de ADN a partir de tejidos de las especies incluidas en el proyecto, así como otras 9 mantenidas *in vitro*. Las especies de *Agave* estudiadas en este punto fueron:

- A. bracteosa*
- A. chiapensis*
- A. cupreata*
- A. difformis*
- A. karwinskii*
- A. nizandensis*
- A. obscura*
- A. ornithobroma*
- A. palmeri*
- A. peacockii*
- A. potatorum*
- A. salmiana*
- A. titanota*
- A. victoria-reginae*

Se incluyó además una cactácea (*Turbinicarpus* sp.) como testigo.

4.1.1. Se generó un protocolo que reunió las condiciones óptimas para el análisis del ADN obtenido a través de la técnica RAPD.

Para conocer la concentración de ADN se utilizó la siguiente relación:

$[ADN] = 50 \mu\text{g/mL} * \lambda_{260} * \text{el Fact. de Diluc.}$ el Fact. de Diluc. = 10 μL de muestra de ADN en 490 μL de agua desionizada estéril.

$[Agave cupreata] = (50 \mu\text{g/mL}) (0.1599) (50) = 399.75 \mu\text{g/mL} \therefore 399.75 \text{ ng}/\mu\text{L}$.

Para realizar la PCR se requiere una dilución de 100 $\text{ng}/\mu\text{L}$ entonces se requiere llevar la concentración obtenida a ésta concentración y por una regla de tres se realiza la conversión;

399.75 ng/ μ L ————— 1 μ L

100.00 ng/ μ L ————— X X = 0.250 μ L

Nota. Como la cantidad de muestra es muy pequeña se realiza una dilución 1/10, para este caso particular la dilución se llevó a 50 μ L por lo que se tomó 5 μ L de la muestra original de ADN de las especies de *Agave* y 45 μ L del agua del kit. Por lo tanto se tomó 2.5 μ L de la muestra diluida para realizar el RAPD. Para preparar la solución para el RAPD se toma 5 μ L de los oligos (cebadores), 12.5 μ L de la mezcla (dNTPs redTaq polimerasa) + muestra de ADN + agua del kit, con el agua se afora a 25 μ L. Para el caso de *Agave cupreata* = 5 μ L + 12.5 μ L de la mezcla + 2.5 ADN + 5 μ L agua del kit.

4.2. A partir del análisis del ADN con la técnica RAPD, se obtuvieron los patrones de bandas en gel de agarosa, de las muestras tomadas antes y después del proceso de cultivo y propagación *in vitro*, los cuales se convirtieron en matrices binarias de ceros y unos para su análisis estadístico, para dicho propósito, se utilizaron los programas Arlequín, S-plus y Statistical.

4.3 A través de la técnica RAPD, se estableció la variabilidad genética presente en el material generado a través de las diferentes técnicas de cultivo *in vitro*. Con los resultados obtenidos del análisis RAPD, se establecieron la diversidad genética de las especies seleccionadas y su relación taxonómica.

8. RESULTADOS

8.1. Obtención de material vegetal y establecimiento *in vitro* de las especies seleccionadas.

Las semillas de *A. cupreata* fueron obtenidas de cápsulas colectadas en la localidad de la Cienega, ubicada a tres kilómetros al suroeste de Chilpancingo, capital del estado de Guerrero (figura 2), las semillas del resto de las especies fueron adquiridas con proveedores. El porcentaje de contaminación de las semillas fue inferior a 20 %. Los porcentajes de germinación *in vitro* fueron de 68, 66, 63, 100 y 60 % para *Agave cupreata*, *A. difformis*, *A. karwinskii*, *A. obscura* y *A. potatorum*, respectivamente. A los 30-45 d se tenían ya plántulas de 3-6 cm, las cuales sirvieron como fuente de explantes para los experimentos siguientes (figura 2c).

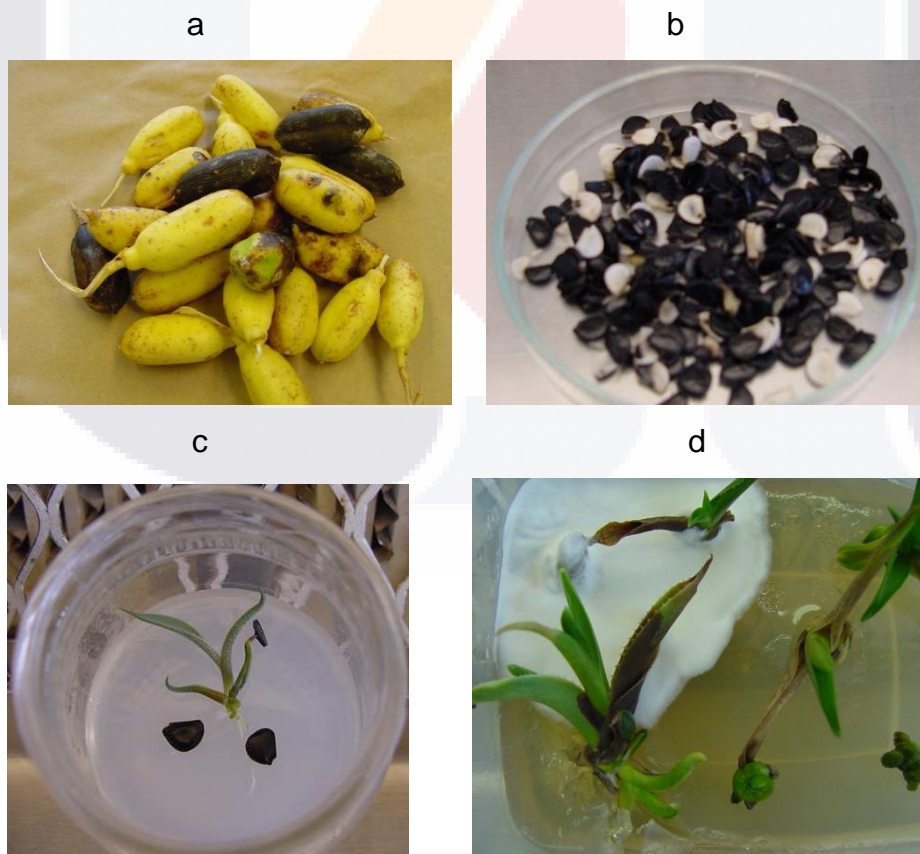


Figura 2. a) Cápsulas, b) semillas, c) germinación y d) contaminación de plántulas de *A. cupreata*.

8.2. Desarrollo de sistemas para la propagación *in vitro* de las especies seleccionadas a través de la generación de brotes a partir de tejido meristemático.

Los explantes basales tomados de las plántulas germinadas *in vitro* generaron brotes múltiples en la mayoría de tratamientos con citocininas. *A. cupreata* generó brotes en todos los tratamientos con BA, 2iP, Cin y TDZ (Figura 3a), pero no respondió a la MT. Los mejores tratamientos fueron 1.5 mg L⁻¹ de BA, con un promedio de 10.5 brotes por explante; y 2.0 mg L⁻¹ de 2iP, con 10.0 brotes por explante (Cuadro 3). Como los brotes más vigorosos fueron los obtenidos con BA, ésta puede ser la citocinina más recomendable para esta especie.

Para *A. difformis* el mejor tratamiento fue 0.2 mg L⁻¹ de TDZ, con un promedio de 8.5 brotes por explante, aun cuando 2iP a 2 mg L⁻¹ y MT a 0.5 mg L⁻¹ generaron resultados estadísticamente similares (Figura 3b y Cuadro 4). Esta especie generó brotes con las cinco citocininas probadas, pero los tratamientos con BA indujeron 30 % de brotes hiperhidratados que fueron incapaces de enraizar y sobrevivir a la transferencia a suelo. Es decir, la BA no es una citocinina recomendable para esta especie.

En *A. karwinskii* se observó respuesta muy pobre a la Cin y a la MT, mientras que con BA los resultados fueron más satisfactorios, en particular con la concentración de 1 mg L⁻¹ que dio un promedio de 6.1 brotes por explante; algunos tratamientos con 2iP indujeron valores inferiores, pero estadísticamente similares a este tratamiento. Además, el vigor de los brotes generados con BA fue mayor que con las otras citocininas (Figura 3c y Cuadro 5).

La especie *A. obscura* produjo el mayor número de brotes por explante con el tratamiento con 0.2 mg L^{-1} de TDZ, con un promedio de 11 brotes. Los tratamientos con 0.1 mg L^{-1} de TDZ y 0.5 y 2.0 mg L^{-1} de MT generaron resultados estadísticamente similares (Figura 3d y Cuadro 6). También en esta especie se observó una respuesta positiva a todas las citocininas probadas.

El tratamiento con 3.0 mg L^{-1} de Cin propició el mayor número de brotes por explante en *A. potatorum*, con un promedio de 6.9 similar al promedio obtenido con 1.5 mg L^{-1} de 2iP (Figura 3e y Cuadro 7). Esta especie dio respuesta nula al TDZ en todas las concentraciones probadas, y la MT generó una cantidad escasa de brotes y todos hiperhidratados.

Las citocininas MT y TDZ, aunque generaron resultados heterogéneos, ya que generaron resultados eficientes en algunas especies y en otras no, se reportan por primera vez para la generación de brotes múltiples para explantes de especies de *Agave* (figura 4).

Cuadro 3. Efecto del tipo de citocininas probadas en la generación de brotes a través de la activación de meristemos basales en *Agave cupreata*.

Citocinina (mg L ⁻¹)					Brotos por Explante ($\bar{x} \pm ES$)*
BA	2iP	CIN	TDZ	MT	
0.5	-	-	-	-	2.38 ± 0.68 deefghi
1.0	-	-	-	-	6.88 ± 1.52 bcd
1.5	-	-	-	-	10.50 ± 1.75 a
2.0	-	-	-	-	8.50 ± 0.87 abc
3.0	-	-	-	-	1.63 ± 0.42 ghi
-	0.5	-	-	-	2.50 ± 0.66 defgh
-	1.0	-	-	-	3.25 ± 0.94 bcd
-	1.5	-	-	-	5.13 ± 0.97 bcd
-	2.0	-	-	-	10.00 ± 1.58 ab
-	3.0	-	-	-	4.75 ± 0.88 bcde
-	-	1.0	-	-	3.13 ± 0.77 cdfgh
-	-	1.5	-	-	3.25 ± 0.80 cdefg
-	-	2.0	-	-	4.00 ± 0.78 cdef
-	-	3.0	-	-	4.75 ± 0.80 bcde
-	-	-	0.1	-	1.75 ± 0.56 efghi
-	-	-	0.2	-	8.38 ± 2.34 abc
-	-	-	0.3	-	7.50 ± 2.08 abcd
-	-	-	0.4	-	2.63 ± 0.73 defgh
-	-	-	-	0.5	0.00 ± 0.00 i
-	-	-	-	1.0	0.00 ± 0.00 i
-	-	-	-	1.5	0.25 ± 0.25 hi
-	-	-	-	2.0	0.00 ± 0.00 i

* Las medias seguidas por la misma letra no son diferentes de acuerdo a la prueba de Tukey (0.05).

Cuadro 4. Efecto del tipo de citocininas probadas en la generación de brotes a través de la activación de meristemos basales en *Agave difformis*.

Citocinina (mg L ⁻¹)					Brotos por Explante ($\bar{x} \pm ES$)*
BA	2iP	CIN	TDZ	MT	
0.5	-	-	-	-	1.63 ± 0.50 efg
1.0	-	-	-	-	6.38 ± 0.68 abcd
1.5	-	-	-	-	3.63 ± 0.50 cdefg
2.0	-	-	-	-	3.13 ± 0.30 defg
3.0	-	-	-	-	2.13 ± 0.40 efg
-	0.5	-	-	-	0.13 ± 0.13 e
-	1.0	-	-	-	2.00 ± 0.38 efg
-	1.5	-	-	-	4.00 ± 0.38 cdef
-	2.0	-	-	-	7.88 ± 0.72 ab
-	3.0	-	-	-	1.88 ± 0.40 efg
-	-	1.0	-	-	0.63 ± 0.42 fg
-	-	1.5	-	-	0.25 ± 0.16 fg
-	-	2.0	-	-	0.63 ± 0.42 fg
-	-	3.0	-	-	0.38 ± 0.26 fg
-	-	-	0.1	-	5.00 ± 1.36 abcde
-	-	-	0.2	-	8.50 ± 1.57 a
-	-	-	0.3	-	4.63 ± 1.31 bcde
-	-	-	0.4	-	7.00 ± 2.18 abc
-	-	-	-	0.5	7.25 ± 1.93 g
-	-	-	-	1.0	0.00 ± 0.00 g
-	-	-	-	1.5	1.63 ± 0.80 efg
-	-	-	-	2.0	0.13 ± 0.13 g

* Las medias seguidas por la misma letra no son diferentes de acuerdo a la prueba de Tukey (0.05).

Cuadro 5. Efecto del tipo de citocininas probadas en la generación de brotes a través de la activación de meristemos basales en *Agave karwinskii*.

Citocinina (mg L ⁻¹)					Brotos por Explante ($\bar{x} \pm ES$)*
BA	2iP	CIN	TDZ	MT	
0.5	-	-	-	-	1.00 ± 0.42 hi
1.0	-	-	-	-	6.13 ± 1.38 a
1.5	-	-	-	-	2.38 ± 0.60 cdef
2.0	-	-	-	-	1.88 ± 0.44 defg
3.0	-	-	-	-	1.25 ± 0.41 fgh
-	0.5	-	-	-	3.88 ± 0.79 abcd
-	1.0	-	-	-	2.63 ± 0.57 cdef
-	1.5	-	-	-	3.38 ± 0.53 abcde
-	2.0	-	-	-	4.63 ± 0.98 ab
-	3.0	-	-	-	0.00 ± 0.00 i
-	-	1.0	-	-	0.00 ± 0.00 i
-	-	1.5	-	-	0.00 ± 0.00 i
-	-	2.0	-	-	0.00 ± 0.00 i
-	-	3.0	-	-	3.88 ± 1.06 abcd
-	-	-	0.1	-	1.38 ± 0.65 efgh
-	-	-	0.2	-	3.13 ± 0.85 abcdef
-	-	-	0.3	-	2.75 ± 0.84 cdef
-	-	-	0.4	-	1.00 ± 0.42 hi
-	-	-	-	0.5	2.25 ± 0.90 cdefg
-	-	-	-	1.0	0.00 ± 0.00 i
-	-	-	-	1.5	0.00 ± 0.00 i
-	-	-	-	2.0	0.00 ± 0.00 i

* Las medias seguidas por la misma letra no son diferentes de acuerdo a la prueba de Tukey (0.05).

Cuadro 6. Efecto del tipo de citocininas probadas en la generación de brotes a través de la activación de meristemos basales en *Agave obscura*.

Citocinina (mg L ⁻¹)					Brotos por Explante ($\bar{x} \pm ES$)*
BA	2iP	CIN	TDZ	MT	
0.5	-	-	-	-	3.13 ± 0.64 bcde
1.0	-	-	-	-	4.75 ± 0.56 cde
1.5	-	-	-	-	2.23 ± 0.53 def
2.0	-	-	-	-	1.13 ± 0.40 ghi
3.0	-	-	-	-	1.50 ± 0.42 efgh
-	0.5	-	-	-	0.13 ± 0.13 i
-	1.0	-	-	-	1.38 ± 0.38 efgh
-	1.5	-	-	-	6.63 ± 0.73 bcd
-	2.0	-	-	-	4.13 ± 0.40 cdef
-	3.0	-	-	-	2.25 ± 0.56 bcde
-	-	1.0	-	-	4.25 ± 0.53 cde
-	-	1.5	-	-	2.13 ± 0.58 defg
-	-	2.0	-	-	5.38 ± 1.51 bcde
-	-	3.0	-	-	7.63 ± 1.36 abcd
-	-	-	0.1	-	8.63 ± 1.92 ab
-	-	-	0.2	-	11.00 ± 2.24 a
-	-	-	0.3	-	5.13 ± 1.59 bcde
-	-	-	0.4	-	5.63 ± 2.13 bcde
-	-	-	-	0.5	7.23 ± 2.00 abcd
-	-	-	-	1.0	4.75 ± 1.51 cde
-	-	-	-	1.5	2.25 ± 1.26 def
-	-	-	-	2.0	7.88 ± 3.39 abc

* Las medias seguidas por la misma letra no son diferentes de acuerdo a la prueba de Tukey (0.05).

Cuadro 7. Efecto del tipo de citocininas probadas en la generación de brotes a través de la activación de meristemos basales en *Agave potatorum*.

Citocinina (mg L ⁻¹)					Brotos por Explante
BA	2iP	CIN	TDZ	MT	($\bar{x} \pm ES$) [*]
0.5	-	-	-	-	2.13 ± 0.55 de
1.0	-	-	-	-	5.00 ± 1.21 abcd
1.5	-	-	-	-	3.38 ± 0.53 abcde
2.0	-	-	-	-	2.00 ± 0.46 bcd
3.0	-	-	-	-	2.38 ± 0.57 abcd
-	0.5	-	-	-	2.00 ± 0.54 de
-	1.0	-	-	-	2.88 ± 0.55 bcde
-	1.5	-	-	-	6.38 ± 1.27 ab
-	2.0	-	-	-	5.75 ± 1.05 abc
-	3.0	-	-	-	2.88 ± 0.55 bcde
-	-	1.0	-	-	1.00 ± 0.42 d
-	-	1.5	-	-	1.63 ± 0.53 de
-	-	2.0	-	-	1.38 ± 0.56 e
-	-	3.0	-	-	6.88 ± 1.33 a
-	-	-	0.1	-	0.00 ± 0.00 e
-	-	-	0.2	-	0.00 ± 0.00 e
-	-	-	0.3	-	0.00 ± 0.00 e
-	-	-	0.4	-	0.00 ± 0.00 e
-	-	-	-	0.5	0.00 ± 0.00 e
-	-	-	-	1.0	0.75 ± 0.75 e
-	-	-	-	1.5	0.38 ± 0.38 e
-	-	-	-	2.0	0.00 ± 0.00 e

* Las medias seguidas por la misma letra no son diferentes de acuerdo a la prueba de Tukey (0.05).



Figura 3. Generación de brotes sobre explantes basales cultivados en medio con citocininas (Izquierda), brotes separados del explante original antes de su transferencia a medio de enraizamiento (Centro) y brotes ya enraizados *in vitro* y listos para su transferencia a suelo (Derecha). a) *Agave cupreata*, b) *A. difformis*, c) *A. karwinskii*, d) *A. obscura*, y e) *A. potatorum*.



Figura 4. Arriba a la izquierda, brotes de *A. cupreata* generados con 0.2 mgL^{-1} de TDZ; arriba a la derecha, brotes de *A. karwinskii* generados con 0.4 mgL^{-1} de TDZ; abajo a la izquierda, brotes de *A. obscura* generados con 2.0 mgL^{-1} de MT; abajo a la derecha, brotes de *A. potatorum* generados con 1.5 mgL^{-1} de MT.

El enraizamiento de los brotes generados se logró en medio basal sin reguladores del crecimiento, con eficiencias de 80 a 100 % (Cuadro 7). Apparently, las citocininas usadas para generar brotes no afectaron su capacidad de enraizamiento. Sin embargo, en *A. obscura* los brotes generados con BA y transferidos a medio sin reguladores del crecimiento para su enraizamiento, siguieron generando más brotes al mismo tiempo que producían raíz. Esto parece indicar que en esta especie la BA tiene una fuerte actividad residual, la cual no afecta la capacidad de enraizamiento. En todos los casos los sistemas radicales

generados en el medio sin reguladores del crecimiento fueron vigorosos (Figura 3).

En cuanto a la supervivencia en invernadero de las plantas generadas *in vitro*, varió de 53 a 100 % (Figuras 5, 6 y Cuadro 8). Los valores más bajos de supervivencia tal vez se podrían incrementar con otros sustratos ya que los requerimientos de las plantas en este sentido pueden variar entre especies en función de las condiciones del hábitat natural de cada una. La totalidad de las plantas que sobrevivieron al proceso de adaptación al medio externo continúan vivas un año después, y muestran un crecimiento vigoroso *ex vitro*.

Cuadro 8. Enraizamiento en medio MS basal de los brotes obtenidos de cinco especies de *Agave*, y supervivencia de plántulas en suelo.

Especie	Enraizamiento* (%)	Sobrevivencia en suelo** (%)
<i>Agave cupreata</i>	93 ab	53 b
<i>Agave difformis</i>	100 a	73 ab
<i>Agave karwinskii</i>	80 b	60 ab
<i>Agave obscura</i>	100 a	100 a
<i>Agave potatorum</i>	87 ab	73 ab

Medias con letras iguales en una misma columna no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05).

* Medida a los 30 d de incubación en medio sin reguladores del crecimiento. ** Medida entre 30 y 45 d después de la transferencia *ex vitro*.



Figura 5. Plantas generadas *in vitro* creciendo ya en invernadero cuatro meses después de su transferencia a suelo. a) *Agave cupreata*, b) *A. difformis*, c) *A. karwinskii*, d) *A. obscura*, y e) *A. potatorum*.



Figura 6. Plantas generadas *in vitro* creciendo ya en invernadero ocho meses después de su transferencia a suelo. a) *Agave cupreata*, b) *A. difformis*, c) *A. karwinskii*, d) *A. obscura*, y e) *A. potatorum*.

8.3. Desarrollo de sistemas para la regeneración *in vitro* de las especies seleccionadas a través de la organogénesis y/o embriogénesis somática.

Para desarrollar sistemas de regeneración *in vitro* a través de organogénesis y/o embriogénesis somática, se probaron distintas concentraciones y combinaciones de BA y 2,4-D (ácido 2,4-dichlorofenoxiacético), se utilizaron como explantes las hojas de las plántulas cuyos meristemas basales se sometieron a tratamientos con citocininas para la generación de brotes. Todas las especies generaron tejido calloso, se produjo dos tipos de tejido calloso; uno de aspecto compacto de color

verde y otro de aspecto friable de color amarillento a blanco, el tejido calloso, el tejido calloso se subcultivó cada 15 d a medio MS con la misma combinación y concentración de reguladores de crecimiento vegetal en la mayoría de las especies después de uno o dos subcultivo, empezó a necrosarse y no produjo organogénesis ni embriogénesis somática, únicamente *A. cupreta* en medio MS adicionado con 1 mgL^{-1} de BA más 1 mgL^{-1} de 2,4-D, produjo organogénesis indirecta (figura 7).

El tejido calloso que fue transferido a medio MS sin reguladores de crecimiento para conocer su potencial organogénico, después de dos o tres subcultivos, se necrosó y no produjo resultados.

El tejido calloso que fue transferido a medio MS sin reguladores de crecimiento, para conocer su potencial embriogénico, después de que se subcultivó por dos o tres ocasiones, paulatinamente fue perdiendo vigor, se necrosó, hasta que finalmente murió sin producir los resultados esperados.

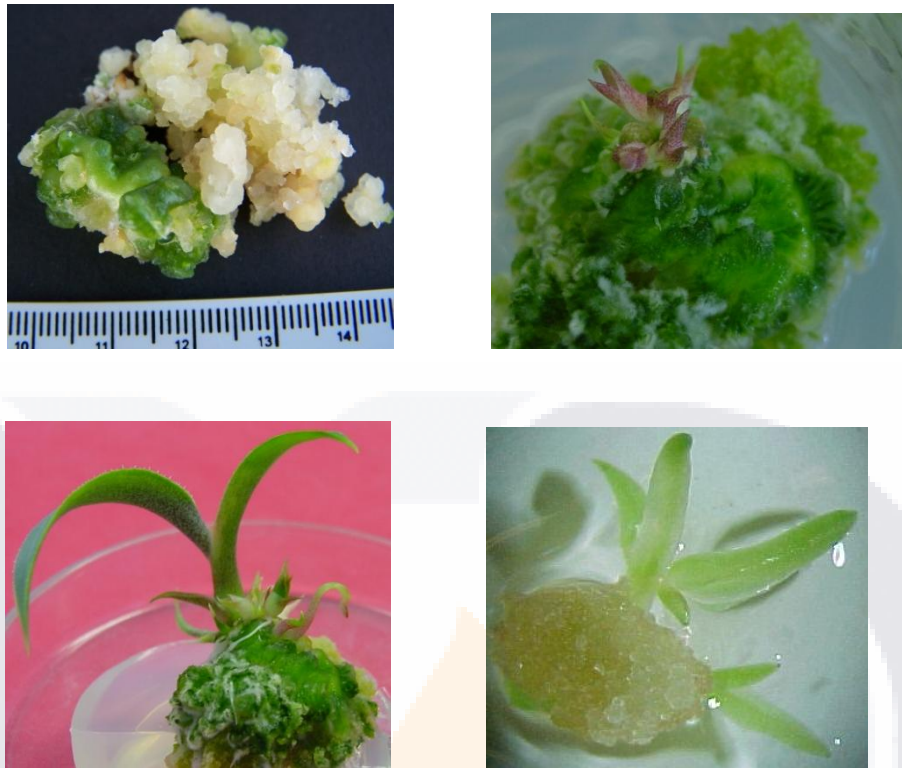


Figura 7. *A. cupreata*; organogénesis indirecta en medio MS adicionado con 1 mgL⁻¹ de BA más 1 mgL⁻¹ de 2,4-D.

8.4. Análisis de la variabilidad genética de las especies trabajadas mediante el uso de marcadores moleculares.

Para la extracción del ADN se ensayaron varios protocolos, pero el que mejores resultados brindó fue el protocolo propuesto por Keb-Llanes *et al* (2002), se utiliza 300 mg de tejido vegetal, el cual se sometió a todo el proceso de extracción que indica el protocolo (anexo 1), una vez concluido el procedimiento, la pastilla obtenida para cada muestra se resuspendió en 30 microlitros de agua desionizada estéril y se almacenó cada muestra a 4 °C. Una vez obtenido el ADN de cada una de las especies, se evaluó para cada muestra el grado de integridad, pureza y cantidad de ADN en cada una de ellas. La determinación de la integridad del ADN se realizó por medio de electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en buffer TAE 1X.

Se corrió una muestra de 5 microlitros de la solución de ADN diluida en agua desionizada, de cada una de las especies a 50 V durante una hora. El gel se reveló con bromuro de etidio durante 1.5 minutos y se eliminó el exceso de bromuro de etidio con TAE 1X lavándolo por 10 minutos. El gel se observó en un transiluminador con luz UV para observar la banda del ADN genómico (figura 8). Para establecer la pureza y cantidad de ADN, se utilizó un espectrofotómetro UV/VIS con el que se obtuvo la absorbancia a una longitud de onda de 260 nm, la pureza del ADN se estableció mediante la relación entre la absorbancia a 260 nm y la absorbancia a 280 nm, cuando la relación se encuentra en el rango de 1.7 a 2.0 se considera que el ADN es puro, cuando el valor sale de este rango se considera que la muestra está aun contaminada (cuadro 9).

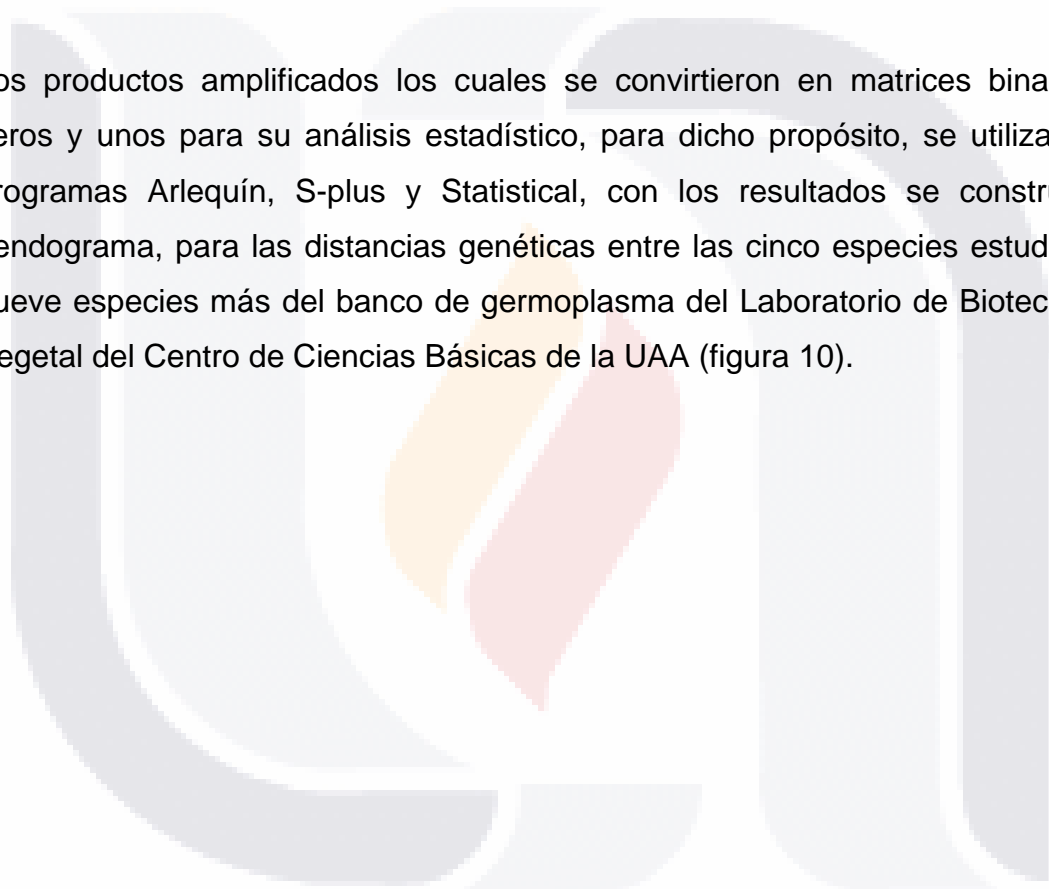
Cuadro 9. Resultados de las absorbencias del ADN, de las especies estudiadas.

Especie	λ_{310}	λ_{280}	λ_{260}	$\lambda_{260}/\lambda_{280}$	$\lambda_{310}/\lambda_{260}$
<i>Agave cupreata</i>	0.0238	0.0826	0.1599	1.9358	0.1488
<i>Agave difformis</i>	0.0615	0.0400	0.0564	1.4100	1.0904
<i>Agave karwinskii</i>	0.0192	0.0488	0.0755	1.5471	0.2543
<i>Agave obscura</i>	0.0367	0.1314	0.2452	1.8660	0.1496
<i>Agave potatorum</i>	0.0386	0.0476	0.0935	1.9642	0.4128

El proceso de amplificación se realizó en un termociclador, el que se programó para 45 ciclos con las siguientes condiciones de reacción; desnaturalización 94 °C un minuto, alineamiento 36 °C 1 minuto y síntesis 72 °C 2 minutos. La electroforesis se realizó en un gel de agarosa al 1.4% en TAE 1X. Se cargaron en el gel 12.5 microlitros de cada reacción, también se cargó un marcador de peso molecular (PCR marker No. P9577 de SIGMA). Se corrió cada gel a 50 V durante 2 horas. Una vez transcurrido el tiempo de corrimiento del gel, se tiñó con bromuro de etidio durante 5 minutos y se le quitó el exceso de de bromuro con TAE 1X

durante 15 a 20 minutos, después se observó en el transiluminador con luz UV para observar las bandas que amplificaron. Los geles se digitalizaron para analizarlos. Las bandas del análisis RAPD se numeraron en orden ascendente hasta la banda de menor peso molecular. Se asumió que las bandas con el mismo peso molecular en individuos diferentes fueron idénticas. Para cada individuo, la presencia o ausencia de cada banda se determinó designándose 1 a la presencia y 0 a la ausencia (figura 9).

Los productos amplificados los cuales se convirtieron en matrices binarias de ceros y unos para su análisis estadístico, para dicho propósito, se utilizaron los programas Arlequín, S-plus y Statistical, con los resultados se construyó un dendograma, para las distancias genéticas entre las cinco especies estudiadas y nueve especies más del banco de germoplasma del Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Centro de Ciencias Básicas de la UAA (figura 10).



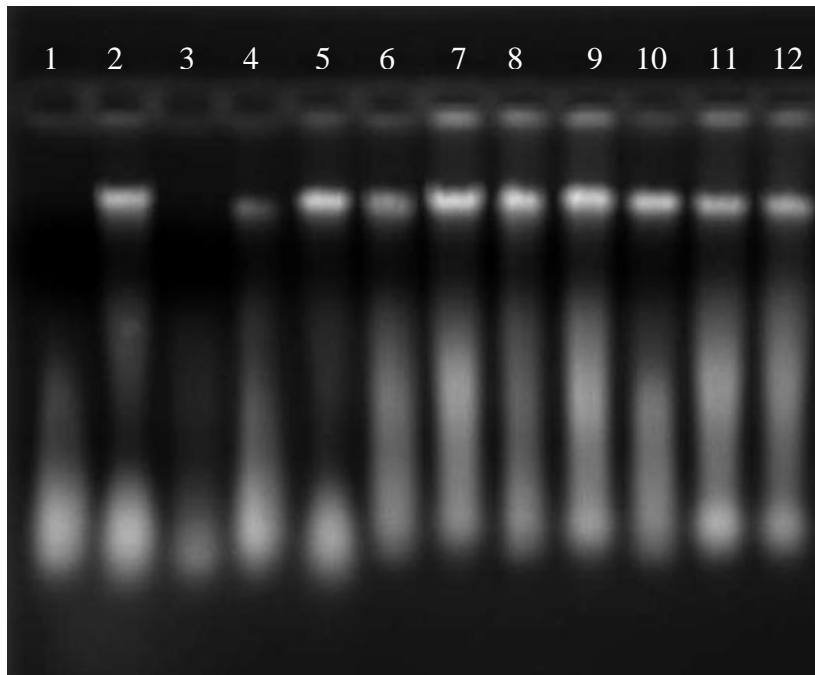


Figura 8. Gel de agarosa para determinar la integridad del ADN de las especies consideradas en el proyecto. Carril 1: *Agave cupreata**, carril 2: *A. difformis**, carril 3: *A. karwinski**, carril 4: *A. obscura**, carril 5: *A. potatorum**, carril 6: *A. cupreata***, carril 7: *A. difformis***, carril 8: *A. karwinski***, carril 9: *A. obscura***, carril 10: *A. potatorum***, carril 11: *A. difformis**, carril 12: *A. cupreata**

* Antes del subcultivo con reguladores de crecimiento vegetal

** Después del subcultivo con reguladores de crecimiento vegetal



Figura 9. Gel de agarosa para visualizar las amplificaciones por PCR de los RAPDs en el ADN de las especies consideradas en el proyecto. Carril 1 Marcador de peso molecular(8 bandas de 50 a 2000 pb); del carril 2-6 *Agave cupreata* con los oligos OPA 2,3,4,10 y13 respectivamente; del carril 7-11, *A. difformis* con los oligos OPA 2,3,4,10 y13 respectivamente; del carril 12-16 *A. karwinskii* con los oligos OPA 2,3,4,10 y13 respectivamente; carril 17 marcador de peso molecular Carril 18 marcador de peso molecular; del carril 19-23 *A. obscura* con los oligos OPA 2,3,4,10 y13 respectivamente; del carril 24-28 *A. potatorum* con los oligos OPA 2,3,4,10 y13 respectivamente; del carril 29-33 *Turbinicarpus schmiedickeanus* var. *schwarzii* con los oligos OPA 2,3,4,10 y13 respectivamente; carril 34 marcador de peso molecular.

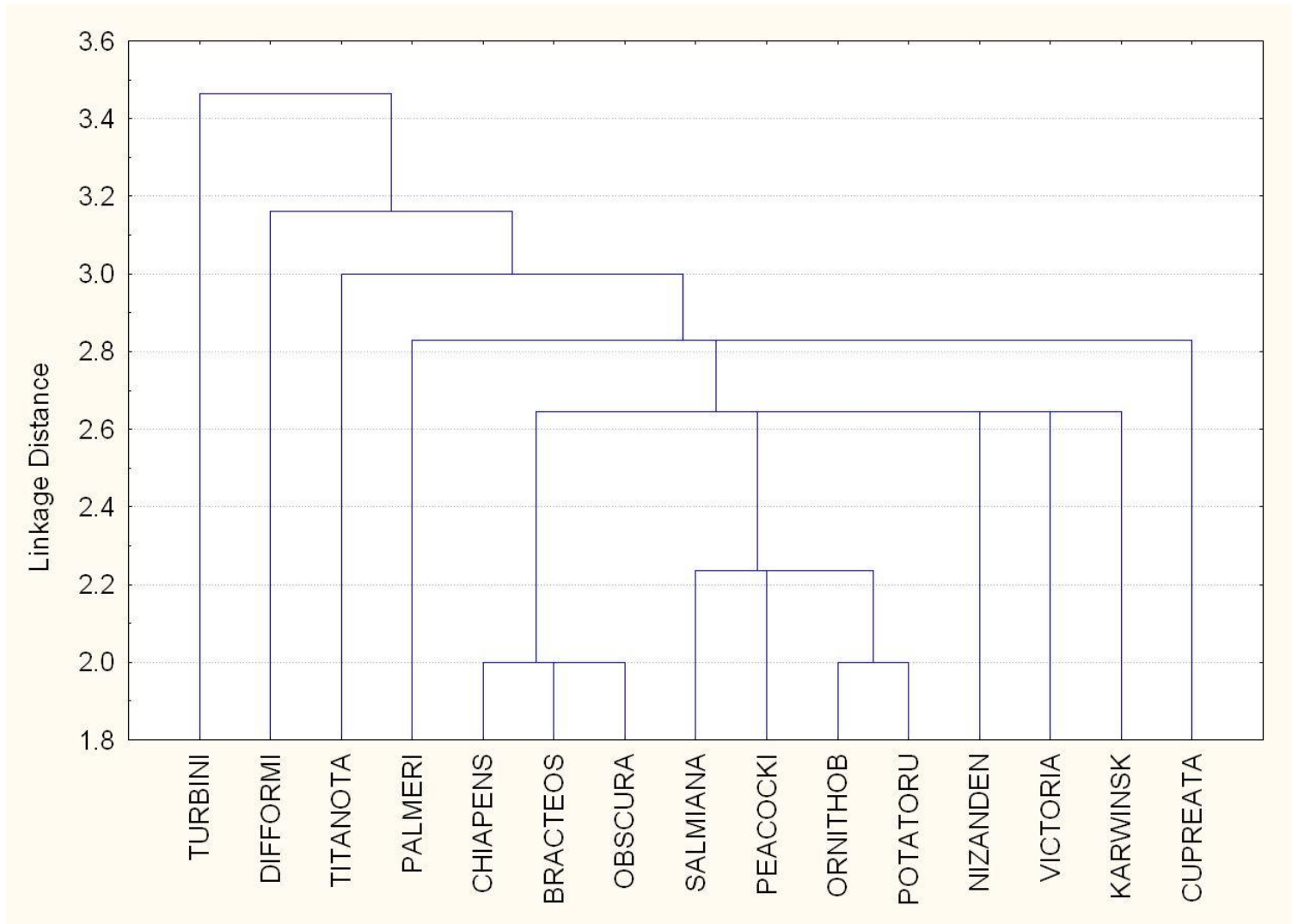


Figura 10. Dendrograma de catorce especies de *Agave*, que muestra la distancia taxonómica media, distribuida en cuatro grupos.

9. DISCUSIÓN

Se probaron diferentes tratamientos de reguladores de crecimiento vegetal para las cinco especies seleccionadas, los tratamientos se diseñaron a partir de cinco citocininas (BA, 2iP, CIN, TDZ y MT) y cuatro concentraciones distintas para cada una de ellas. De los tratamientos con reguladores de crecimiento vegetal (citocininas, para activar los meristemos basales), probados para *Agave cupreata*, después de realizarles el análisis de varianza y la comparación de medias por el método de Tukey, el mejor tratamiento resultó ser 1.5 mg L⁻¹ de BA, con un promedio de 10.5 brotes por explante, el tratamiento que generó el menor número de brotes por explante fue 1.5 mg L⁻¹ de MT con un promedio 0.25 brotes por explante. Para *Agave difformis*, el tratamiento que mejores resultados proporcionó fue 0.2 mg L⁻¹ de TDZ con un promedio de 8.5 brotes por explante, el tratamiento con menor número de brotes por explante fue la concentración de 2.0 mg L⁻¹ de MT, con un promedio de brotes por explante de 0.13. El mayor número de brotes por explante, para *Agave karwinskii* se generó con la concentración de 1.5 mg L⁻¹ de BA, con un promedio de brotes por explante de 6.13, el tratamiento con el menor número de brotes por explante para esta especie fue la concentración 1.0 mg L⁻¹ de BA, con un promedio de brotes por explante de 1.00. La especie *Agave obscura*, produjo el mayor número de brotes por explante con el tratamiento cuya concentración fue de 0.2 mg L⁻¹ de TDZ, con un promedio de brotes por explante de 11.00, el tratamiento con el menor número de brotes por explante, fue el de concentración 1.0 mg L⁻¹ de 2iP, con un promedio de brotes por explante de 0.13. El tratamiento con la concentración 3.0 mg L⁻¹ de CIN, propició el mayor número de brotes por explante en la especie *Agave potatorum*, el menor número de brotes por explante se obtuvo con el tratamiento que correspondió a una concentración de 1.5 de MT, con un promedio de brotes por explante de 0.38 (Cuadro 5). Los resultados obtenidos son similares a los reportados por Das en 1992 para *Agave sisalana* en subcultivos sucesivos en medio MS adicionado con BA (2.2 o 4.4 μM) de 8 a 12 brotes por explante.

Los resultados anteriores confirman que cada especie responde de manera diferente a los reguladores del crecimiento suministrados in vitro, por lo cual resulta indispensable el desarrollo de protocolos de propagación particulares para cada una de ellas. Esto coincide con lo observado en cactáceas (Hubstenberger *et al.*, 1992). Entre las cinco citocininas probadas, la única que indujo brotes en todas las especies y concentraciones fue la BA; esta hormona y el 2iP dieron las respuestas más uniformes entre las especies trabajadas. Dado que la concentración más alta de citocinina que se usó produjo menor cantidad de brotes que algunos tratamientos intermedios, puede inferirse que el nivel óptimo se encuentra dentro del rango probado. Las citocininas Cin, TDZ y MT generaron resultados heterogéneos, fueron eficientes en algunas especies y en otras no tuvieron efecto. En todos los trabajos consultados acerca de la propagación in vitro de especies de Agave se utilizaron BA, 2iP o Cin, solas o combinadas con auxinas. El TDZ y la MT no habían sido aplicadas antes a la propagación in vitro de estas plantas, por lo que este trabajo es el primer reporte en este sentido. Los resultados muestran que si bien la MT no parece ser eficiente en las especies y concentraciones probadas, el TDZ podría ser una alternativa atractiva al uso de las otras citocininas para algunas especies de Agave. Esta citocinina sintética ha sido usada con frecuencia sólo en especies leñosas (Huetteman y Preece, 1993); aquí resultó ser la más eficiente para la proliferación in vitro de *A. difformis* y *A. obscura*.

En cuanto a la eficiencia de los protocolos desarrollados, Nikam (1997) reportó la generación de 5.7 brotes por explante en un tratamiento con 0.5 mg L⁻¹ de Cin en *A. sisalana*. Santacruz-Ruvalcaba *et al.* (1999) obtuvieron 22 brotes por explante con 3 mg L⁻¹ de BA, mientras que Martínez-Palacios *et al.* (2003) reportaron 2.2 brotes por explante en *A. victoria-reginae* cultivado con 1 mg L⁻¹ de BA. Estos investigadores también usaron meristemos similares como explantes, y sus resultados confirman la respuesta heterogénea que ocurre entre las especies de Agave, como se observó en este trabajo. Valenzuela-Sánchez *et al.* (2006) reportaron promedios de hasta 19.5 brotes por explante en *A. tequiliana*, con un

tesis tesis tesis tesis tesis

sistema de organogénesis indirecta, sistema de regeneración que al igual que la embriogénesis somática, puede ser más eficiente que la formación de brotes partiendo de tejidos meristemáticos. Sin embargo, el pasar por una fase de tejido calloso los hace proclives a variación somaclonal (Oliveira *et al.*, 1995), lo cual es indeseable cuando se busca propagar masivamente conservando el acervo genético de los materiales originales. Por esta razón en este trabajo se seleccionaron tratamientos con bajos niveles de citocininas y sin auxinas, lo que permitió generar brotes sin la formación de tejido calloso en los explantes.

El proceso de enraizamiento se realizó en medio MS sin reguladores de crecimiento vegetal, obteniéndose eficiencias del 80 al 100%. Para la adaptación en suelo y condiciones ambientales de invernadero la sobrevivencia osciló entre el 53.33 al 100 % (cuadro 6). Resultados similares se reportaron para *A. arizonica* (Powers y Backhaus, 1989), *A. parrasana* (Santacruz-Ruvalcaba *et al.*, 1999) y *A. victoria-reginae* (Martínez-Palacios *et al.*, 2003) que mostraron altas tasas de enraizamiento sin necesidad de auxinas. Solamente en *A. angustifolia* se recomienda el uso de ácido indolbutírico (AIB) para inducir el enraizamiento *in vitro* (Enríquez del Valle *et al.*, 2005), y en *A. salmiana* la auxina recomendada para el enraizamiento es el ácido indolacético (AIA) (Silos-Espino *et al.*, 2007).

Se probaron distintas concentraciones y combinaciones de BA y 2,4-D para generar organogénesis y/o embriogénesis somática, como explante se utilizaron las hojas de plántulas de las cinco especies de *Agave* de los tratamientos probados para organogénesis y/o embriogénesis somática no generaron resultados como los reportados por Nikam, *et al.* (2003), quienes produjeron embriones somáticos después de subcultivos sucesivos de tejido calloso en medio MS adicionado con 2,4-D (0.5-1 mg/L) o cinetina (1-2 mg/L) los brotes formados fueron transferidos a medio adicionado con 0.5 mgL⁻¹ de cinetina. Después de 2 semanas de incubación, el tejido calloso formado en la base de los brotes jóvenes producidos *in vitro*, se transfirió a medio de cultivo adicionado con fitohormonas de los que el mejor tratamiento para la formación de embriones somáticos fue al que

se adicionó 0.1 mgL⁻¹ de cinetina. Todos los explantes generaron tejido calloso, pero únicamente *A. cupreata* produjo organogénesis indirecta en medio MS adicionado con 1 mgL⁻¹ de BA más 1 mgL⁻¹ de 2,4-D, los resultados obtenidos para esta especie, concuerdan con lo reportado por Valenzuela-Sánchez *et al* (2006), para desarrollar organogénesis indirecta en *Agave tequilana*.

Se utilizó el protocolo propuesto por Keb-Llanes y col. 2002, para el aislamiento de ADN de las especies antes de iniciar el proceso de subcultivo de explantes con reguladores de crecimiento vegetal y después de realizado el proceso, con los resultados con que se cuenta de la técnica RAPD, se puede establecer que las especies no sufrieron cambios significativos en su fondo genético, pero son insuficientes para establecer claramente su relación de parentesco entre estas. Para la obtención de productos amplificables por PCR se utilizaron cinco oligos (OPA1, OPA2, OPA3, OPA10 y OPA13), de los cuales se utilizaron 23 bandas polimórficas para generar la matriz de 0 y 1, con la que se realizó el análisis de conglomerados para la elaboración del dendrograma (figura 10), que muestra la distancia taxonómica media de las especies, distribuida en cuatro grupos.

El género *Agave* se divide en dos subgéneros *Littaea* y *Agave*, la mayoría de las especies a las que se les aplicó la técnica RAPD pertenecen al segundo género, sólo las especies *A. diformis* y *A. obscura* pertenecen al primero, en el dendrograma obtenido se aprecia la separación de *A. diformis* pero no de *A. obscura* del resto de las especies, esta última aparece como muy cercana a las especies *A. chiapensis* y *A. bracteosa*, posiblemente esto se deba a que se requiere un mayor número de oligos para realizar el análisis y se generen un mayor número de bandas polimórficas que permita un análisis más detallado que el que aquí se presenta.

10. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se demostró que es posible la propagación *in vitro* de manera eficiente de las especies *Agave cupreata*, *A. difformis*, *A. karwinskii*, *A. obscura* y *A. potatorum*, para las que no existían antecedentes en este sentido.

Los protocolos desarrollados generaron entre 6.1 y 11 brotes por explante en promedio, según la especie; estas tasas de propagación se lograron en el mejor tratamiento con citocininas, después de 90 días de incubación. Estos protocolos tienen potencial par generar entre 1,412 y 14,641 nuevas plantas a partir de un explante inicial, en el lapso de un año (cuatro ciclos de cultivo).

Se encontró que el tidiazurón (TDZ) puede ser una alternativa eficiente para la generación de brotes en algunas especies del género *Agave*, hecho no reportado previamente en la literatura.

Los métodos desarrollados pueden aplicarse para la generación masiva de plantas para su aprovechamiento y para disminuir así las presiones que la sobreexplotación ejerce sobre las poblaciones silvestres.

Se demostró la factibilidad de generar tejido calloso a partir de segmentos de hoja de las especies trabajadas. En el caso de *A. cupreata* se demostró la capacidad organogénica de este tejido.

Se demostró que el método RAPD es adecuado para analizar la diversidad genética en las especies estudiadas y se generaron datos preliminares al respecto.

11. BIBLIOGRAFÍA:

- Andrijany, V.S., Indrayanto, G., Soehono, L.A. 1999. Simultaneous effect of calcium, magnesium, copper and cobalt ions on saponin steroids content in callus cultures of *Agave amaniensis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 55, 103–108
- Binh, T. L., Muoi, T. L., Oanh, K. H. T., Thang, D. T., Phong, T. D. 1990. Rapid propagation of agave by in vitro tissue culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 23, 67-70.
- Boulanger, J.1985. Mejoramiento de la variabilidad genética del Sisal (*A. sisalana* Perrine) y del henequén (*A. fourcroydes* Le maire) En: Cruz, C., Del Castillo, L., Robert, M. I., Ondarza, R. N. (eds). *Biología y aprovechamiento integral del henequén y otros agaves*. Cent. Invest. Cient. Yucatán. 75-81.
- Burgess, T. L.1985. Agave adaptation to aridity. En: Pinkava, D. J., Gentry, H. S. (eds). *Desert Plants* 7, 2: 39-50.
- Cabasson, C., Alvard, D., Dambier, D., Ollitrault, P., Teisson, C. 1997. Improvement of *Citrus* somatic embryo development by temporary immersion. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 50, 33-37.
- Chen, S., Xia, T., Chen, S., Zhou, Y. 2005. RAPD Profiling in Detecting Genetic Variation in Endemic *Coelonema* (Brassicaceae) of Qinghai-Tibet Plateau of China. *Biochemical Genetics*. 43, 189-201.
- CIMMYT. 1995. *Molecular Marker Applications to Plant Breeding*. México. 25 pp.
- Chrispeel, J. H., Sadava, E. G. 2003. *Plants, Genes, and Crop Biotechnology*. 2^a ed. Edit. Jones Bortlett, N.Y. USA.
- CONABIO. 2006. *Mezcales y diversidad*. 2^{da} Ed. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México.
- Das, T. 1992. Micropropagation of *Agave sisalana*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 31, 253-255.
- Deshwal, S. R. P., Singh, R., Malik, K., Randhawa, G.J. 2005. Assessment of genetic diversity and genetic relationships among 29 populations of

- Azadirachta indica A. Juss. using RAPD markers. Genetic Resources and Crop Evolution. 52, 285–292.
- Dewey, L. H. 1973. Fiber production in the western hemisphere USA. Washington. No. 518, 1-95.
- Diederichsen, A., Yong-Bi, F. 2006. Phenotypic and molecular (RAPD) differentiation of four infraspecific groups of cultivated flax (*Linum usitatissimum* L. subsp. *usitatissimum*). Genetic Resources and Crop Evolution. 53, 77–90.
- Enríquez, del V. J. R., Carrillo, C. G., Rodríguez, de la O. J. L. 2005. Sales inorgánicas y ácido indolbutírico en el enraizado *in vitro* de brotes de *Agave angustifolia*. Rev. Fitotec. Mex. 28 (2), 175-178.
- Flores-Benítez, S., Jiménez-Bremont, J. F., Rosales-Mendoza, S., Argüello-Astorga, G. R., Castillo-Collazo, R., Alpuche-Solís, A. G. 2007. Genetic transformation of *Agave salmiana* by *Agrobacterium tumefaciens* and particle bombardment. Plant Cell Tiss Organ Cult. 91, 215–224.
- Galderisi, U., Cipollaro, M., Di Bernardo, G., De Masi, L., Galano, G., Cascino, A. 1999. Identification of hazelnut (*Corylus avellana*) cultivars by RAPD analysis. Plant Cell Reports. 18, 652–655
- Gaspar, T., Kevers, C., Penel, C., Greppin, H., Reid, M. D., Thorpe, A. T. 1996. Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant. 32, 272-289.
- Gentry, H. S. 1982. Agaves of continental North America Tucson, Arizona. Univ. Arizona Press. 670 pp.
- Gil-Vega, K., Gonzáles-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, 335-341.
- Good-Avila, S. V., Sousa, V., Gaut, S. B. Eguiarte, E. L. 2006. Timing and rate of speciation in *Agave* (Agavaceae). PNAS 103, 9124-9129.
- Goto, S., Thakur, R. C., Ishii, K. 1998. Determination of genetic stability in long-term micropropagated shoots of *Pinus thunbergii* Parl. using RAPD markers. Plant Cell Reports 18, 193–197.

- Granados-Sánchez, D. 1993. Los agaves en México. Universidad Autónoma de Chapingo, México. 252 pp
- Groenewald, E. G., Wessels, D. C. J., Koeleman, A. 1977. Callus formation and subsequent plant regeneration from seed tissue of an *Agave* species (Agavaceae). *Z Pflanzphysiol* 21: 4, 369-373.
- Guo, W.W., Cheng, Y.J., Deng, X.X. 2002. Regeneration and molecular characterization of intergeneric somatic hybrids between *Citrus reticulata* and *Poncirus trifoliata*. *Plant Cell Rep.* 20, 829–834.
- Harry, S. I., Thorpe, A. T. 1991. Cultivos de tejidos: reservas de biosfera *in vitro*. *La Naturaleza y sus Recursos*. 27, (3), 19-24.
- Hashmi, G., Huettel, R., Meyer, R., Krusberg, L., Hammerschlag, F. 1997. RAPD analysis of somaclonal variants derived from embryo callus cultures of peach. *Plant Cell Reports*. 16, 624–627.
- Hazra, K. S., Das, S., Das, K. A. 2002. Sisal plant regeneration via organogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 70, 235-240.
- Jiménez-Hidalgo, I., Virgen-Calleros, G., Martínez-de la Vega, O., Vandemark, G., Olalde-Portugal, V. 2004. Identification and characterisation of bacteria causing soft-rot in *Agave tequilana*. *European Journal of Plant Pathology*. 110, 317-331.
- Keb-Llanes, M., González, G., Chi-Manzanero, B., Infante, D. 2002. A rapid and simple method for small scale DNA extraction in Agavaceae and other tropical plants. *Plant. Mol. Biol. Rep.* 20, 299a-299e.
- Kim, W. Y., Youn, Y., Noh, R. E., Kim, C. J. 1997. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of five families of *Quercus acutissima*. *Plant Cell Reports*. 16, 869-873.
- Kiss, E., Kiss, J., Gyulai, G., Heszky, E. L. 1995. A novel method for rapid micropropagation of pineapple. *Hort Science* 30 (1), 127-129.
- Labra, M., Savini, C., Bracale, M., Pelucchi, N., Colombo, L., Bardini, M., Sala, F. 2001. Genomic changes in transgenic rice (*Oryza sativa* L.) plants produced by infecting calli with *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Reports*. 20, 325–330.

- Leifert, C., Murphy, P. K., Lumsden, J. P. 1995. Mineral and carbohydrate nutrition of plant cell and tissue cultures. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 14, 83-109.
- Martin, K. P., Pachathundikandi, S. K., Zhang, C. L., Slater, A. Madassery, J. 2006. RAPD analysis of a variant of banana (*Musa sp.*) cv. grande naine and its propagation via shoot tip culture. *In Vitro Cell. Dev. Biol.—Plant*. 42, 188–192.
- Martínez-Palacios, A., Ortega-Larrocea, P., Chávez, V.M., Bye, R. 2003. Somatic embryogenesis and organogenesis of *Agave victoriae-reginae*: Consideration for its Conservation. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 74, 135-142.
- Martirosyan, E. V., Ryzhova, N. N., Skryabin, K. G., Kochieva, E. Z. 2008. RAPD Analysis of Genome Polymorphism in the Family Lemnaceae. *Genetika*. 44 (3), pp. 417–422.
- Murashige, T., Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*. 15, 473-497.
- Nakajima, Y., Oeda, K., Yamamoto, T. 1998. Characterization of genetic diversity of nuclear and mitochondrial genomes in *Daucus* varieties by RAPD and AFLP *Plant Cell Reports* 17, 848–853.
- Nikam, D. T. 1997. High frequency shoot regeneration in *Agave sisalana*. *Plant Cell, and Organ Culture*. 51, 225-228.
- Nikam, D. T., Bansude, M. G., Aneesh Kumar, C. K. 2003. Somatic embryogenesis in sisal (*Agave sisalana* Perr. Ex Engelm). *Plant Cell Rep.* 22, 188-194.
- Nobel, P. S. 1976. Water relations and photosynthesis of a desert CAM plant, *Agave deserti*. *Plant Physiol* 58, 576-582.
- Nobel, P. S., Hartsock, T. L. 1978. Resistance analysis of nocturnal carbon dioxide uptake by Crassulacean acid metabolism succulent, *Agave deserti*. *Plant Physiol*. 61, 510-514.
- Park, S. Y., Barrett, D. J., Bonga, M. J. 1998. Application of somatic embryogenesis in high-value clonal forestry: deployment, genetic control, and stability of cryopreserved clones. *In Vitro Cell. Dev. Biol.- Plant*. 34, 231-23.

- Pejic, I., Aimone-Marsan, P., Morgante, M., Kozumplick, V., Castiglioni, P., Taramino, G., Motto, M. 1998. Comparative análisis of genetic similarity among maize inbred lines detected by RFLPs, RAPDs, SSRs, and AFLPs. *Theor. Appl. Genet.* 97, 1248-1255.
- Pérez-Molphe-Balch, E., Ramírez, R., Núñez, H., Ochoa, N. 1999. Introducción al cultivo de tejidos vegetales. UAA/FOMES. México. 179 pp.
- Pérez, M. R., Navarro, L., Duran-Villa, N. 1997 Cryopreservation and storage of embryogenic callus cultures of several citrus species and cultivars. *Plant Cell Reports* 17, 44-49.
- Portillo, L., Santacruz-Ruvalcaba, F., Gutierrez-Mora, A., Rodríguez-Garay, B. 2007. Somatic embryogenesis in *Agave tequilana* Weber cultivar azul. *In Vitro Cell.Dev.Biol.—Plant.* 43, 569–575.
- Powers, D.E., Backhaus, R.A. 1989. *In vitro* propagation of *Agave arizonica* Gentry & Weber. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 16, 57-60.
- Rajasekar, S., Shui-zhang F., Christians, N. E. 2007. Analysis of genetic diversity in colonial bentgrass (*Agrostis capillaris* L.) using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers.
- Ramírez-Malagón, R., Borodanenko, A., Pérez-Moreno, L., Salas-Araiza, M.D., Nuñez-Palenius, H.G., Ochoa-Alejo, N. 2008. In vitro propagation of three *Agave* species used for liquor distillation and three for landscape. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 94:201-207.
- Robert, M.L., Herrera, J.L., Contreras, F., Scorer, K.N. 1987. *In vitro* propagation of *Agave fourcroydes*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 8, 37-48.
- Robert, M. L., Herrera, J. L., Chang, J. L., Contreras, F. 1992. Micropropagation of *Agave* spp. En: Bajaj, Y.P.S. (ed.) *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Vol. 19. High-Tech and Micropropagation III. Springer-Verlag, Berlin- Heidelberg. pp. 306-329.
- Rocha, M., Good-Ávila, S. V., Molina-Freaner, F., Arita, T. H., Castillo, A., García-Mendoza, A., Silva-Montellano, A., Gaut, S. B., Souza, V. and Eguiarte, E. L. 2006. Pollination biology and adaptive radiation of Agavaceae, with special emphasis on the genus *Agave*. *Aliso*, 22(1), pp. 327–342.

- Rodríguez, H. G., Morales, D. F., Gutiérrez, C. R., Aguilar, E. S., Pérez, Molphe-Balch, E. 2007. Generación de raíces transformadas de *Agave salmiana* Otto y su colonización por *Glomus intraradices*. Rev. Fitotec. Mex. 30 (3), 215-222.
- Rodríguez-Garay, B., Gutiérrez-Mora, A., Acosta-Dueñas, B. 1996. Somatic embryogenesis of *Agave victoria-reginae* Moore. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 46:85-87.
- Salisbury, B. F., Ross, W. C. 1994. Fisiología vegetal. Edit. Grupo Editorial Iberoamérica. México. 759 pp.
- 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, 163-167.
- Schenk, R. U., Hildebrandt, A. C. 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. Can. J. Bot. 50, 199-204.
- Sensoy, S., Büyükakalaka, S., Abak, K. 2007. Evaluation of genetic diversity in Turkish melons (*Cucumis melo* L.) based on phenotypic characters and RAPD markers. Genet Resour Crop Evol. 54, 1351–1365.
- Silos-Espino, H., González-Cortés, N., Carrillo-López, A., Guevara-Lara, F., Valverde-González, M.E., Paredes-López, O. 2007. Chemical composition and *in vitro* propagation of *Agave salmiana* 'Gentry'. The Journal of Horticultural Science and Biotechnology. 82, 355-359.
- Sriskandarajah, S., Skirvin, M. S., Abu-Qaoud, H. 1990. The effect of some macronutrients on adventitious root development on scion apple cultivars *in vitro*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 21, 185-189.
- Su, W. W., Wen-Ing, H., Kim, Y. S., Sagawa, Y. 1997. Induction of somatic embryogenesis in *Azadirachta indica*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 50, 91-95.
- Sun, K., Chen, W., Ma, R., Chen, X., Li, A., Ge, S. 2006. Genetic Variation in *Hippophae rhamnoides ssp. sinensis* (Elaeagnaceae) Revealed by RAPD Markers. Biochemical Genetics. 44, 186-197.

- Teng, L. W., Nicholson, L., Teng, C. M. 1997. Micropropagation of *Spathoglottis alicata*. Plant Cell Reports. 16, 831-835.
- Tejavathi, D. H., Rajanna, D. M., Sowmya, R., Gayathamma, K. 2007. Induction of somatic embryos from cultures of *Agave vera-cruz* Mill. *In Vitro Cell.Dev.Biol. Plant.* 43, 423-428.
- Tiwari, K. S., Tiwari, P. K., Siril, A. E. 2002. An improved micropropagation protocol for teak. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 71, 1-6.
- 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 Organogenesis. *In Vitro Cell. Dev. Biol.—Plant.* 42, 336–340.
- Watanabe, A., Araki, S., Kobari, S., Sudo, H., Tsuchida, T., Uno, T. Kosaka, N., Shimomura, K., Yamazaki, M., Saito, K. 1998. In vitro propagation, restriction fragment length polymorphism, and random amplified polymorphic DNA analyses of Angelica plants. *Plant Cell Reports.* 18, 187–192.
- Wienk, J. F. 1976. Sisal and relatives, *Agave* (Agavaceae-Agaveae). In: Simmonds NW (ed). *Evolution of crop plants.* Logman, New York. 1-4.
- Yadav, K. V., Kumar, S., Panwar, K. R. 2007. Measurement of genetic dissimilarity in fieldpea (*Pisum sativum* L.) genotypes using RAPD markers. *Genet Resour Crop Evol.* 54, 1285–1289.
- Yang, W. R., Zhou, H. Y., Ding, B. C., Zheng, L. Y., Zhang L. 2008. Relationships among *Leymus* species assessed by RAPD markers. *Biologia Plantarum* 52 (2): 237-241.

12. ANEXOS

12.1 Protocolo de extracción de ADN

1. Moler 0.3 g de tejido hasta obtener un polvo fino utilizando un mortero y nitrógeno líquido. Pasar el polvo a un tubo Eppendorf. Agregar 300 μL de buffer A, 900 μL de buffer B y 100 μL de SDS.
2. Mezclar con vortex. Incubar en baño maría a 65 °C por 10 minutos.
3. Agregar 410 μL de acetato de potasio frío. Mezclar a conciencia. Centrifugar a 15300 g por 15 minutos a 4 °C.
4. Tomar 1 μL del sobrenadante y pasarlo a un tubo Eppendorf limpio. Agregar 540 μL de isopropanol frío. Dejar la muestra enfriando en hielo por 20 minutos.
5. Centrifugar a 9600 g por 10 minutos. Desechar el sobrenadante. Lavar la pastilla con 500 μL de etanol al 70% y dejar que seque.
6. Resuspender la pastilla en 600 μL de buffer TE. Agregar 60 μL de acetato de sodio 3M (pH 5.2) y 360 μL de isopropanol frío. Dejar enfriando en hielo por 20 minutos.
7. Centrifugar a 9600 g por 10 minutos. Repetir los pasos 5-7 dos veces.
8. Resuspender la pastilla en 50 μL de buffer TE. Cuantificar el ADN espectrofotométricamente a 260 nm.
9. Verificar la integridad del ADN extraído en un gel de agarosa.

(Keb-Llanes et al 2002)

12.2. Artículo científico

Revista Fitotecnia Mexicana Vol. 31 (4): 317 – 322, 2008

Publicada por la Sociedad Mexicana de Fitogenética A. C.

ISSN 0187- 7380

“EFECTO DE CITOCININAS EN LA PROPAGACIÓN *in vitro* DE AGAVES MEXICANOS”

Manuel S. Domínguez Rosales, Ángel G. Alpuche Solís, Nora L. Vasco Méndez y Eugenio Pérez Molphe Balch

13. GLOSARIO

RAPD	ADN Polimórfico Amplificado al Azar
BA	Bencil Adenina
CIN	Cinetina
MT	Meta Topolina
TDZ	Tidiazurón
2iP	Isopentiladenina
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
IAA	Ácido Indolacético
IBA	Ácido Indolbutírico
2,4-D	Ácido 2,4-dicloro fenoacético
ANA	1-naftalenacético
ABA	Ácido abscísico
STS	Sitios Marcados en la Secuencia
μM	Micromoles
MS	Medio basal Murashige y Skoog
μg	Microgramos
ml	Mililitro
ng	Nanogramo