
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y

AGROPECUARIAS



**Variación somaclonal en embriones somáticos de
Agave tequilana Weber Cultivar Azul**

TRABAJO CON CARÁCTER DE

TESIS

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA

OSCAR IVÁN BAÑUELOS CASTAÑEDA

Las Agujas, Zapopan, Jal., marzo 2015



Universidad de Guadalajara
Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias
Coordinación de Titulación y Carrera de Licenciatura en Biología

1475/ C. C. BIOLOGÍA

C. OSCAR IVAN BAÑUELOS CASTAÑEDA

PRESENTE

Manifiestamos a usted que con esta fecha ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de: **Tesis e Informes** opción **Tesis** con el título: **“Variación somaclonal en embriones somáticos de *Agave tequilana* Weber Cultivar Azul”** para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como Director de dicho trabajo al: **Dr. Liberato Portillo Martínez** y como asesor a la: **M. C. Martha Isabel Torres Morán**.

Sin más por el momento, le envío un afectuoso saludo.

ATENTAMENTE
“PIENSA Y TRABAJA”
“2009, AÑO DEL BICENTENARIO DE CHARLES DARWIN”
Las Agujas, Zapopan., 02 de abril del 2009.


DR. FRANCISCO MARTÍN HUERTA MARTÍNEZ
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN




M en C. GLORIA PARADA BARRERA
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

Dra. Georgina Adriana Quiroz Rocha.
Presidente del Comité de Titulación.
Licenciatura en Biología.
CUCBA.
Presente

Nos permitimos informar a usted que habiendo revisado el trabajo de titulación, modalidad **tesis e informes**, opción **tesis** con el título: "**Variación somaclonal en embriones somáticos de *Agave tequilana* Weber Cultivar Azul**" que realizó el pasante **Bañuelos Castañeda Oscar Iván** con número de código **B04000536** consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorizar su impresión.

Sin otro particular quedamos de usted con un cordial saludo.

Atentamente
Oscar Iván Bañuelos C
Oscar Iván Bañuelos Castañeda

Las Agujas, Zapopan, Jalisco, a 17 de febrero del 2015

Liberato Portillo Martínez
Dr. Liberato Portillo Martínez
Director.

Marta Isabel Torres Morán
Dra. Marta Isabel Torres Morán
Asesor.

COMITE DE
TITULACION



17/02/2015

Nombre completo de los Sinodales asignados por el Comité de Titulación	Firma de aprobado	Fecha de aprobación
Dr. Fernando SantaCruz Ruvalcaba	<i>[Firma]</i>	17-02-2015
Dr. Carlos Ramírez Serrano	<i>[Firma]</i>	17.02.15
Dra. Ofelia Vargas Ponce	<i>[Firma]</i>	17.02.15
Dr. Rafael Soltero Quintana	<i>[Firma]</i>	17-02-15



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

Coordinación de Carrera de la Licenciatura en Biología
COMITÉ DE TITULACIÓN

FORMATO DE PREAUTORIZACIÓN DE FECHA Y HORA DE EXAMEN DE TITULACIÓN

Los abajo firmantes, sinodales del trabajo de titulación del (la):

Alumno (a): Oscar Ivan Barajas Castañeda Código: B04000536

Manifiestamos estar de acuerdo en la fecha y hora propuesta para el examen de titulación el cual será:

Fecha: 5 Marzo de 2015 Hora: 9:00 am

El jurado quedará integrado de la siguiente manera:

Table with 4 columns: Position (PRESIDENTE, SECRETARIO, VOCAL), Grado (Dr., Dra.), Nombre Completo Sin Iniciales (Fernando SantaCruz Rivalcaba, Carlos Ramirez Sorreño, Ofelia Vargas Ponce), Correo, and Firma.

1.- Vo. Bo. Secretario de la División de Ciencias Biológicas y Ambientales: [Signature]

2.- Vo. Bo. Coordinación de Carrera de Biología: [Signature]

Nota: Presentar este formato en original y copia 12 días hábiles previos a la fecha de examen en Coordinación de Carrera.

Me comprometo a entregar los siete ejemplares impresos (Tamaño tesis pasta verde) y un CD con el documento, por lo menos 5 días hábiles antes de la fecha de examen. De lo contrario se cancelará el acta de titulación.

Firma del interesado Oscar Ivan Barajas C

AGRADECIMIENTOS

Con cariño respeto y admiración a mis Padres, a Dios gracias por permitirme concluir esta etapa satisfactoriamente, cerrando así un ciclo más en mi vida.

Institucionalmente, a mi casa madre que es la Universidad de Guadalajara, en ella todo lo que representa, honor, respeto, prestigio y entereza, valores que han contribuido día a día a la formación de verdaderos profesionistas, de esta, nuestra querida casa de estudios el cual me hace orgulloso pertenecer y formar parte como egresado.



INDICE GENERAL.....	II
LISTADO DE CUADROS Y FIGURAS.....	IV
RESUMEN.....	VI
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTE.....	4
2.1 Descripción del género <i>Agave</i>.....	4
2.1.1 Usos del género.....	5
2.1.2 Distribución.....	6
2.2 Métodos para la propagación de plantas.....	6
2.2.1 Propagación sexual.....	7
2.2.2 Propagación asexual o vegetativa.....	7
2.3 El cultivo <i>in vitro</i>.....	7
2.3.1 Fisiología del cultivo <i>in vitro</i>	8
2.3.2 Procesos morfogénicos en el cultivo de tejidos Vegetales.....	8
2.3.3 Embrigénesis somática.....	9
2.3.4 Propagación <i>in vitro</i> de <i>Agave tequilana</i>	9
2.3.5 Propagación tradicional.....	11
2.4 Técnicas de cultivo en medio líquido y sólido.....	11
2.4.1 Birreactores de inmersión temporal.....	12
2.5 Variación somaclonal.....	13
2.5.1 Diversidad y variabilidad genética.....	14
2.5.2 Medición de la variabilidad genética.....	15
2.5.3 Marcadores moleculares.....	15
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	16
4. JUSTIFICACIÓN.....	17
5. HIPÓTESIS.....	17



6. OBJETIVOS.....	18
7. METODOLOGÍA.....	18
7.1 Área de estudio.....	18
7.1.1 Material vegetal.....	19
7.2 Etapa I Inducción de callos (EI-IC).....	19
7.2.1 Tinciones diferenciales.....	20
7.3 Etapa II Expresión de embriones somáticos (EII-EES).....	21
7.4 Adaptación <i>ex vitro</i>	21
7.5 Extracción de ácido desoxirribonucleico (ADN).....	21
7.5.1 Concentración y calidad de ADN.....	22
7.5.2 Amplificación por PCR para RAPD.....	23
7.5.3 Mezcla de reacción.....	24
7.5.4 Electroforesis.....	25
7.5.5 Análisis de datos.....	25
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	26
8.1 Etapa I Inducción de callo (EI-IC).....	26
8.1.1 Tinciones diferenciales.....	29
8.2 Etapa II Expresión de embriones somáticos (EII-EES).....	31
8.2.2 Capacidad de conversión a plántula completa.....	35
8.3 Adaptación <i>ex vitro</i>	36
8.4 Calidad y concentración del ADN.....	38
8.4.1 Patrones de amplificación RAPD.....	41
8.5 Análisis estadístico.....	43
8.6 Análisis de similitud y agrupamiento.....	44
9. CONCLUSIONES.....	48
10. LITERATURA CITADA.....	50



LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadro 1.	Lista de iniciadores empleados para generar marcadores RAPD.....	24
Cuadro 2.	Preparación empleada para generar marcadores RAPD.....	24
Cuadro 3.	Respuesta de los explantes en la etapa de inducción EI-IC con diferente concentración de reguladores de crecimiento. Tratamiento 1 (medio MS-322) y tratamiento 2 (medio MS-Normal).....	26
Cuadro 4.	Promedio de embriones somáticos generados en dos tratamientos (medio sólido y líquido en Orbitabion®) con diferente dosis de adenina.....	34
Cuadro 5.	Calidad y concentración del ADN extraído.....	40
Cuadro 6.	Productos RADP amplificados con diferentes iniciadores.....	43
Figura 1.	Cultivo de explantes de raíz de <i>Agave tequilana</i> Weber con presencia de callo con características embriogénicas. a) Vista general, b) Vista en detalle y c) Típica coloración de callo embriogénico. Barras = 1 cm.....	28
Figura 2.	Distintos tipos de callos de <i>Agave tequilana</i> Weber generados con los tratamientos de inducción a) Lustroso, b) Fotosintético, c) Organogénico y d) Embriogénico. Barras = 1 cm.....	29
Figura 3.	Tinción diferencial en células de callos de <i>Agave tequilana</i> Weber. a) Vista a detalle de grupo de células en tinción diferencial, b) Célula con división asimétrica (flecha blanca: célula apical teñida de acetocarmin, flecha negra: célula basal teñida de azul de Evans), c) Células no embriogénicas con división lenta, que muestran el citoplasma en azul y el núcleo en rojo.....	30
Figura 4.	Diferentes aspectos de la embriogénesis somática de <i>Agave tequilana</i> Weber, a) Masa amorfa de células desorganizadas, b) Callo oxidado, c) Embriones somáticos. Barras = 1 cm.....	32



Figura 5.	Representación gráfica del número de embriones somáticos obtenidos en medio sólido y líquido en Orbitabion.....	33
Figura 6.	Diferentes estados de desarrollo morfológico de embriones somáticos de <i>Agave tequilana</i> Weber a) Células con división asimétrica, b) Estado globular (tomado de Monroy y col., 2010), c) Estado escutelard) Estado coleoptila.....	35
Figura 7.	Plántulas regeneradas a partir de embriones somáticos de <i>Agave tequilana</i> Weber.....	36
Figura 8.	Adaptación de plantas jóvenes de <i>Agave tequilana</i> Weber al ambiente <i>ex vitro</i>	37
Figura 9.	Plantas adultas de <i>Agave tequilana</i> Weber obtenidas mediante micropropagación con adaptación <i>ex vitro</i>	38
Figura 10.	Electroforesis en geles de agarosa 1.5 % de ADN de diecinueve embriones somáticos y una yema axilar de <i>Agave tequilana</i> Weber. Carriles: 1 = Madre; 2 a10 = Orbitabión®1-9; muestras 11 a 20 = Sólido; R = Marcador de 1 kb (1000 pb).....	39
Figura 11.	Patrón de amplificación obtenido con los distintos iniciadores en los diecinueve embriones somáticos y una yema axilar de <i>Agave tequilana</i> Weber. Carril R = Marcador 1 kb (1000 pb); carril 1 = Madre; del 2 a 10 = Productos de Orbitabion® y 11 a 20 de medio sólido.....	42
Figura 12.	Dendrograma que muestra el agrupamiento de individuos de <i>Agave tequilana</i> Weber generados por embriogénesis somática mediante dos métodos de cultivo (medios sólido y líquido en Orbitabion®).....	44
Figura 13.	Representación gráfica de la estructura genética de los 19 embriones somáticos y una yema axilar de <i>Agave tequilana</i> , donde muestra cuatro simulaciones ($K = 2$ a $K = 5$). En cada simulación (K) se presentan los grupos simulados con diferente color de acuerdo a su procedencia de medio de expresión (sólido en rojo y líquido en verde para $K = 2$, y para los individuos con características compartidas de $K = 3$ a $K = 5$, en azul, amarillo y rosa). 1) Madre. 2) individuos originados en medio sólido. 3) individuos originados en Orbitabión®.....	46



RESUMEN

La biotecnología vegetal tiene como finalidad, aprovechar todas aquellas características agronómicas útiles que pueden ocurrir eventualmente en el cultivo de tejidos vegetales; para ello fue conveniente aplicar en este estudio, la regeneración de plantas del “maguey tequilero” (*Agave tequilana* Weber cultivar azul) vía embriogénesis somáticas se siguió la metodología ya implementada previamente, ya que se deben utilizar como explantes segmentos de raíz de plantas previamente establecidas, a fin de producir callos, dichos explantes fueron obtenidos de plantas micropropagadas mediante proliferación de yemas axilares, en medio MS. Se emplearon dos tratamientos; el primero con 2.0 mg L⁻¹ de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), 0.3 mg L⁻¹ de benciladenina (BA). El segundo con 3 mg L⁻¹ de 2,4-D, 2 mg L⁻¹ de ácido naftaleneacético (ANA) y 2 mg L⁻¹ de cinetina (KIN). En ambos tratamientos se produjo baja inducción de callo, el cual fue de apariencia friable, con características estructurales de callos embriogénicos. Con la finalidad de diferenciar células embriogénicas se aplicó una contratinción para ubicar células con división asimétrica. La expresión de embriones somáticos se hizo en ausencia de reguladores de crecimiento con base en dos experimentos, el primero en un sistema de inmersión temporal Orbitabion® y el segundo en medio sólido, ambos con 40 u 80 mg L⁻¹ de adenina y 500 mg L⁻¹ de hidrolizado de caseína. Se encontró que el número de embriones fue más evidente en el medio líquido que en medio sólido. A partir de 100 d de cultivo se obtuvieron plántulas completas y para evaluar su homogeneidad genética se utilizó la técnica de RAPD (polimorfismo de ADN amplificado aleatoriamente). La amplificación se hizo a partir de la combinación de nueve iniciadores de la serie Amersham® y Operon® en un volumen final de reacción de 25 µL. Los resultados obtenidos mostraron 229 bandas diferenciales, entre 50 y 1000 pares de bases, de las cuales 69 fueron monomórficas y 169 polimórficas. El dendrograma obtenido basado en el coeficiente de similitud de Jaccard permitió revelar la variación somaclonal existente, la cual se detectó con polimorfismos entre 33 a 90 %, con un coeficiente de similitud entre 16 a 50 %. Asimismo se obtuvo la diferenciación entre grupos,



donde se confirmó la existencia de diferencias genéticas entre los somaclones originados vía embriogénesis somática, así como con la planta madre de la cual procedieron, que se agruparon de acuerdo al nivel de discrepancia por su origen en dos sistemas de expresión (Orbitabión® y medio sólido). Las plantas regeneradas tuvieron una adaptación *ex vitro* exitosa lo que valida el proceso de embriogénesis somática en esta especie.



1. INTRODUCCIÓN

Los *Agaves* son de las plantas más representativas de México, su importancia va desde su valor económico valor y cultural (Sagarpa, 2004). Son considerados plantas excepcionales por sus propiedades metabólicas que se alberga en su genoma, enorme riqueza genética. Ofrece un potencial de aplicación biotecnológica por su gran adaptabilidad y capacidad de subsistir aun en ambientes extremos (Martínez y col., 2007). La estrecha relación establecida entre los antiguos mexicanos y los *Agaves* permanece hasta hoy; ya que la amplia diversidad de usos que tienen estas plantas, satisface 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, mezcalera, de fibras naturales (Domínguez y col., 2008) y otras como las productoras de miel, metabolitos y recientemente de bioenergías (biodiesel, bioetanol). Desafortunadamente las especies de *Agave* han sido descuidadas desde el punto de vista del mejoramiento genético. De manera tradicional, para aprovechar estas plantas el sistema utilizado para su propagación convencional es por hijuelos de rizoma. Esto ha contribuido a una disminución en la variabilidad genética de las poblaciones cultivadas, según lo mencionan Gil-Vega y col. (2001) y Alfaro y col. (2007), que tiene en *Agave tequilana* Weber cv. Azul, uno de los casos más severos que se ve afectado por enfermedades y plagas (Consejo Regulador del Tequila, 2000). Además esta especie desde el punto de vista comercial, presenta tiempos de cosecha muy largos (Robert y col., 1992), lo que es considerado una desventaja que se suma a la baja resistencia. La manera asexual de propagar esta planta durante años, ha conducido a la clonación de diversos genotipos seleccionados y por lo tanto a encontrar pocas variantes fenotípicas dentro de las poblaciones cultivadas (Fucikovsky, 2004). Debido a la problemática anterior, a las herramientas de la biotecnología vegetal se les considera como alternativa para la obtención de plantas sanas, (Portillo y Santacruz-Ruvalcaba, 2006). Por ello surge el interés el desarrollar tecnologías



para facilitar su manejo y mejoramiento, como el cultivo y la propagación masiva *in vitro*, que permite la micropropagación en tiempos cortos y espacios reducidos.

De acuerdo con Mansilla (2004), el cultivo de tejidos comprende una gama de técnicas, métodos y estrategias *in vitro*, las cuales consisten básicamente en el cultivo de células, órganos o tejidos bajo condiciones estériles, en medios con la composición química adecuada para la producción de plantas (Flores y Brenes, 1999). Se basa en dos principios fundamentales, la totipotencia y la dediferenciación celular (Hartmann y Kester, 1995). La totipotencia, consiste en la propiedad que tiene la célula vegetal de contener la información genética necesaria para generar una nueva planta. La dediferenciación es la capacidad que tienen las células maduras de volver a una condición meristemática y desarrollar un punto de crecimiento nuevo (George, 1993; Hurtado y Merino, 1994). El cultivo de tejidos vegetales se ha convertido en una alternativa importante, dentro de los métodos convencionales de propagación en una amplia gama de especies. En lo que se refiere a *A. tequilana*, uno de los principales retos que se tiene, es la necesidad de incrementar la productividad por un lado y por el otro disminuir los costos de producción (Mondal y col., 2004). En este sentido, la biotecnología ha conducido al desarrollo de una serie de técnicas que permiten un adecuado aprovechamiento y conservación de los recursos genéticos (Flores y Abdelnour, 2000). Sin embargo, según Torres-Morán y col. (2005), no existe en la actualidad un método probado de cultivo de tejidos que mantenga la uniformidad fenotípica de las plantas y cada uno de los métodos tiene diferente posibilidad de originar variación. Esta variabilidad es llamada variación somaclonal, la cual se define como el cambio que puede ocurrir en una población de células que son manipuladas bajo condiciones *in vitro* (Mansilla, 2004); es un evento en el que pueden aparecer modificaciones genéticas en las plantas que se producen en laboratorio. Esta variación se ha usado en procesos de mejoramiento genético y para ampliar la variación genética natural (Medina y col., 2007).

El cultivo de tejidos vegetales actúa como un intermediario entre los avances hechos por la biología molecular en el aislamiento y modificación de genes y la regeneración de plantas transformadas (Smith y Drew, 1990). Las técnicas de



micropropagación se utilizan con el objetivo de obtener plantas sanas, y establecer cultivos libres de enfermedades (Torres-Morán y col., 2005). En específico la embriogénesis somática se usa como una técnica efectiva en la obtención de plantas completas y mejoradas en poco tiempo (Pérez, 1998); por ello es un importante instrumento para el mejoramiento genético vegetal (Grapin y col., 2000), que permite la propagación clonal, transformación genética y estudios de desarrollo de embriones (Vendrame y col., 1999). Sin embargo, la fidelidad genética de los embriones somáticos debe ser evaluada y asimismo, verificar la producción de verdaderos clones, ya que, según Larkin y Scowcroft (1981), puede existir una variabilidad genética que surge como consecuencia de la desdiferenciación celular que ocurre durante el cultivo *in vitro* (Kaepler, 2000). Cuando el principal objetivo es la propagación clonal *in vitro*, la variación somaclonal es un fenómeno no deseado (Polanco y col., 2002). En el entendido de que pueda ocurrir cierta inestabilidad genética dentro del cultivo *in vitro*, ha obligado a usar sistemas de detección a nivel molecular para la identificación de estas variaciones y conocer el grado de estabilidad genética. El análisis genético es un complemento importante en los procesos de micropropagación, por lo que se emplea a la biología molecular, como una herramienta necesaria para determinar las diferencias génicas que puedan presentarse (Riasco y col., 2003). A primera instancia se considera el uso de marcadores moleculares útiles para determinar niveles de integridad o estabilidad génica, los cuales detectan polimorfismos a nivel de ADN (ácido desoxirribonucleico), proporcionando el perfil genético de cada individuo (Pardo y col., 2008).



2. ANTECEDENTES

2.1 Descripción del género *Agave*

El nombre del género *Agave* proviene del griego que significa “admirable” y fue descrito por Linneo en 1773 (Vásquez-García y col., 2007). Las especies de *Agave* presentan una enorme importancia ecológica, económica y cultural en Norteamérica, especialmente en México donde existe una mayor diversidad de este género. Han sido importantes para los pobladores de México desde tiempos remotos y se mantienen como una opción productiva interesante en diversas zonas áridas y semiáridas del país (Domínguez y col., 2008). Asimismo el género está representado por una gran diversidad de especies con una gran variabilidad de formas y tamaños, colores y estrategias de vida. Se calcula que surgió hace apenas 10 millones de años (Colunga-GarcíaMarín, y col., 2007), producto de una espectacular radiación adaptativa (Eguiarte y col., 2000). Tan sólo en México crecen y prosperan al menos 136 especies, 26 subespecies, 29 variedades y 7 formas de magueyes (García y Serrano, 2009), desde los pequeños magueyes henequeneros hasta los gigantescos magueyes del altiplano mexicano. Este elevado número de especies corresponde a que México se le considere su centro de origen y diversificación (Vásquez-García y col., 2007). Morfológicamente son plantas adaptadas a condiciones de aridez, perennes, rizomatosas, tienen una forma característica de roseta y poseen raíces muy ramificadas, hojas suculentas con cutícula gruesa con estomas hundidos; flores protándricas de color amarillo verdoso; fruto capsular leñoso alargado dehiscente (González y col 2009). Con metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM, por sus siglas en inglés) (Domínguez y col., 2008). El metabolismo CAM es un mecanismo de adaptación de las plantas de zonas áridas para facilitar la fotosíntesis y ahorrar agua (Nobel y Hartsock 1976), atributo que les permite establecerse en zonas carentes de agua. Desde el punto de vista reproductivo, la mayoría son semélparas, florecen una sola vez a lo largo de su ciclo, aquellas policárpicas florecen a lo largo de éste (Guillot y Meer, 2006). Para su propagación asexual generan hijuelos de rizoma subterráneos y bulbillos en el escapo floral (González y col 2009).



2.1.1 Usos del género

Desde la época prehispánica los agaves han sido usados por los seres humanos. Esto se debe a la amplia diversidad de usos que tienen estas plantas, ya que son productoras de alimento, de fibras naturales, de materia prima para elaborar bebidas alcohólicas y por su importancia reciente como plantas ornamentales (García-Mendoza, 1995) y fuente de bioenergías. El cultivo de diferentes especies de *Agave* (maguey) se desarrolló durante el florecimiento de las culturas mesoamericanas (Gentry, 1982). Al jugar un papel importante para el hombre, al proporcionarle alimento, calor, techo, vestido, medicina, bebida, uso religioso, ornato, implementos agrícolas, y otros usos diversos (García-Mendoza, 1998). Antes que el maíz se constituyera como un alimento esencial, los agaves fueron la principal fuente de carbohidratos para estas culturas (Colunga-GarcíaMarín, 2008). Sus orígenes se remontan 9,000 a 10,000 años, cuando los pueblos recolectores-cazadores empezaron a utilizarlos como fuente de bebida espirituosa (Granich, 2007). En general, antes de la llegada de los españoles a América, la utilidad de los agaves fue para la obtención de azúcares y fibras. Los magueyes mezcaleros como se conocen hoy, son resultado de miles de años de interacción con los grupos humanos que los ha seleccionado, mejorando sus características deseables, generalmente azúcares y/o fibras. En la actualidad se señalan más de 70 formas de empleo, las principales son, la obtención de bebidas alcohólicas (como el pulque), bebidas destiladas (como lo son el tequila y el mezcal) y numerosos productos derivados de fibras naturales. A menor escala se usan en la construcción, como alimento, medicina y para la elaboración de artículos domésticos (García-Mendoza, 1998). El metabolismo secundario de los agaves, es tan complejo, que incluso producen sustancias con actividad antiinflamatoria, anticonceptiva, y presumiblemente hasta anticancerígena (García, 2000). Además de emplearse para el control de la erosión y conservación de los suelos; los agaves son, frecuentemente, uno de los pocos sustentos económicos de los agricultores en regiones con suelos pobres y pocas precipitaciones (Villalobos y col., 1986).



2.1.2 Distribución

El género *Agave* es endémico de América y se distribuye en el sur de Canadá, México, Centroamérica, norte de Sudamérica e islas del Caribe (Briones y col., 2008). México se considera el centro de origen y diversificación (Vázquez-García y col., 2007), actualmente se reconocen más de 250 especies pertenecientes a este género, y en México se encuentran 75 % de las especies conocidas en el mundo, dentro de las cuales el 55 % son endémicas de este país (García y Serrano, 2009). Los estados que poseen un número mayor de representantes son, Oaxaca, Puebla, seguidos por Sonora, Jalisco, Coahuila, Chihuahua, San Luis Potosí, Nuevo León y Zacatecas (García-Mendoza, 1995). Son particularmente abundantes en matorrales xerófilos, chaparrales, bosques estacionalmente secos de *Pinus-Quercus* y bosques tropicales deciduos, pero hay especies en casi cualquier bioma (García-Mendoza, 2002).

2.2 Métodos para la propagación de plantas

La propagación de plantas consiste en efectuar su multiplicación por medio tanto sexual como asexual. De forma sexual a partir de semillas, donde se asegura la variación genética (Klug y Cummings, 1999) o bien de forma asexual empleando partes vegetativas de la planta; este último tipo de propagación es muy utilizado en muchos cultivos para mantener y explotar las características genéticas que presenta alguna planta en especial (Hartmann y col., 2002).



2.2.1 Propagación sexual

La formación de nuevas plantas a partir del cruzamiento de dos progenitores, constituye el proceso de propagación sexual. Cada progenitor aporta sus gametos (células sexuales) masculino y femenino, ello lleva al desarrollo de un embrión y posteriormente a la formación de la semilla (Bewley y Black, 1985).

2.2.2 Propagación asexual o vegetativa

Consiste en la propagación de nuevos individuos a partir de partes vegetativas de la planta original. Esta vía se utiliza para producir una planta que posea el mismo genotipo que la planta madre (planta donadora), es posible dado que en muchas de éstas, los órganos vegetativos tienen capacidad de regeneración (Mansilla, 2004). Se debe a que cada célula de la planta contiene la información genética necesaria para generar una nueva planta, esta característica es conocida como totipotencia celular (Hartmann y Kester, 1995). Según Ingram (1993), el método de propagación vegetativa más utilizado es mediante estacas o esquejes, que consiste en separar alguna porción de la planta que posea algún tipo de yema activa, como por ejemplo, trozo de tallo o raíces que tengan estos meristemos, para inducir el desarrollo del sistema radical o aéreo. Dentro de la propagación asexual *in vitro* se tiene cultivos tales como cultivo de óvulos, embriones, polen, esporas, células y tejidos (Soltero-Quintana, 2006).

2.3 El cultivo *in vitro*

El cultivo de tejidos puede definirse como un conjunto de técnicas que permiten el cultivo en condiciones asépticas de órganos, tejidos, células y protoplastos, en medios nutritivos artificiales (Pérez, 1998). Como técnica consiste en aislar una porción de la planta (explante) y proporcionarle artificialmente las condiciones físicas y químicas adecuadas. Esta técnica se ha convertido en una alternativa importante dentro de los métodos convencionales de propagación en una amplia gama de especies (Hartmann y Kester, 1995). Tiene la ventaja de producir altos números de plantas en espacios pequeños durante cualquier época del año; de



igual manera el crecimiento de las propágulos a menudo es más vigoroso que las plantas propagadas *in vivo*, debido principalmente al rejuvenecimiento de la planta y la obtención de plantas libres de enfermedades (George, 1993). El empleo de estas técnicas en aplicaciones agrícolas, puede ser muy importante en cuatro aspectos fundamentales; según refiere Santacruz-Ruvalcaba y col. (2008), la micropropagación de cultivares, la preservación de germoplasma, producción *in vitro* de metabolitos secundarios y el mejoramiento de las especies mediante ingeniería genética (Chen y col., 2014).

2.3.1 Fisiología del cultivo *in vitro*

Las tasas de crecimiento, desarrollo y muchas de las características fisiológicas y morfológicas de las plantas formadas *in vitro*, están influenciadas por el ambiente físico, químico y gaseoso que se origina dentro de los recipientes (Kozai y col., 1994). Las respuestas morfogénicas pueden ser alteradas por la temperatura de incubación (Martin, 1980), así como por la calidad, intensidad y duración de la luz (Seiber y col., 1980). Según Rakoczy-Trojanowska (2002), la eficiencia en la regeneración *in vitro* de plantas depende de las concentraciones óptimas de reguladores de crecimiento y el genotipo. El genotipo es un factor determinante en todos los procesos morfogénicos, desde la capacidad del explante para su establecimiento *in vitro*, así como para la proliferación de callo o la diferenciación y crecimiento de nuevos órganos (Rietveld y col., 1993).

2.3.2 Procesos morfogénicos en el cultivo de tejidos vegetales

El cultivo de tejidos vegetales envuelve una gama de técnicas, métodos y estrategias *in vitro*, las cuales se basan esencialmente en el cultivo de células, órganos o tejidos (Flores y Brene, 1999). Esta técnica se fundamenta en el principio de totipotencia celular (Hartmann y Kester, 1995), distinguiéndose tres métodos de micropropagación (George, 1993), estas son: Proliferación de yemas, en la cual se estimula la formación de brotes, que se desarrollan de los meristemas preexistentes en los explantes, manteniendo (en teoría) la fidelidad



genética con respecto a la planta madre. Organogénesis, que implica la obtención directa o indirecta a través de callo, de brotes y raíces a partir de segmentos carentes de meristemas. Embriogénesis somática es la tercera ruta, consiste en el desarrollo de estructuras bipolares con las características morfológicas de embriones cigóticos generados de células somáticas reprogramadas (Endress, 1994).

2.3.3 Embriogénesis somática

Entre las técnicas de regeneración se reconoce a la embriogénesis somática como la más efectiva en la obtención de plantas completas y mejoradas en poco tiempo (Pérez, 1998), y constituye un importante instrumento para el mejoramiento genético vegetal (Grapin y col., 2000). La embriogénesis somática se define como el proceso por el cual células somáticas desarrollan los estados de embriogenia y dan como resultado plantas completas sin fusión de gametos; se puede realizar de manera directa, donde el embrión somático (embrioides) se desarrolla de las células somáticas, o indirectamente mediante la obtención previa de callos (Endress, 1994). Sin embargo en ambos casos los embriones somáticos se caracterizan por ser estructuras bipolares con eje apical y radical que no poseen conexión vascular con las células maternas (Jiménez, 1999). El gran potencial de esta técnica radica, no sólo en la rapidez del proceso de propagación, sino en la calidad de los materiales que se producen (Kelly y col., 2013).

2.3.4 Propagación *in vitro* de *Agave tequilana*

En la actualidad el desarrollo de tecnologías para cultivar *in vitro* células, tejidos y órganos vegetales ha cobrado interés, ya que permite reproducir clones en tiempos y espacios mínimos. Para Santacruz-Ruvalcaba y col. (2008), las técnicas de propagación *in vitro* tienen la ventaja de producir altos números de plantas durante cualquier época del año; de este modo, el crecimiento de las plantas propagadas *in vitro* con frecuencia es más vigoroso que el de las plantas propagadas *in vivo*, debido principalmente al rejuvenecimiento de la planta y a la



obtención de plantas libres de enfermedades (George, 1993). Además estas técnicas sirven para el estudio y micropropagación *in vitro* de metabolitos secundarios o el mejoramiento mediante ingeniería genética (Domínguez-Rosales, 2008). Trabajos realizados sobre el cultivo de tejidos vegetales en agaváceas y otros géneros afines, han fijado como principal objetivo la propagación masiva de los mismos (Portillo, 1997); ya sea mediante la producción de brotes adventicios por organogénesis (Valenzuela-Sánchez y col., 2006) ó por la proliferación de yemas axilares (Robert y col., 1992) y embriogénesis somática (Portillo y Santacruz-Rubalcaba, 2006), utilizando especies de importancia económica ó de interés comercial (Santiz y col., 2012).

La propagación de *A. tequilana* por cultivo de tejidos se inició en la década de los 80 como propuesta para incrementar la cantidad de plantas seleccionadas con características deseables y homogéneas (Valenzuela, 1994). El decremento en la calidad de los propágalos y la propagación sexual limitada por problemas de polinización y viabilidad de las semillas, así como su crecimiento lento, son factores que hacen a los agaves difíciles de multiplicar masivamente por métodos convencionales (Domínguez y col., 2008). Por ello ha cobrado el interés el desarrollo de tecnologías para facilitar su manejo y mejoramiento, como el cultivo y propagación masiva *in vitro*. (Domínguez-Rosales y col., 2008). En este sentido el cultivo de tejidos constituye una de las alternativas tecnológicas más utilizadas para conseguir la propagación clonal rápida de cultivos que presentan bajos índices de multiplicación, puesto que se puede lograr la producción masiva de plantas sanas de alta calidad, libre de cualquier patógeno que pueda afectar el desarrollo y aprovechamiento del cultivo (Hurtado y Merino, 1994). Existen trabajos acerca de la propagación *in vitro* en especies de *Agave* (Robert y col., 1987; Nikam, 1997; Martínez-Palacios, 2003; Nikam y col., 2003). Particularmente para *A. tequilana* se tienen desarrollados sistemas de proliferación de yemas (Castro-Concha y col., 1990; Robert y col., 1992) y embriogénesis somática (Portillo y col., 2007). Además de la micropropagación, la biotecnología aporta otras técnicas que pueden resultar importantes para el estudio, mejoramiento y



conservación de los agaves. Entre éstas, destacan los marcadores moleculares o de ADN y la transformación genética (Domínguez y col., 2008).

2.3.5 Propagación tradicional

La propagación de *A. tequilana* se puede dar por semillas o bulbillos o más eficientemente mediante hijuelos de rizoma. Por semillas es poco utilizado por los productores, ya que al provenir de polinización cruzada puede presentar cierta variación genética en su descendencia (Portillo, 2007). Si bien es cierto que cada planta produce una gran cantidad de semillas, este procedimiento presenta las desventajas de bajos índices de germinación y alta variabilidad genética. Por lo tanto la propagación más convencional se hace mediante selección de los hijuelos de rizoma formados en la base del tallo de la planta madre (Portillo y Santacruz-Ruvalcaba, 2006). Este es el tipo de propagación más conocido y utilizado por los productores de *A. tequilana*, pues su manejo es más fácil y el establecimiento se logra más rápido, siendo el tiempo de cosecha menor (Ruvalcaba-Ruiz, 2003). Cada propágalo es en teoría genéticamente igual a la planta madre y se puede trasplantar para dar origen a una nueva planta. La producción de hijuelos por planta después de dos a tres años de haber sido cultivada, observada por los cultivadores del mezcal tequilero, coincide con lo encontrado en la literatura, en promedio entre cuatro a ocho hijuelos por rizoma Según Ruiz y col. (2000).

2.4 Técnicas de cultivo en medio líquido y sólido

Las técnicas clásicas de micropropagación de plantas requieren un medio de sustento, el cual les proporcione a las plantas, tejidos o células en cuestión, los nutrientes, agua, vitaminas y azúcares entre otros, indispensables para mantenerlos con vida y realizar los procesos morfogénicos (Soltero-Quintana, 2006). Generalmente según su consistencia es común dividirlos en dos grandes grupos: cultivos en medios sólido (semisólido dependiendo de la aplicación del agar) y cultivos en medios líquidos, donde el explante se encuentra sumergido de manera parcial (Mroginski y col, 2004). De acuerdo con George (1993) un medio



de cultivo básico está compuesto por macro y micronutrientes, vitaminas y fuentes de carbono. Las concentraciones en las cuales están dadas son necesarias para el desarrollo del explante.

2.4.1 Biorreactores de Inmersión Temporal

La micropropagación tiene un gran potencial comercial, debido a la velocidad con la que se realiza la propagación de plantas genéticamente homogéneas, por lo general de alta calidad, vigorosas y libres de enfermedades (Amhed y col., 2001). Si bien muchas de las veces el uso de esta técnica limitada a los cultivos de valor agregado, debido a los costos asociados con las técnicas convencionales *in vitro* (Escalona y col., 2003); demoran mucho tiempo y trabajo por lo que requieren de un gran número de mano de obra. Esto sin duda encarece la labor de multiplicación e incrementa los costos de producción.

En la actualidad, se favorece el desarrollo de métodos de micropropagación que utilizan medios líquidos, ya que permiten el escalonamiento de la micropropagación (Eide y col., 2003). Tal es el caso de los biorreactores de inmersión temporal (BIT), que constituyen una herramienta eficaz en la propagación de plantas *in vitro* (Aragón y col., 2004), pues aumentan su coeficiente de multiplicación y reafirman la calidad de las mismas. Estos medios de cultivo se emplean para propagar masivamente material vegetal, con la ventaja de que son sistemas semiautomatizados que permiten reducir los costos de producción y la manipulación (Etienne y Berthouly, 2002). La aplicación de la inmersión temporal, como técnica de micropropagación, constituye una de las variantes más novedosas y de gran utilidad en varios cultivos (Escalona y col., 2003). La estrategia de adaptación de las plantas a las condiciones de los biorreactores de inmersión temporal es una combinación de características morfológicas, bioquímicas y fisiológicas que permiten un uso más eficaz de los recursos del medio interno en el frasco (Aragón y col., 2004). Pues el diseño de los pequeños reactores biotecnológicos permite mantener las plantas en el mismo contenedor, durante períodos largos de tiempo mediante la renovación del medio



de cultivo, lo que hace factible la automatización del proceso (Portillo y Santacruz-Ruvalcaba, 2006).

2.5 Variación somaclonal

Durante el cultivo *in vitro* de plantas, puede existir una variabilidad genética que surge como consecuencia de la desdiferenciación celular (Medina y col., 2007). Este proceso denominado variación somaclonal por Larkin y Scowcroft (1981), involucra cambios fenotípicos y genéticos en las plantas regeneradas. Esta variación depende del genotipo, de la fuente de explante, del tiempo en que el material ha estado sometido al cultivo *in vitro*, de las condiciones y composición del medio de cultivo y de la vía de regeneración (Cardone y Picca, 2000). Por otra parte, se han descrito varios cambios genéticos responsables de la variación somaclonal en plantas, que incluyen cambios en el cariotipo, mutaciones génicas de los genomas nucleares y citoplasmáticos, translocaciones, deleciones, inversiones y modificaciones en los cromosomas (Peschke y Phillips, 1992). La variación somaclonal generalmente es espontánea y los cambios pueden ser heredables o no (Kaeppeler y col., 2000). Cuando la variación somaclonal es heredable se le asocia con rearrreglos cromosomales, deleciones y mutaciones (Sánchez-Teyer y col., 2003, Noro y col., 2007). Por otro lado, cuando la variación somaclonal no es heredable (epigenética), puede ser resultado de un cambio en la expresión de los genes, pero reversible (Kaeppeler y col., 2000; Smulders, 2005), que puede estar asociado a alteraciones en los patrones de metilación del ADN. Según Medina y col. (2007) la variación somaclonal es de interés práctico debido a su uso potencial en el mejoramiento de plantas. Puede ser utilizada como herramienta para inducir variabilidad genética y, en el mejor de los casos, obtener características agronómicas deseables (Araújo y col., 2004); en este sentido si el principal objetivo de la propagación clonal *in vitro*, es mantener por un lado la uniformidad y las características con valor agronómico, este tipo de variación es un fenómeno no deseado (Polanco y col., 2002).



2.5.1 Diversidad y variabilidad genética

La diversidad genética en sentido amplio es el componente más básico de la biodiversidad y se define como las variaciones heredables que ocurren en cada organismo, entre los individuos de una población y entre las poblaciones dentro de una especie (Piñero y col., 2008). La variabilidad genética es una medida de la tendencia de los genotipos de una población a diferenciarse y entre las poblaciones dentro de una especie (Araya, 2003). Gracias a la autoduplicación del ADN, la información genética puede pasar de una generación celular a la siguiente y de un individuo a sus descendientes (Peschke y Phillips, 1992). Gran parte de la variación en los individuos proviene de los genes, es decir, es variabilidad genética, la cual se origina por mutaciones, recombinaciones y alteraciones en el cariotipo (el número, forma, tamaño y ordenación interna de los cromosomas) (Páez y col., 2005). Los procesos que dirigen o eliminan variabilidad genética son la selección natural y la deriva genética.

La variabilidad genética permite la evolución de las especies, ya que en cada generación solamente una fracción de la población sobrevive y se reproduce transmitiendo características particulares a su progenie (Alía y col., 2003).

Las mutaciones (de cromosoma, por inserción o eliminación de fragmentos de DNA, o transposones), el flujo de genes en las poblaciones (local o a largas distancias) y la recombinación, son los principales mecanismos por los cuales se genera la variabilidad genética (Araya, 2003). Las consecuencias de estos fenómenos son los cambios en las frecuencias genotípicas y alélicas. De ahí que el conocimiento de la diversidad genética dentro y entre las poblaciones vegetales, sea de vital importancia tanto para la conservación, como para la sustentabilidad y productividad agrícola (Barraza y col., 2006).

Las técnicas de cultivo *in vitro* han abierto la posibilidad de generar cierta variación, debido a la presión de selección que se ejerce sobre los tejidos que son utilizados como explantes durante el cultivo; entre ellos, meristemos, embriones somáticos y yemas, la propia naturaleza de estos tejidos, puede significar diferentes niveles de variación de las plantas producidas (Pantaroli y Camadro,



2005). Por tal razón, las plantas producidas a través de cultivos *in vitro* deben ser evaluadas y/o monitoreadas para determinar sus niveles de integridad o estabilidad genética (Pardo y col., 2008). Esto ha sido realizado al considerar aspectos morfológicos, bioquímicos y moleculares (Hodgkin y col., 2005).

2.5.2 Medición de la variabilidad genética

Existen básicamente dos criterios en la valoración de la variación genética: la multiplicidad y la diversidad. La multiplicidad se refiere a la cantidad de variantes genéticas que contiene un grupo de individuos y la diversidad considera la frecuencia con la que están presentes las distintas variantes (Pastorino y col., 2008). De esta manera la variabilidad genética puede ser en diferentes niveles, desde el fenotipo hasta el material hereditario o ADN (Lara y col., 2003). Para conocer los niveles y patrones de variación en una especie o población en primera instancia, es por medio de la medición de análisis y características morfológicas (Márquez y col., 2007); a pesar de que estos marcadores varían con el ambiente y muchas veces dependen del estado fisiológico de las plantas (Arcade y col., 2000).

En este sentido es necesario el desarrollo de técnicas de biología molecular, que permita la detección de variabilidad y relaciones génicas entre individuos (Riasco y col., 2003), ya que encuentra diferencias a partir de un mismo genoma y se basa en secuencias tanto aleatorias como específicas, que posteriormente proporcionan una medida estimada de las diferencias a partir de la presencia o ausencia de bandas de ADN amplificadas en laboratorio (Sánchez-Chiang y Jiménez. 2009).

2.5.3 Marcadores moleculares

Los marcadores moleculares basados en ADN se definen como segmentos particulares de ADN que evidencian polimorfismos, que puede localizarse en una región codificante o no codificante y revelar la ocurrencia de cambios genéticos entre dos o más individuos (Sánchez-Chiang y Jiménez 2009). Son caracteres que diferencian a un organismo de otro y tiene gran importancia en estudios evolutivos



y de variabilidad (Azofeifa-Delgado, 2006). En general han sido difundidos gracias a estudios en genética vegetal y mejoramiento de cultivos. Técnicas como los RAPDs (Randomly Amplified Polymorphic DNA), RFLPs (Restriction Fragments Length Polymorphism), AFLPs (Amplified Fragments Length Polymorphism), SSRs (Simple Sequence Tagged Repeats), han sido implementadas en análisis de diversidad, fidelidad genética poblacional, identificaciones de genes de interés, mapeo y caracterización (Torres-Morán, 2009).), Para determinar el polimorfismo genético y los niveles de diferenciación, los marcadores moleculares se han considerado como una herramienta confiable, dado que utilizan las diferencias existentes en la secuencia del ADN, generando perfiles y huellas únicas para cada organismo (Velazco-Ramirers y col., 2014). Este tipo de tecnologías tiene aplicaciones importantes (Arnold y col., 2002), por ejemplo, la generación de huellas genéticas en variedades cultivadas, selección de caracteres deseables ligados a ciertos marcadores en programas de mejoramiento, análisis filogenéticos y el estudio de la variabilidad genética presente en poblaciones (Arnold y col., 2002; Domínguez, 2008; Torres-Morán, 2009).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Uno de los principales inconvenientes que se tiene desde que se comenzó con el cultivo de *A. tequilana*, es en el proceso productivo-agrícola, dado que la manera convencional de propagación utilizada por los productores, es de vía asexual por medio de hijuelos de rizomas, ello trae como consecuencia baja variabilidad en la materia prima, con lo cual incrementa la susceptibilidad a daños por enfermedades o plagas, además que tiene un ciclo de vida relativamente largo entre 6 y 12 años, según (Ruvalcaba-Ruiz y col. (2000), lo que suscita tiempos de cosecha muy prolongados; asimismo, limitada fertilidad como lo mencionan Alfaro y col. (2007), Domínguez-Rosales y col. (2008); ya que las prácticas culturales, eliminan la producción del escapo floral para concentrar los fotosintatos en la piña evitando el intercambio genético entre plantas. Con todo este panorama, es necesario hacer uso de la biotecnología como una alternativa sustentable que permita desarrollar y



optimizar técnicas de mejoramiento, con lo cual se generen especímenes que posean mejores cualidades, mayor resistencia a factores ambientales, enfermedades y/o plagas, en sí, variantes morfológicas deseables. Para ello hace falta primero conocer la frecuencia de variación génica que sucede en los procesos morfogénicos, como lo es la embriogénesis somática, y tener una referencia de comparación frente a los sistemas tradicionales.

4. JUSTIFICACIÓN

La embriogénesis *in vitro* tiene gran potencial como herramienta biotecnológica en la investigación, siendo un modelo que permite estudiar y entender las bases moleculares y celulares de las plantas, así como la capacidad embriogénica de las mismas. Existen evidencias publicadas sobre la variación que se genera en las plantas que son sometidas a algún proceso de cultivos de tejidos (Infante y col., 2003; Torres-Morán y col., 2005; 2007; Osorio y col., 2006), lo cual puede verse reflejado en las características fenotípicas de los individuos y puede también ser detectado a nivel molecular (Infante y col., 2007; Santacruz-Ruvalcaba y col., 2008); sin embargo, ésta variación no ha sido correlacionada con el método de propagación o no se tiene referencia de cuál de los métodos de propagación podría generar la mayor fidelidad genética entre los clones. Por tal razón se pretende implementar el cultivo de tejidos a manera de evidenciar el hecho de que la clonación de un individuo en este caso un explante de *A. tequilana* puede presentar características distintas a las de la planta original.

5. HIPÓTESIS

Hay diferencias significativas en cuanto a la variación somaclonal originada en las plantas que provienen de células desdiferenciadas de un mismo genotipo vía embriogénesis somática.



6. OBJETIVOS

Para probar la hipótesis se tiene como objetivo general:

- Desarrollar el proceso de embriogénesis somática en *Agave tequilana* Weber cv. azul, para determinar la variación somaclonal existentes en los embriones mediante análisis moleculares.

Con los objetivos específicos siguientes:

- 1. Inducir la formación de callo embriogénico a partir de explantes de raíz.
- 2. Determinar en diferentes callos la respuesta a la embriogénesis somática.
- 3. Estudiar la morfogénesis *in vitro* en los diferentes estados de desarrollo (globular, escutelar y coleoptilar) de los embriones somáticos
- 4. Evaluar el número de embriones somáticos expresados en medio sólido y líquido.
- 5. Establecer la germinación de los embriones somáticos.
- 6. Analizar la variación somaclonal de los regenerantes por embriogénesis somática en medio sólido y líquido.
- 7. Conocer la capacidad de adaptación *ex vitro* de las plántulas obtenidas de embriones somáticos.

7. METODOLOGÍA

7.1 Área de estudio

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biotecnología del Departamento de Botánica y Zoología y en el Laboratorio de Marcadores Moleculares del Departamento de Producción Agrícola, ambos del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Guadalajara, ubicado en el km 15.5 carretera Guadalajara-Nogales, Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jalisco.



7.1.1 Material Vegetal

Se trabajó con una planta de *Agave tequilana* Weber cv. azul proveniente de semilla, previamente establecida *in vitro* y micropropagada mediante proliferación de yemas axilares, de acuerdo al protocolo de Robert y col. (1987), Esta planta se identificó como genotipo ES4.

7.2 Etapa I. Inducción de callo (EI-IC)

Se realizó la inducción a partir de raíces de la planta ES4, las cuales fueron segmentadas entre 2 y 4 cm de longitud. Esta actividad se llevó a cabo en condiciones asépticas, controladas y libres de microorganismos en campana de flujo laminar, con un mechero y un equipo de disección compuesto por pinzas y bisturí, previamente esterilizados en una autoclave. Los fragmentos de raíz fueron cultivados en medio de inducción preparado con MS (Murashige y Skoog, 1962) que se utilizó en todas las fases del cultivo *in vitro* (Robert y col., 1992; 2004). Para el establecimiento del tratamiento 1 (MS-Normal), se emplearon 2.0 mg L⁻¹ de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), 0.3 mg L⁻¹ de benciladenina (BA). Para el establecimiento del tratamiento 2 (MS-322) se utilizaron 3 mg L⁻¹ de 2,4-D, 2 mg L⁻¹ de ácido naftaleneacético (ANA) y 2 mg L⁻¹ de cinetina (KIN). Ambos medios se trataron con 8 mg L⁻¹ de agar en 40 cajas Petri respectivamente y se les ajustó el pH a 5.8 ± 0.05 con hidróxido de sodio y ácido clorhídrico, según lo requería los medios. El callo se induce mediante la influencia de sustancias reguladoras del crecimiento vegetal o fitohormonas exógenas, adicionadas al medio de cultivo (Yeoman, 1970). El material fue incubado dentro de un cuarto de cultivo, el cual está bajo condiciones reguladas; con una temperatura de 25 ± 2° C con fotoperiodo de 16 h intensidad lumínica neta de 1500 lux (54 μmol s⁻¹ m⁻²).

A las cinco semanas de haberse realizado el establecimiento del material vegetal, se evaluó la respuesta regenerativa de los explantes en cuanto a la formación de callo. Por lo general, la formación de callo toma de 3 a 8 semanas, dependiendo del tipo de explante y hormona utilizada (Hurtado y Merino 1994).



7.2.1. Tinciones diferenciales

Luego de ser transferido el material vegetal en los medios de expresión, se seleccionaron callos friables, ya que esta característica se ha mencionado está asociada a la presencia de embriogénesis somática en *A. tequilana* (Portillo y col., 2007). La finalidad fue diferenciar grupos de células con estructuras bipolares, para así comparar la fase inicial de la embriogénesis somática. Se tomaron muestras muy pequeñas de células de aproximadamente 8 mm³ de callos provenientes de medios de expresión, a las cuales se les aplicó una tinción diferencial de acuerdo al protocolo de Praymod y col. (1987). El desarrollo de la técnica consistió en depositar las muestras de callo en un microtubo de 2 mL de capacidad, al cual se le agregaron dos gotas de acetocarmín al 0.5%; en seguida el tubo fue llevado a 50 ° C en baño María durante 30 s, para después pasar a la centrifuga 1500 rpm y así facilitar el lavado al separar el exceso de tinte, este paso se repitió hasta agotar la coloración, sucesivamente se añadió una gota de azul de Evans al 0.5 % como contratinción o tinte diferencial. Finalmente se removió el exceso de este colorante con dos o tres lavados de agua de manera similar como se realizó con el acetocarmín. Al final las muestras fueron depositadas en un portaobjeto para ser observadas en un microscopio óptico y ubicar así las divisiones mitóticas asimétricas o cuánticas, las cuales indican las primeras etapas de la embriogénesis somática (Margara. 1998).

7.3 Etapa II. Expresión de embriones somáticos (EII-EES)

Los explantes inducidos (Cuadro 3) fueron trasferidos a medio de expresión (MSE), bajo dos tratamientos de adenina 40 y 80 mg L⁻¹ respectivamente suplementado con 500 mg L⁻¹ de hidrolizado de caseína (HC), en medio sólido y líquido que contenían las sales básicas del medio MS, gelificado con 8 g L⁻¹ de agar, se trataron durante tres semanas. El uso de la adenina fue debido a que se reportó como potenciador de la expresión de la embriogénesis somática (Portillo, 2007). Para el medio líquido; los explantes fueron cultivados en sistema de inmersión temporal Orbitabion® con las mismas condiciones que en sólido, pero



sin agar. Las condiciones de incubación para ambos tratamientos de expresión fueron similares a las EI-IC.

7.4 Adaptación *ex vitro*

La adaptación a condiciones *ex vitro* de las plántulas provenientes de embriones somáticos de los biorreactores, así como de medio sólido, se llevó a cabo en condiciones de invernadero. Las plántulas tuvieron tratamiento previo de endurecimiento, como es recomendado por diversos autores (Murashige, 1974; Agromonte y col., 1998; Pérez-Molphe y col., 1999), para ello se utilizó medio MS sin reguladores de crecimiento, solidificado con 10 g/L de agar por 45 d. Las plántulas provenientes tanto de biorreactor como de medio sólido, se lavaron con agua tibia (30 °C) para quitar el excedente de los medios con agar. El sustrato para el establecimiento *ex vitro*, consistió en 50 % de arena y 50% de sustrato germinaza, el cual se depositó húmedo, sin esterilizar y de manera homogénea en cajas de crecimiento de 60 orificios de 100 cm³ de volumen cada uno. Estas cajas se cubrieron con bolsas de plástico con el objeto de minimizar el cambio brusco de humedad relativa, mismas que fueron eliminadas paulatinamente durante los primeros 20 d del establecimiento. El sustrato de cada plántula se humedeció cada vez que mostraba deshidratación y era llevado a capacidad de campo. La adaptación se evaluó mediante el porcentaje de las plantas que sobrevivieron.

7.5 Extracción de ácido desoxirribonucleico (ADN)

De los embriones regenerados vía embriogénesis somática, se obtuvo el ADN, de acuerdo con el método propuesto por Saghai-Marroof y col. (1984).

Para los análisis moleculares de variación somaclonal se tomaron al azar veinte muestras o brotes obtenidos del tratamiento adenina; nueve a partir de medio sólido (SOL-ES4) y diez de medio líquido (OB-ES4), como testigo se utilizó la planta madre (ES4) de los embriones somáticos, la cual se generó mediante proliferación de yemas. El protocolo de extracción se realizó a partir de 0.3 g de tejido foliar, que se colocaron en un mortero y se pulverizaron con ayuda de -



nitrógeno líquido. El amortiguador de lisis utilizado se preparó a base de CBTA 2X, (bromuro de hexadeciltrimetilamonio (w/v), 100Mm Triss-HCL (pH 8), 20 mM EDTA, 1.4 M NaCl, 10% polivinilpirrolidona (PVP 10) (w/v) 0.1% ácido ascórbico (w/v) y 10 mM de β -mercaptoetanol (Keb-Llanes y col., 2002), del cual se añadieron a la muestra en el mortero 500 μ L. Posteriormente se colocó en un microtubo adicionando 500 μ L más del amortiguador y mezcla por inversión. Se incubó durante 30 min en un baño María a 60 °C, para posteriormente agregarle un volumen equivalente de cloroformo:octanol (24:1). Luego, se centrifugó a 12,000 rpm por 10 min y el sobrenadante se transfirió a un microtubo limpio donde se repitieron los dos paso anteriores; posteriormente se precipitó el ADN agregando un volumen igual de isopropanol frío (-20°C), se mezcló por inversión y se dejó incubar a -20°C para favorecer la precipitación del ADN.

Posteriormente se centrifugó a 5,000 rpm por 5 min para después desechar la fase acuosa. Los lavados de ADN obtenido se realizaron con 800 μ L de una solución 76% EtOH/0.2 M Na-acetato y se volvió a centrifugar a la misma velocidad por 5 min. La muestra se decantó y se añadieron 500 μ L de etanol 76% con acetato de amonio 10 Mm, para después decantar y dejar secar la muestra. El paso final del protocolo es suspender el ADN en una solución que permite almacenarlo (Tris+ EDTA (TE) a temperatura de -20°C o por largo periodo de tiempo a -80°C.

7.5.1 Concentración y calidad de ADN

Para determinar la concentración y calidad del ADN se utilizaron métodos de electroforesis y espectrofotometría de acuerdo a Sambrook y Russel (2001). Las mediciones espectrofotométricas permiten determinar tanto la calidad como la concentración de ADN en la muestra, ya que se determinó al dividir la lectura de absorbancia a 260 nm entre la absorbancia a 280 nm (A_{260}/A_{280}). El cociente obtenido debe marcar un valor entre 1.8 y 2.0 que indica un balance entre las lecturas de ADN y contaminantes fenólicos y polisacáridos en la muestra (Sambrook y Russel, 2001). La absorbancia en las muestras se midió utilizando un espectrofotómetro (Jenway® mod. 6305).



Se elaboraron diluciones utilizadas para la medición espectrofotométrica, para ello se mezclaron 990 μL de agua pura y 10 μL del extracto del ADN, lo que produce una dilución 1:100, que posteriormente es usada para calcular la concentración de las muestras de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$[ADN] = 50 * Fdil * DO_{260}$$

Dónde:

50 = (50 ng/ μL) concentración de ADN en una muestra que contiene una densidad óptica de 1

Fdil = Factor de dilución

DO_{260} = Lectura de absorbancia obtenida a una longitud de onda de 260 nm

Para utilizar en la reacción de PCR, se prepararon soluciones de trabajo para cada muestra a una concentración de 25 ng/ μL

7.5.2 Amplificación por PCR para RAPD

Si bien existen varias técnicas moleculares, se eligió la técnica de RADPs ya reportada en la literatura para la especie en cuestión (Gil-Vega y col., 2001; Alfaro y col., 2007), ya que al ser una técnica con base arbitraria (Van Eck, 1999), ofrece la posibilidad de analizar al azar el material genético y encontrar de esta manera, variaciones aleatorias que se hayan generado durante el proceso de regeneración de los embriones somáticos obtenidos.

Se utilizaron como iniciadores, diez secuencias de oligonucleótidos aleatorios usados comercialmente (Operon Technologies® y Amersham®), cuyas secuencias se muestran en el (Cuadro 1).



Cuadro 1. Lista de iniciadores empleados para generar marcadores RAPD

NOMBRE	SECUENCIA	MARCA
Iniciador 6	5' [CCCGTCAGCA]3'	Amersham®
Iniciador 3	5' [GTAGACCCGT] 3'	Amersham®
T-09	5' [CACCCCTGAG] 3'	Operon Technologies®
B-11	5' [GTAGACCCGT] 3'	Operon Technologies®
T-13	5' [AGGACTGCCA] 3'	Operon Technologies®
V-19	5' [GGGTGTGCAG] 3'	Operon Technologies®
E-12	5' [TTATTCGCCCC] 3'	Operon Technologies®
V-15	5' [CAGTGCCGGT] 3'	Operon Technologies®
V-11	5' [CTCGACAGAG] 3'	Operon Technologies®
T-05	5' [GGGTTTGGCA] 3'	Operon Technologies®

7.5.3 Mezcla de reacción

Las muestras se amplificaron en un volumen de reacción de 25 µL de acuerdo al protocolo reportado por Williams y col. (1990). Esta técnica se inició con un volumen total de 25 µL, el mismo que está conformado por los componentes indicados en el (Cuadro 2).

Cuadro 2. Preparación empleada para obtención de marcadores RAPD.

Reactivo y concentración	Concentración final	Cantidad requerida
Buffer PCR 5X (MgCl ₂)	1X	5 µL
MgCl ₂ 25 Mm	3 Mm	
Taq. Polim. 5 U/U	0.1 U	0.5 µL
dNTPs 10 Mm	0.2 Mm	0.5 µL
ADN 25 ng/U	2 ng	2 µL
Iniciador Amersham 25 pmol/µL	1.5 µM	
Iniciador Operon 10 pmol/µL	1.5 µLM	

La amplificación se llevó a cabo en un termociclador (Flexigene® mod. FFG02HSA). Este procedimiento permite obtener una duplicación exponencial de la secuencia de interés, por medio de tres pasos fundamentales en un proceso cíclico de desnaturalización, alineación y polimerización, según Premoli y col. (2004). El programa utilizado fue: desnaturalización a 94 ° C por 3 min; 45 ciclos de 94 ° C por 1 min, alineación 36 ° C por 2 min; y polimerización 72 ° C por 2 min; extensión final a 72 °C por 10 min y temperatura de almacenamiento a 4 ° C.



7.5.4 Electroforesis

Los fragmentos de ADN amplificados fueron separados por electroforesis en geles de agarosa a 1.5 % (Sambrook y Russel., 1989), el cual se preparó de la siguiente manera: se añadieron 1.5 mg/mL⁻¹ de agarosa en 100 mL⁻¹ TBE buffer 1X (Buffer tris-Borato-EDTA, pH 8), calentando para licuar la mezcla. Las condiciones de corrida fueron 120 V durante por 90 min en cámara de electroforesis (Thermo Midicell® mod. EC 330). Los geles se tiñeron con bromuro de etidio (10 mg/mL⁻¹) para su visualización (Rickoow y Hames, 1990). En el primer carril del gel fue incluido un marcador de 1 kb (1000 pares de bases) como referencia.

7.5.5 Análisis de datos

Para analizar el porcentaje de explantes que formaron callo y el número de embriones somáticos, se empleó un diseño experimental bi y trifactorial con arreglo completamente al azar, así como comparación múltiple de medias de Tukey, ambos algoritmos se analizaron mediante el programa Statgraphic® v. 4.0. Para los datos moleculares se obtuvieron imágenes de los geles de agarosa, utilizando el sistema de fotodocumentación kodak® (MI Software 4.X), con el cual se generaron imágenes que fueron utilizadas para registrar tanto el número y tamaño de cada fragmento como la presencia común de bandas en los individuos analizados. Se elaboraron matrices de presencia/ausencia para cada iniciador y gel. A partir de las matrices obtenidas se calculó la similitud por medio del coeficiente de Jaccard. Posteriormente se realizó un análisis de agrupamiento por el método UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Average) con el programa NTSyS® v. 2.11, (Rohlf, 2002). Los resultados se graficaron en un dendrograma. Posteriormente se utilizó el programa STRUCTURE (Pritchard, y col., 2000; IPGRI, 2003; Evanno y col., 2005) para estimar la estructura genética de los materiales analizados. Para la aplicación del algoritmo se usaron 10⁵ iteraciones y 10⁵ repeticiones (burning periods), con simulaciones desde $K = 2$ hasta $K = 5$, donde $K =$ número de grupos.



8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Etapa I Inducción de callo (EI-IC)

La formación de callo fue evaluada en la etapa de inducción (EI-IC) al final de la quinta semana, de acuerdo a la presencia porcentual del callo. Utilizando: 0 como ausencia de callo, 1 y 2 para el callo cubriendo un área menor o mayor al 50% del área total del explante, respectivamente. De acuerdo con las observaciones realizadas se obtuvieron los siguientes resultados en esta etapa (Cuadro 3).

Cuadro 3. Respuesta de los explantes en la etapa de inducción EI-IC con diferente concentración de reguladores de crecimiento. Tratamiento 1 (medio MS-322) y tratamiento 2 (medio MS-Normal).

	Tratamiento 1	Tratamiento 2
Explantes que formaron callo	25 %	20 %
Contaminados	19 %	21 %
Sin respuesta	56 %	59 %
Tiempo transcurrido	35 d	39 d

El total de callo generado a partir de la quinta semana en la EI-IC, en el tratamiento MS-322 mantuvo una cobertura mayor al 50% de los explantes, encontrándose en el rango 1 y 2. Para el tratamiento MS-Normal el rango se mantuvo entre 0 y 1, cubriendo una superficie menor al 50% del área total. Para ambos tratamientos se obtuvieron porcentajes de inducción de callo relativamente bajos, esto se debe en gran parte al grado de deterioro que sufren los tejidos producto de una constante desdiferenciación celular ocasionada por la permanencia del cultivo *in vitro*. Para Calva (2005), el éxito en la inducción y establecimiento de cultivos de callos, y en consecuencia la subsiguiente regeneración a tejidos y plantas, son función de la calidad del explante usado, que a su vez depende de la planta madre o del tejido del que se inició el cultivo. En el



presente trabajo el tiempo que tenía el material vegetal previamente de haber sido establecido y micropropagado mediante proliferación de yemas axilares era de 11 años, derivando en un material vegetal más recalcitrante con el paso del tiempo, ya que pierde su viabilidad progresivamente y por consiguiente también pierde su capacidad embriogénica.

Nikam y col. (2003) y Calva (2005) refieren que la fuente del explante, la calidad y la concentración de reguladores de crecimiento, son factores importantes al momento de la inducción. Del mismo modo la interacción y balance entre reguladores de crecimiento, incide en la respuesta *in vitro* de células, tejidos y órganos (George, 1993). Al observar los resultados en cuanto a la cantidad de callo formado, la producción que se encontró en ambos tratamientos fue limitada, como resultado de la poca desorganización celular presentada en los tejidos. La capacidad de respuesta ante los reguladores de crecimiento empleados (auxinas y citocininas), no se observó como se esperaba, posiblemente contribuido por la poca viabilidad y condición fisiológica de los explantes mencionados.

La prueba de “t” de Student indicó que entre ambos tratamiento existió una diferencia significativa ($p = 0.0200$), aunque de manera visual ambos tratamientos produjeron un número promedio similar de callo por repetición (3.76 explantes con el tratamiento 322 y 3.00 explantes con el tratamiento MS-Normal), lo que sugiere que el desempeño del tratamiento 322 es superior al tratamiento MS-Normal.

En los explantes que se generó callo, éste tuvo la apariencia típica de aquellos con características embriogénicas, de un callo blancuzco y friable (Calva 2005); presentando células con una proliferación continua, acelerada y de apariencia desorganizada, dando origen a una masa amorfa (Figura 1a, b y c) y varios tipos de callo, desde el típico color blanco hasta pasar por el color crema a beige claro, así como callo lustroso (Figura 2a), compacto e incluso fotosintético (Figura 2b). Sobre la superficie de los callos en algunos se observó rizogénesis, cuyas formas radiculares presentaron pelos absorbentes (Figura 2c), así como protuberancias que indican la incipiente formación de estructuras embriogénicas (Portillo y col., 2007) (Figura 2d).

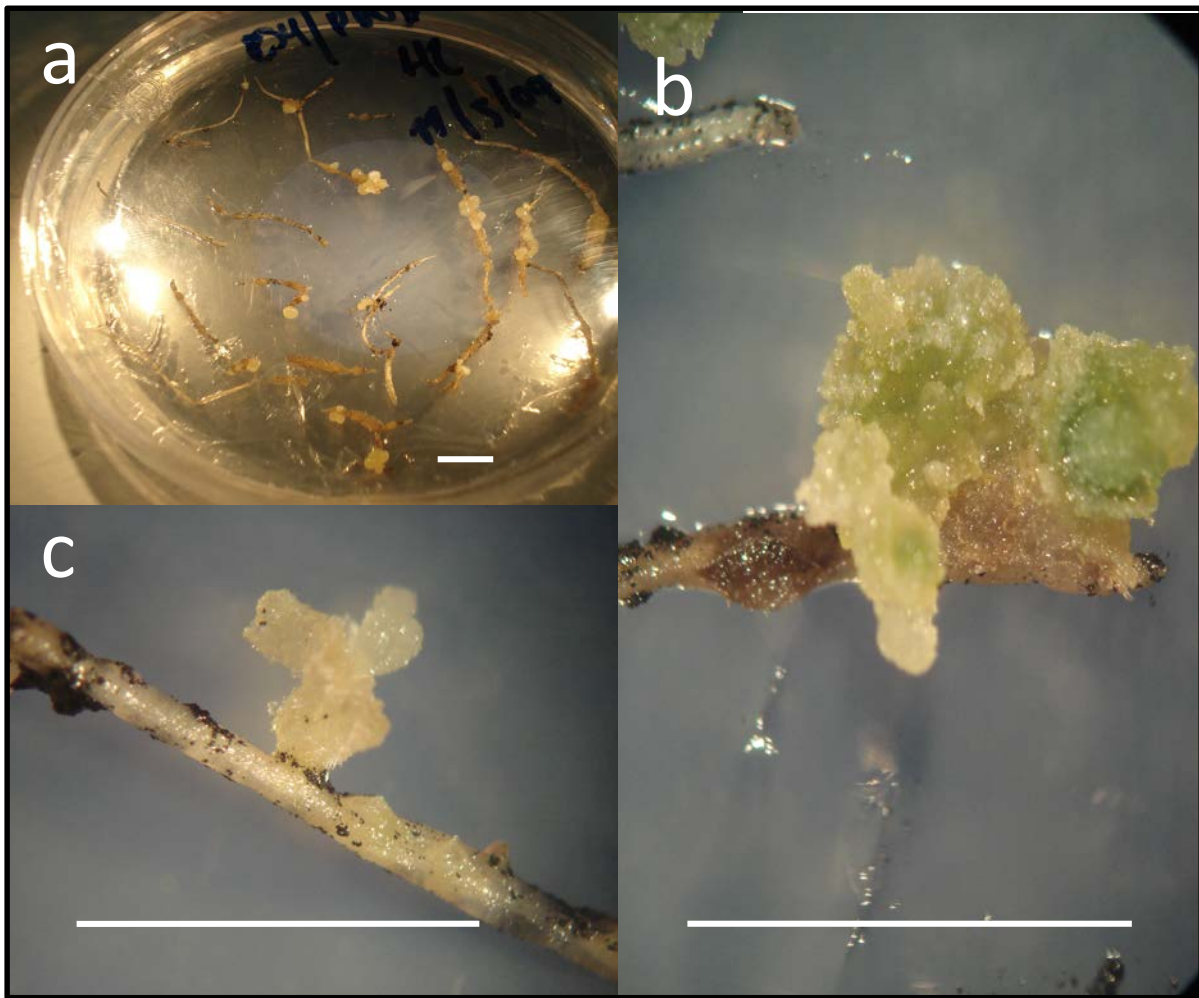


Figura 1. Cultivo de explantes de raíz de *Agave tequilana* Weber con presencia de callo con características embriogénicas. a) Vista general, b) Vista en detalle y c) Típica coloración de callo embriogénico. Barras = 1 cm.

Es importante hacer énfasis en el hecho de que si bien se persigue la proliferación de callo, también se trata de evitar otros problemas colaterales, como la oxidación de los mismos, porque es un problema serio, que provoca la muerte de los tejidos, al dañar la maquina fotosintética de las células (Chakrabarty y col., 2006), lo que impide el crecimiento. La presencia de callo oxidado fue muy recurrente en los explantes de raíz, inhibiendo el crecimiento de la masa celular, presentándose oscurecimiento del tejido producto de la oxidación fenólica (Sotolongo y col., 2003) y en otros casos la necrosis y muerte del tejido. Por otro lado la contaminación presentada fue consecuentemente producto de una manipulación inadecuada.

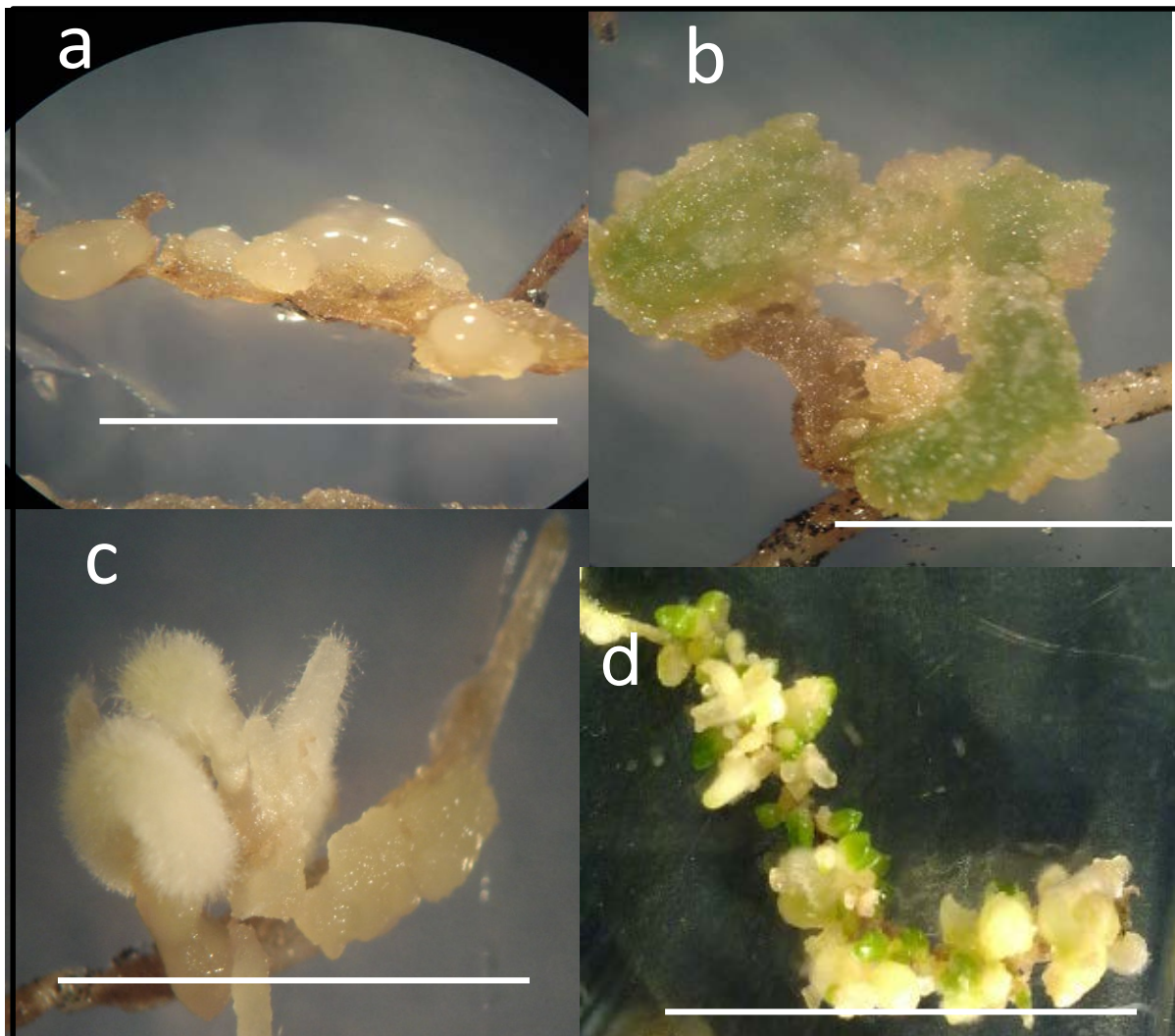


Figura 2. Distintos tipos de callos de *Agave tequilana* Weber generados con los tratamientos de inducción. a) Lustroso, b) Fotosintético, c) Organogénico y d) Embriogénico. Barras = 1 cm.

8.1.2 Tinciones diferenciales

En relación a los estudios citológicos con acetocarmin al 0.5% y azul de Evans al 0.5 % como contratinción, los explantes de callo friable embriogénico mostraron células en división activa, asimétricas, citoplasma denso y pared celular definida (Figura 3a); lo que parece indicar que se trata de células embriogénicas (Urdaneta y col., 2006) con mitosis cuántica, pero también con mitosis proliferativa.

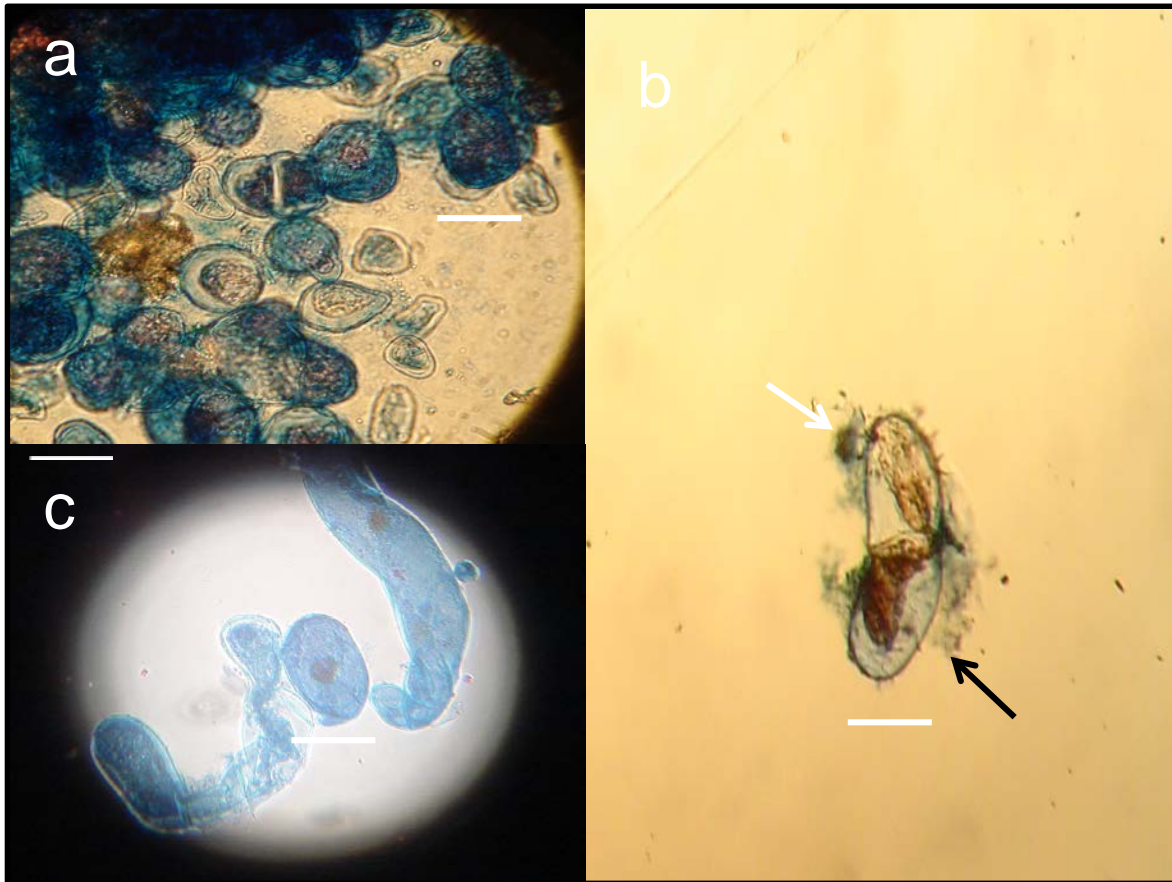


Figura 3. Tinción diferencial en células de callos de *Agave tequilana* Weber. a) Vista a detalle de grupo de células en tinción diferencial, b) Célula con división asimétrica (flecha blanca: célula apical teñida de acetocarmin, flecha negra: célula basal teñida de azul de Evans), c) Células no embriogénicas con división lenta, que muestran el citoplasma en azul y el núcleo en rojo. Barras = 0.1 mm.

El procedimiento de la doble tinción permitió determinar el potencial embriogénico de las células y distinguir los callos embriogénicos de los no embriogénicos, ya que conforme con lo esperado, el acetocarmin tiñó el núcleo y las glicoproteínas de color rojo intenso; mientras que el azul de Evans, tiñó las vacuolas del citoplasma, que corresponden a la célula apical y célula basal, respectivamente (Figuras 3b).

Las células sin capacidad embriogénica se mostraron altamente diferenciadas y vacuoladas presentaron una división mitótica lenta como referente manifestaron como color único al azul de Evans (Figura 3c). Esto demuestra que en un mismo



callo pueden existir células con capacidad embriogénica y células no embriogénicas.

8.2 Etapa II expresión de embriones somáticos (EII- EES)

Durante las primeras cinco semanas de inducción en presencia de reguladores de crecimiento, fue evidente la presencia de callos compactos y callos friables (Figura 4a); sin embargo, al inicio de la quinta semana se comenzó a observar una degradación del callo (oxidación y necrosamiento) (Figura 4b). Cuando los callos se transfirieron al medio de expresión MSE en ausencia de reguladores de crecimiento, se observó la aparición de estructuras embriogénicas (Figura 4c). La expresión de los embriones somáticos se inició aproximadamente a los 15 d después de haber sido transferidos los callos al medio de expresión, una vez cumplido el período de inducción. Estos resultados fueron acordes con lo encontrado para la maduración y germinación de embriones somáticos reportados por Hurtado y Merino (1994), en el sentido de que los embriones se presentan sin influencia de reguladores de crecimiento, o mínima presencia de éstos.

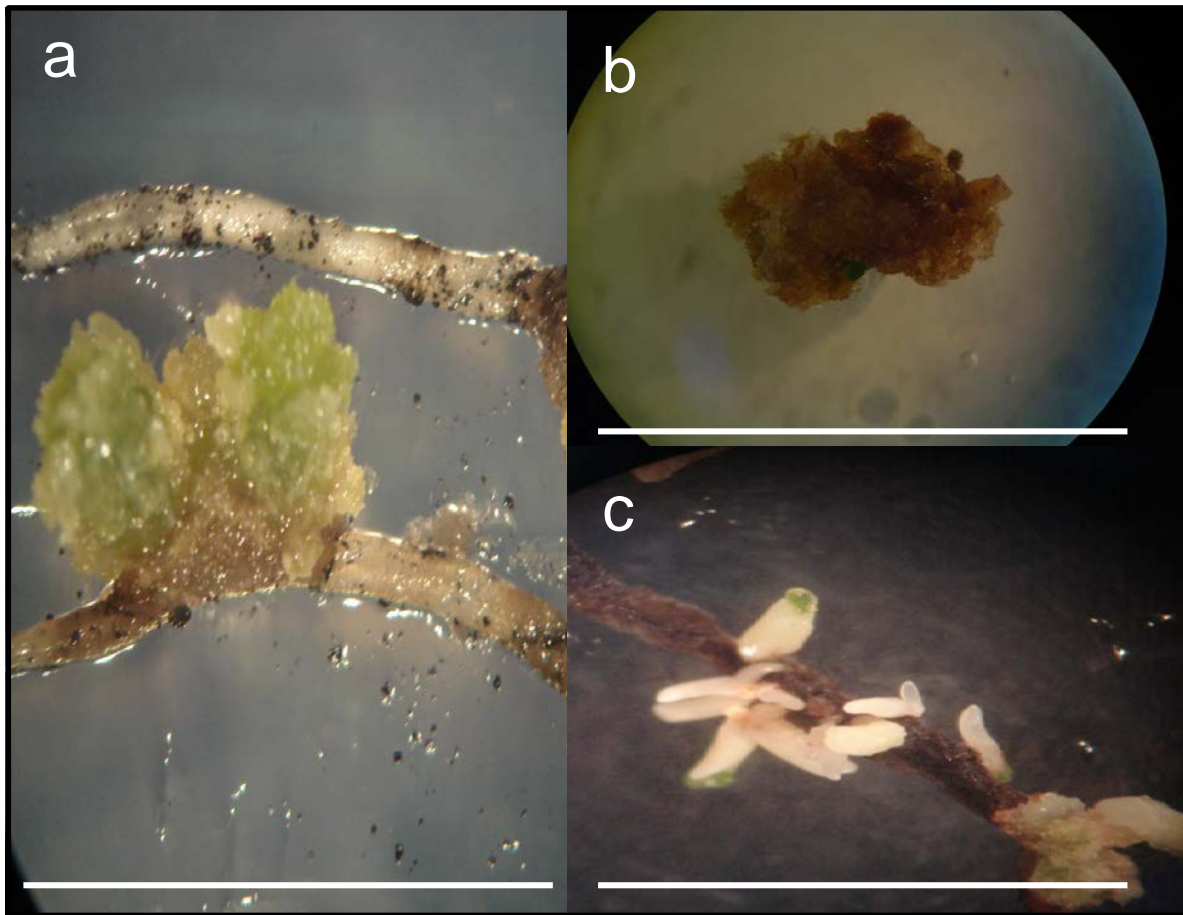


Figura 4. Diferentes aspectos de la embriogénesis somática de *Agave tequilana* Weber, a) Masa amorfa de células desorganizadas, b) Callo oxidado, c) Embriones somáticos. Barras = 1 cm.

La respuesta de los callos cultivados en medios sólidos y líquidos en Orbitabion® (OB), varió en el número de embriones somáticos generados (Figura 5).

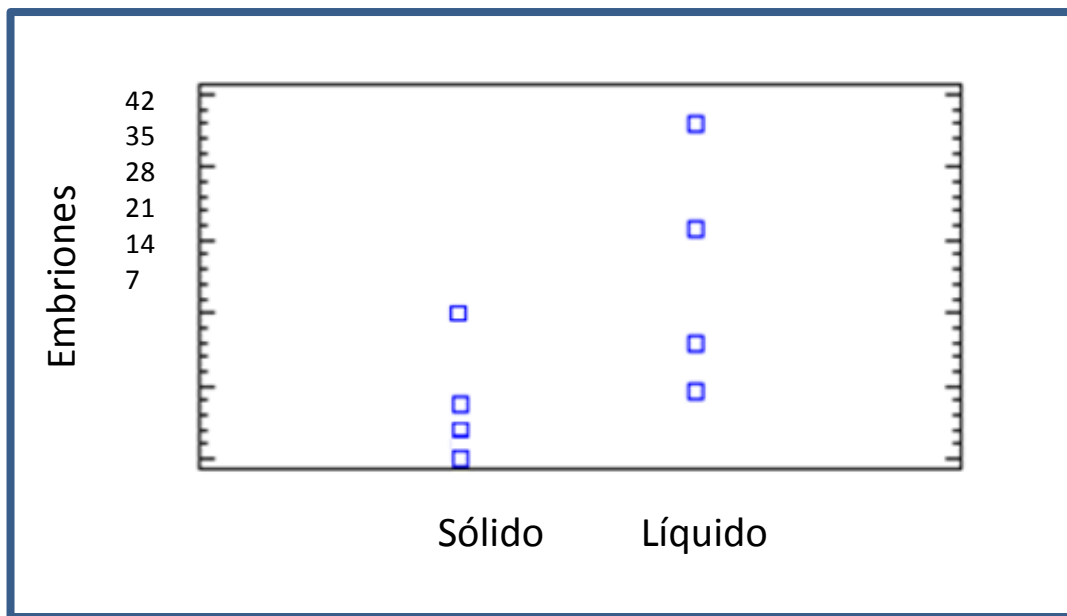


Figura 5. Representación gráfica del número de embriones somáticos obtenidos en medio sólido y líquido en Orbitabion®.

Se encontró una diferencia significancia al 95% de confiabilidad ($p = 0.0332$), el efecto fue más evidente para el medio líquido en OB, en promedio el número de embriones germinados fue más alto que los obtenidos en medio sólido (Cuadro 4). Mientras tanto las dosis de adenina no mostraron diferencia significativa ($p = 0.1079$). Al parecer la formación de embriones somáticos está más ligada al tipo del medio que a los componentes.

De lo anterior, queda claro que es importante encontrar condiciones de cultivo no sólo para que las células crezcan y se dividan rápidamente, sino también para que la mayor parte de ellas expresen su capacidad de rediferenciación y biosíntesis (Juárez y Carrillo-Castañeda, 2003) La interacción de ambos factores tampoco arrojó diferencia estadística ($p= 0.1956$).



Cuadro 4. Promedio de embriones somáticos generados en dos tratamientos (medios sólido y líquido en Orbitabion®) con diferente dosis de adenina.

Tipo de medio	Dosis de adenina	Promedio de embriones Obtenidos
Sólido	80 mg L	23.0
	40 mg L	20.0
Líquido	80 mg L	50.5
	40 mg L	29.5

En la mayoría de los embriones somáticos (ES) se observaron entre los 80 y 100 d de cultivo los tres estados de desarrollo conocidos (Figura 6). En monocotiledóneas el patrón de desarrollo de los embriones, tanto cigóticos como somáticos comprende los estados, globular, escutelar y el estado de coleoptilo (Gray 2000).

Su presencia ocurrió de la siguiente manera: Las divisiones asimétricas se presentaron en la contra tinción, como células rojizas, esféricas o alargadas (Figura 5a); el estado globular (Figura 6b) corresponde según a lo citado por Praymod y col., (1987). Embriones de tipo escutelar (Figura 6c); con cierto hundimiento longitudinal, con una estructura aún más desarrollada a la etapa que le antecede pero con apariencia limitada aún no definida. Embriones del tipo coleoptilar; (Figura 6d) caracterizados por ser alargados, con la hendidura ubicada en el extremo terminal del mismo que separará al escutelo del coleoptilo; ésta se forma al final de la fase de regeneración, indicando que el embrión ya está listo para pasar a la fase de germinación.

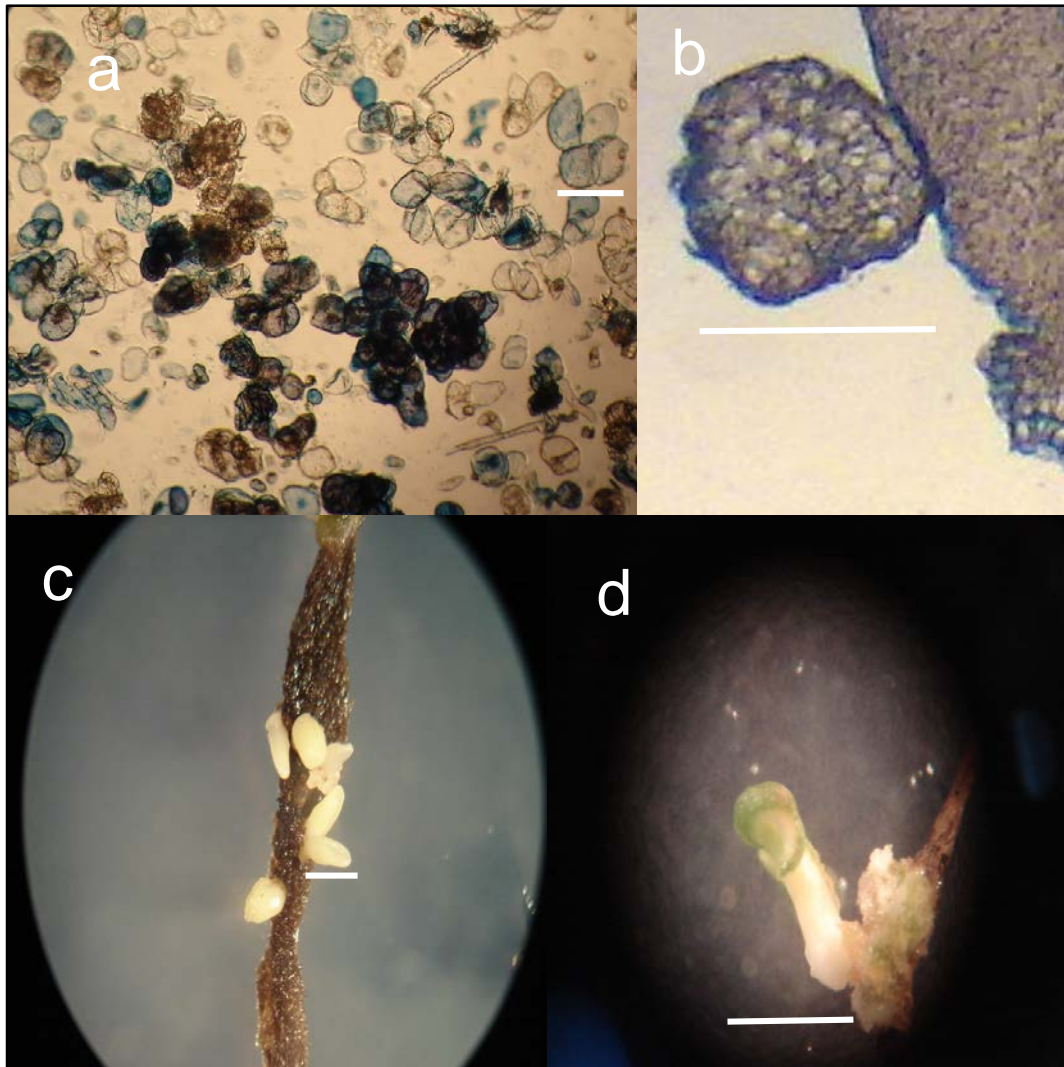


Figura 6. Diferentes estados de desarrollo morfológico de embriones somáticos de *Agave tequilana* Weber a) Células con división asimétrica, b) Estado globular (tomado de Monroy y col., 2010), Barras 0.01 mm. c) Estado escutelar, d) Estado coleoptilar. Barras = 1 mm.

8.2.2 Capacidad de conversión a plántula completa

La germinación de los embriones somáticos constituye uno de los pasos más importantes para validar *in vitro* cualquier proceso embriogénico. Al finalizar la etapa EII-EES, los embriones bien diferenciados se aislaron del medio de regeneración y una vez germinados, se cultivaron de forma individual (Figura 7). Se obtuvieron dos líneas de regenerantes, para los análisis de variación génica. La primer línea asignada (SOL-ES4), SOL por el medio de cultivo donde fue desarrollada y ES4 por el genotipo embriogénico donde provinieron los explantes,



en este caso la planta madre. La segunda (OB-ES4), denominada OB por el sistema de inmersión temporal (Orbitabion®) con medio líquido, línea que se originó del mismo genotipo embriogénico ES4.



Figura 7. Plántulas regeneradas a partir de embriones somáticos de *Agave tequilana* Weber.

8.3 Adaptación *ex vitro*

De las plantas obtenidas *in vitro* se efectuó la aclimatación o adaptación gradual (ver materiales y métodos) a las condiciones medioambientales del invernadero (Figura 8). Las técnicas de aclimatación permitieron la adaptación de la planta a un crecimiento autótrofo, en ambientes de menor humedad relativa, con más luz y sustratos sépticos.



Figura 8. Adaptación de plantas jóvenes de *Agave tequilana* Weber al ambiente *ex vitro*.

La sobrevivencia de las plántulas establecidas fue superior al 99%, las cuales luego de cinco meses se trasplantaron a macetas más grandes para su posterior establecimiento en suelo (Figura 9). Estas plantas vigorosas que midieron aproximadamente de 20 a 30 cm de altura se consideraron establecidas y/o adaptadas y listas para ser llevadas a plantación.



Figura 9. Plantas adultas de *Agave tequilana* Weber obtenidas mediante micropropagación con adaptación *ex vitro*.

8.4 Calidad y concentración del ADN

En la figura 10, se muestra el ADN genómico obtenido de cada individuo estudiado. El análisis visual de los geles indicó la presencia de bandas de alto peso molecular ($< 10,000$ pb), aunque no se observó banda evidente en los individuos 8, 15 y 19. Sin embargo, las lecturas mostraron que si había ADN presente en las muestras mencionadas (Cuadro 5).

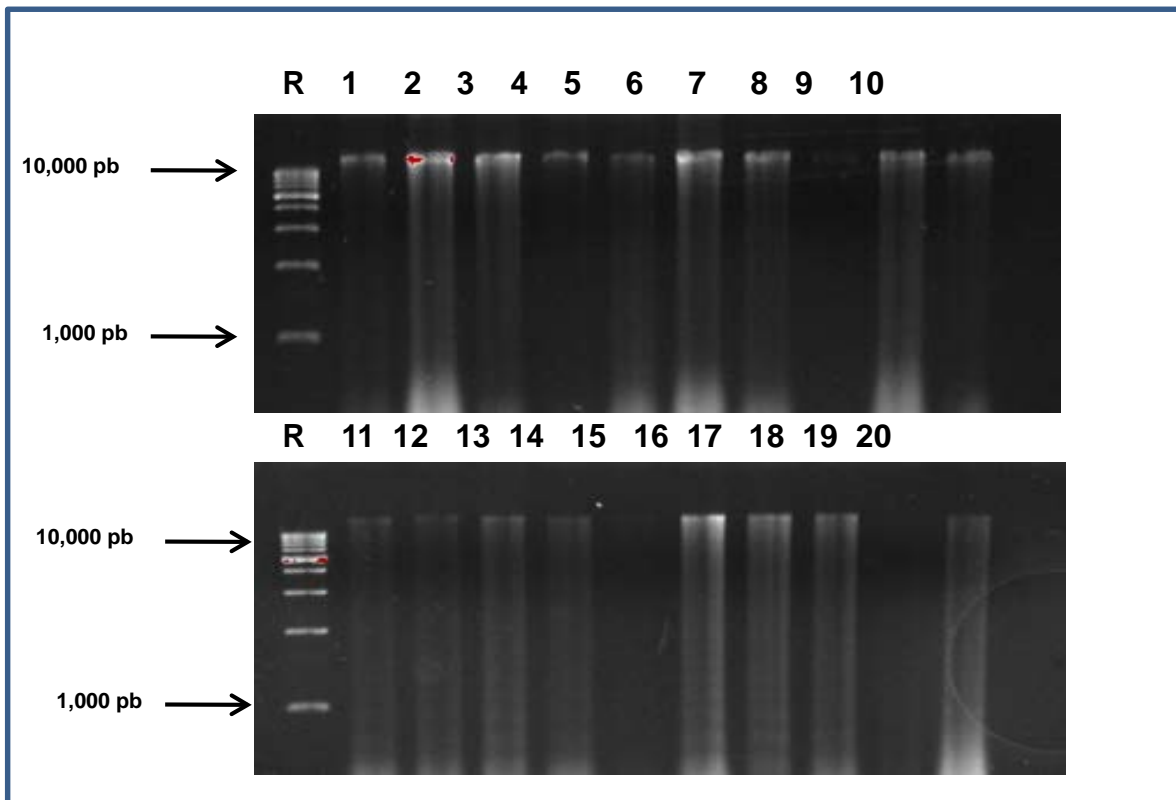


Figura 10. Electroforesis en geles de agarosa 1.5 % de ADN de diecinueve embriones somáticos y una yema axilar de *Agave tequilana* Weber. Carriles: 1 = Madre; 2 a10 = OB1-9; muestras 11 a 20 = SOL; R = Marcador de 1 kb (1000 pb).

En la figura anterior, se muestra también la presencia de barridos que indican contaminantes en las muestras, probablemente polisacáridos contenidos en las hojas del agave, por lo que se indica en las mediciones de calidad (Cuadro 5).



Cuadro 5. Calidad y concentración del ADN extraído.

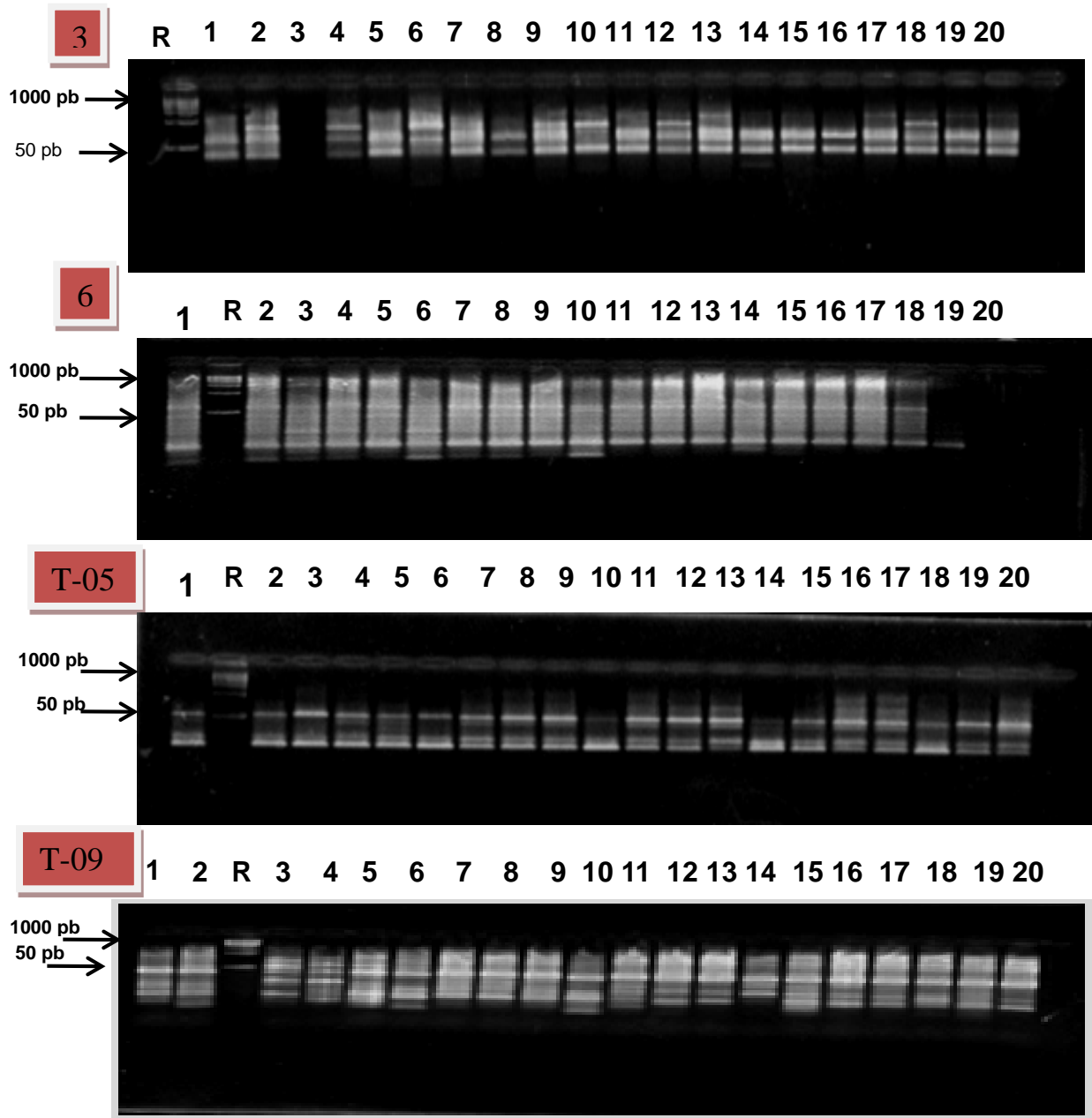
Muestra	DO260	DO280	DO260/DO280	Concentración ng/ML
Madre	0.09	0.058	1.5	495
OB1	0.049	0.038	1.2	245
OB2	0.093	0.047	1.9	465
OB3	0.040	0.030	1.3	200
OB4	0.070	0.036	1.9	350
OB5	0.096	0.050	1.9	480
OB6	0.104	0.067	1.5	520
OB7	0.100	0.053	1.8	500
OB8	0.040	0.024	1.6	200
OB9	0.072	0.052	1.3	360
OB10	0.102	0.047	2.1	510
SOL1	0.069	0.072	0.9	345
SOL2	0.070	0.055	1.2	350
SOL3	0.051	0.043	1.1	255
SOL4	0.073	0.051	1.4	365
SOL5	0.028	0.033	0.8	140
SOL6	0.078	0.053	1.4	390
SOL7	0.074	0.048	1.3	320
SOL8	0.070	0.053	1.3	350
SOL9	0.023	0.044	1.6	115
Promedio			1.4	

En el cuadro 5 se muestra la pureza del ADN aislado, que se midió con el cociente DO_{260}/DO_{280} que produjo valores que van desde 0.6 en la muestra SOL1 hasta 2.1 en OB10. Con un promedio de valor de absorbancia de 1.4, cabe destacar que no se alcanzó el rango óptimo que se esperaba de (1.8 y 2) de acuerdo con Sambrook y Russell (2001).



8.4.1 Patrones de amplificación RAPD

Los iniciadores utilizados para el presente trabajo, produjeron patrones de amplificación diferentes en cada caso y mostraron bandas diferenciales para algunos individuos analizados (Figura 11). El porcentaje de polimorfismo detectado fue diferente para cada caso y se reporta en el (Cuadro 6).



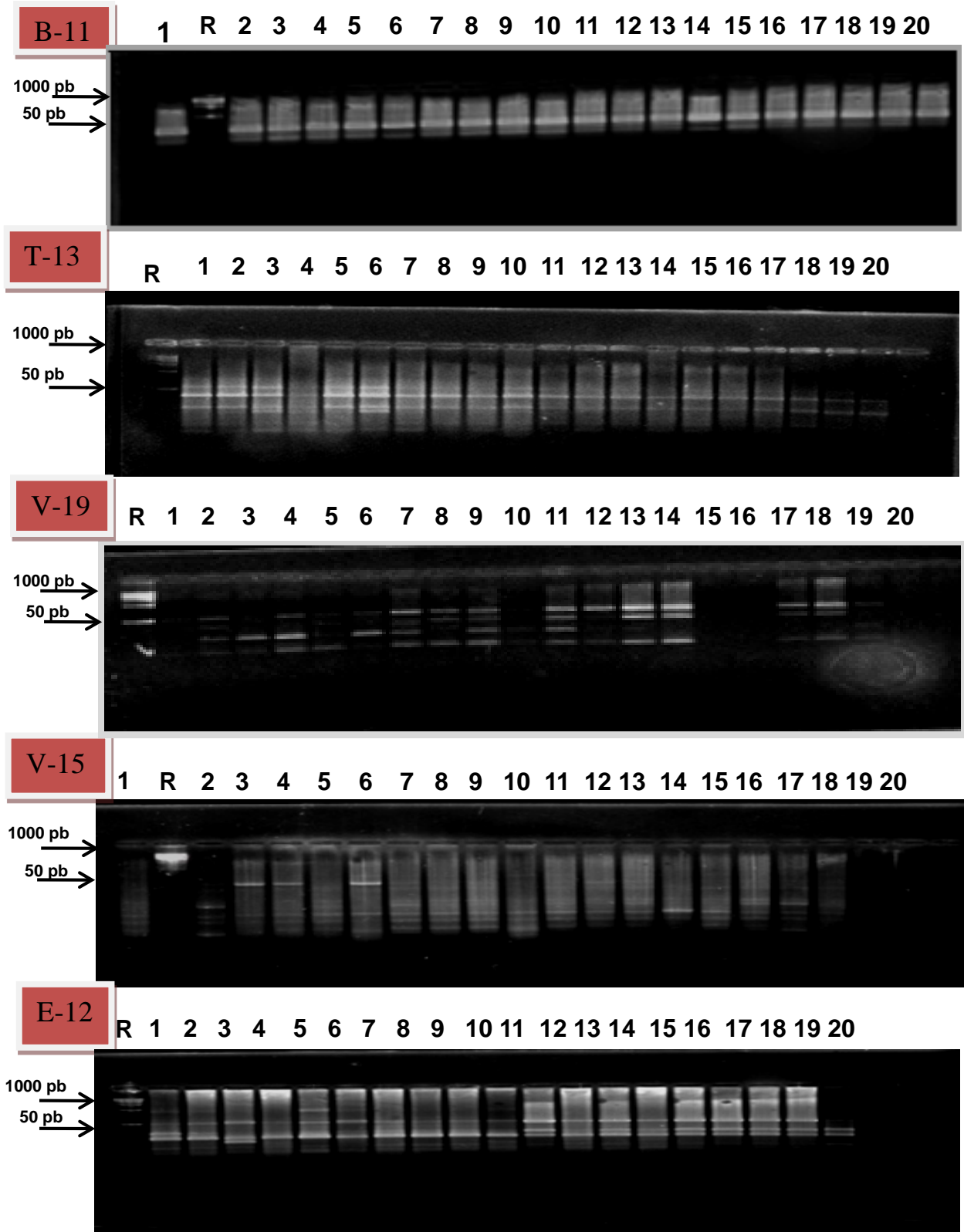


Figura 11. Patrón de amplificación obtenido con los distintos iniciadores en los diecinueve embriones somáticos y una yema axilar de *Agave tequilana* Weber. Carril R = Marcador 1



kb (1000 pb); carril 1 = Madre; del 2 a 10 = Productos de Orbitabion® y 11 a 20 de medio sólido.

Se realizó la estimación del tamaño molecular de cada uno de los fragmentos amplificados, con los diferentes iniciadores usados, cuyo peso molecular por banda fluctuó entre 50 y 1000 pb.

8.5 Análisis estadístico

A partir de los geles, se generaron un total de 229 bandas, de las cuales 69 fueron monomórficas y 169 polimórficas, lo que representa un 67.5 % de polimorfismo en promedio (Cuadro 6). La matriz fue constituida a partir de los productos amplificados.

Cuadro 6. Productos RADP amplificados con nueve iniciadores.

Iniciador	Bandas amplificadas		Polimorfismo
	Total de Bandas producidas	Bandas Polimórficas	%
6	19	12	63.0
E-12	29	17	58.0
T-05	27	24	88.0
T -09	32	29	90.0
T-13	27	9	33.0
B-11	18	12	66.0
V-19	27	22	81.0
V-15	31	22	70.0
3	22	13	59.0
Promedio	25.7	16.4	67.5



8.6 Análisis de similitud y agrupamiento

El análisis de similitud con el método UPGMA reunió a los individuos generados por embriogénesis somática en dos grupos principales, dependiendo el sistema con el que fueron producidos, es decir, un grupo formado por los individuos del medio sólido y otro correspondiente al medio OB (Figura 12). A su vez derivando en cuatro subgrupos consecuentes.

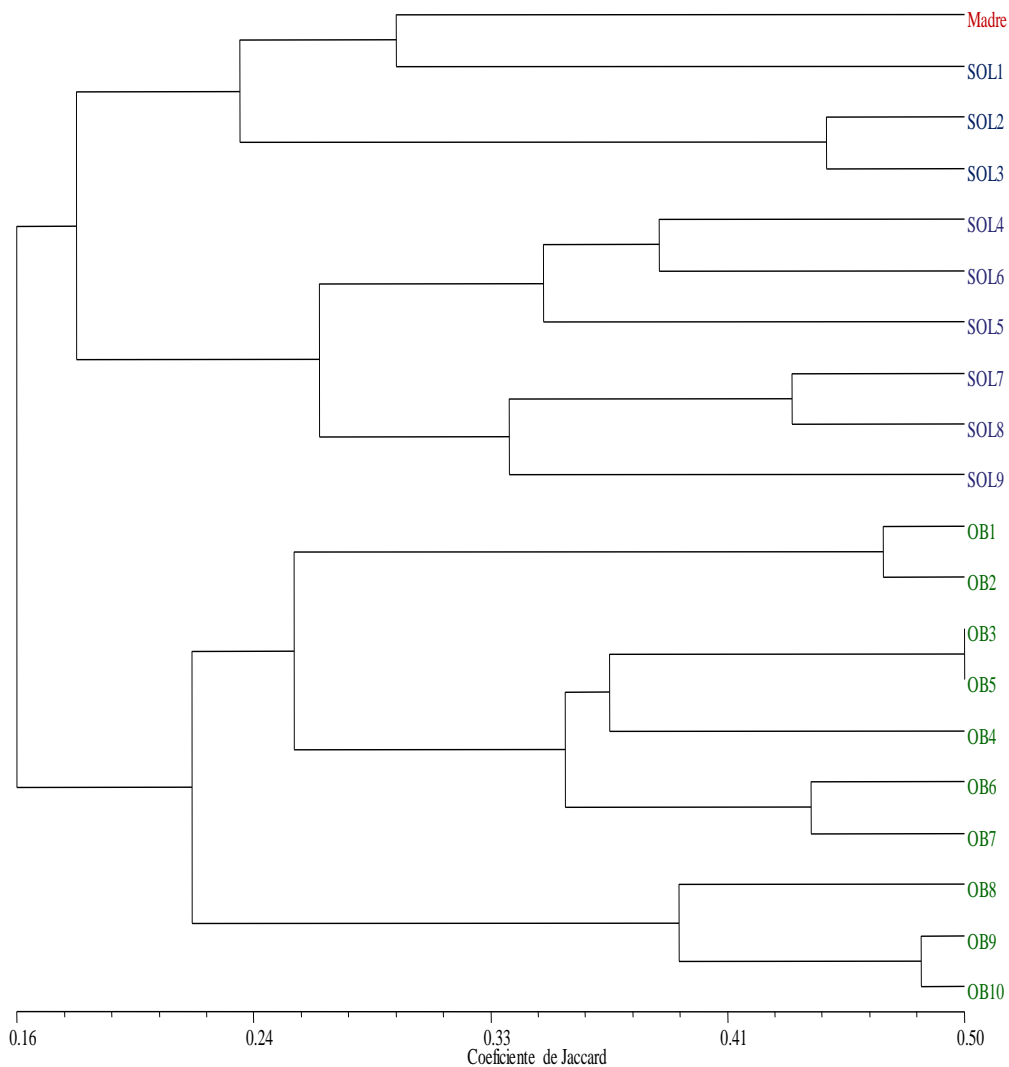


Figura 12. Dendrograma que muestra el agrupamiento de individuos de *Agave tequilana* Weber generados por embriogénesis somática mediante dos métodos de cultivo (medios sólido y líquido en Orbitabion®).



El análisis de similitud mostró valores que van de 0.16 a 0.50, por tanto no hay individuos que se asemejen en un 100%, considerando la región del genoma analizada con las secuencias aleatorias de los RAPD. Esto es un indicador inicial de cambios en los individuos estudiados debidos a variación somaclonal. A nivel 0.50 del coeficiente de similitud, sólo los individuos OB3 y OB5 son iguales, siendo ambos provenientes de medio líquido en OB, el resto son diferentes. Resultados similares se encontraron con marcadores moleculares con base en retrotransposones, donde los embriones regenerados presentaron un coeficiente de variación de 0.40 a 0.85 (Portillo, 2007), lo que sugiere que el proceso de variación somaclonal en *A. tequilana* ocurre en diferentes regiones del ADN.

Con el programa Structure se obtuvo un diferencial entre los individuos provenientes de los dos sistemas de expresión: en medios sólido y líquido OB, agrupándolos en categorías de acuerdo al nivel de discrepancia presentado para cada uno (Figura13). Este análisis mostró para $K = 2$ una separación clara entre la población de embriones somáticos originados en medio sólido con respecto a los originados en medio líquido. En $K = 3$ muestra un análisis de tres grupos (sólido, líquido y una tercera subdivisión con características compartidas), formación que se atribuye a la variabilidad de los individuos somáticos en términos de bandas RAPDS. En $K = 4$ muestra la separación clara de 19 embriones somáticos en cuatro grupos y una yema axilar de *A. tequilana* de la cual procedieron (Madre), dicha separación corresponde a la separación observada en el dendrograma (Figura 12). Para $K = 5$ muestra subdivisiones de los grupos que van más allá del objetivo de este trabajo

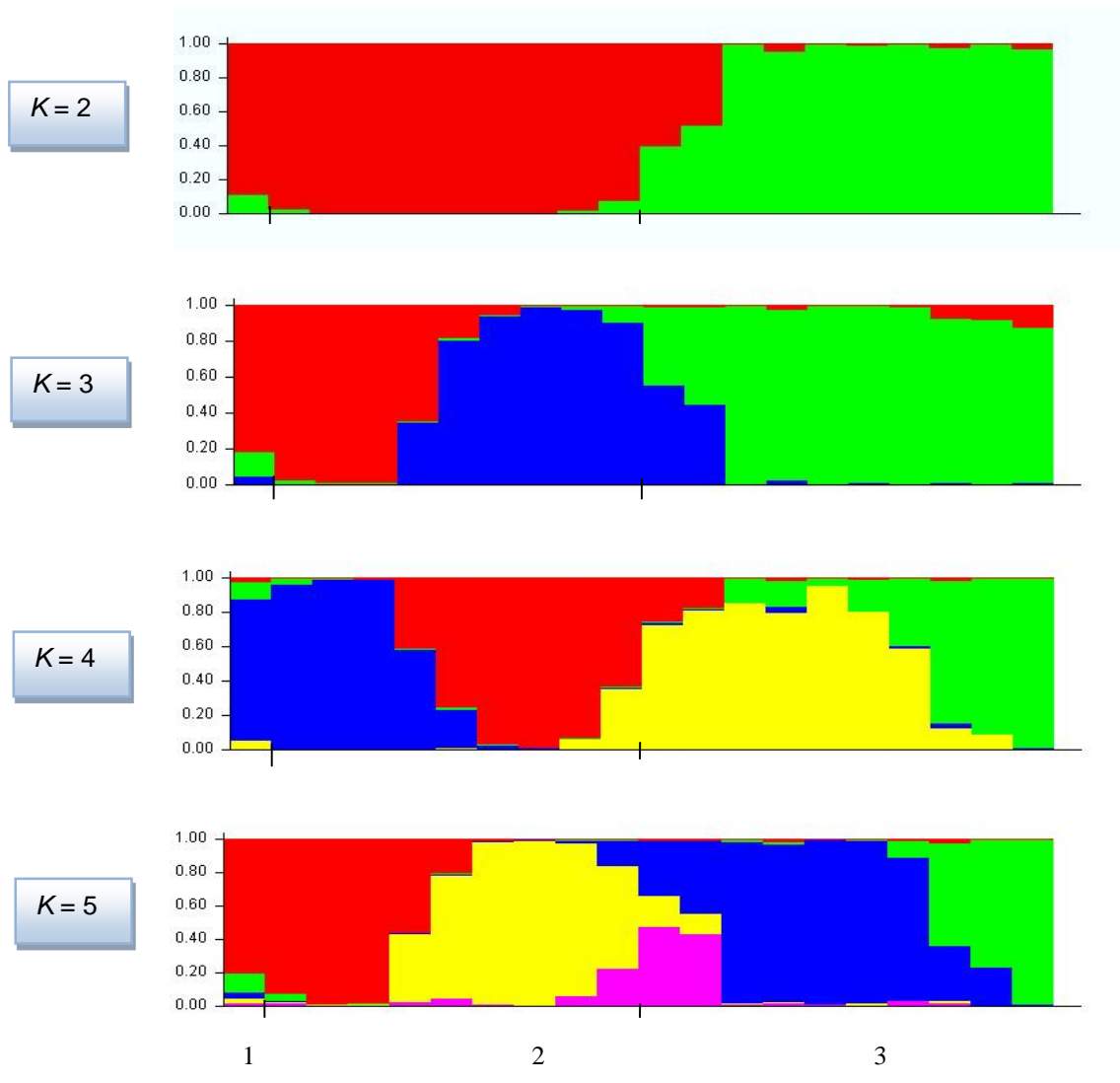


Figura 13. Representación gráfica de la estructura genética de los 19 embriones somáticos y una yema axilar de *Agave tequilana*, donde muestra cuatro simulaciones ($K = 2$ a $K = 5$). En cada simulación (K) se presentan los grupos simulados con diferente color de acuerdo a su procedencia de medio de expresión (sólido en rojo y líquido en verde para $K = 2$, y para los individuos con características compartidas de $K = 3$ a $K = 5$, en azul, amarillo y rosa). 1) Madre. 2) individuos originados en medio sólido. 3) individuos originados en Orbitación®.

Este resultado sugiere que las plantas regeneradas *in vitro* consideradas en este estudio, representa una separación clara respecto al origen de expresión de los materiales (embriones expresados en medio sólido y en medio líquido con biorreactores Orbitación®, con respecto a la planta madre), los valores proporcionados por el programa, indicaron que el número adecuado de grupos es



$K = 4$, lo cual concuerda con expuesto con el análisis de agrupamiento UPGMA. Los 7 meses del período de regeneración de los somaclones pudo contribuir a las variaciones encontradas en el presente trabajo. Este dato concuerda con resultados previos de análisis con RAPD, en los cuales se ha demostrado, que la frecuencia de variación aumenta significativamente con la duración del cultivo *in vitro* (Barrier y Dulieu, 1980). Otros factores que también influyen en la aparición de un mayor o menor grado de variación es el genotipo (Rietveld y col., 1993); método de cultivo *in vitro* empleado (Sánchez-Chiang y Jiménez, 2009); estado fisiológico del cultivo (Cardone y Pica, 2000), y algunos componentes del medio (Rakoczy-Trojanowska, 2002; Sahijram y col., 2003). Estos factores están relacionados con los resultados de la presente tesis, ya que la separación de los embriones somáticos de acuerdo a su origen del método de regeneración, señala que los factores de cultivo en medio líquido en los biorreactores, ofrecen condiciones para que la variación somaclonal se presente en mayor grado. Uno de los factores más evidentes en los medios líquidos, es el cambio de la fisiología que conlleva a la generación de aberraciones (Ziv, 2002).

Los resultados demuestran que los marcadores RAPDs pueden ser utilizados para determinar la variabilidad genética de plantas *A. tequilana* obtenidas por embriogénesis somática, pues aunque sólo se probaron nueve iniciadores, se observó alto nivel de polimorfismo entre los somaclones, así como al compararlos con la planta madre. La variación somaclonal detectada con RAPDs en el presente trabajo, contrasta ampliamente con el reporte de Gil-Vega y col. (2001), en el sentido de que con el mismo sistema de marcadores moleculares, no se encontraron diferencias genéticas significativas; sin embargo, con otros marcadores moleculares si se encontraron diferencias (Gil-Vega y col., 2006). Lo anterior se puede explicar a que se han usado diferentes combinaciones de iniciadores, así como al uso de material vegetal con diferente origen (proveniente de campo y por cultivo de tejidos vegetales).



9. CONCLUSIONES

1. Se logró la embriogénesis somática en *A. tequilana* el proceso ocurrió de manera satisfactoria de acuerdo a lo esperado. Aunque cabe mencionar que en la etapa de desorganización celular, el material vegetal incurrió en algunas dificultades al momento de la inducción, como fue oxidación y la poca generación de callo. Posiblemente por ser un material recalcitrante debido al grado de variación somaclonal que sufrieron los tejidos producto de una constante manejo y permanencia del cultivo *in vitro*.
2. La generación de callo fue mejor con el tratamiento 322 (3 mg L⁻¹ de 2,4-D, 2 mg L⁻¹ de ANA y 2 mg L⁻¹ de KIN) que con MS, referido en la literatura para el cultivo de *Agave tequilana*. En ambos tratamientos se generó todo tipo de callo desde el típico color blanco hasta el color crema a beige claro, así como callo lustroso, compacto e incluso fotosintético.
3. En el callo embriogénico se comprobó mediante tinciones a partir de la presencia de células inducidas hacia la embriogénesis, mostrando las divisiones asimétricas que originan los embriones somáticos.
4. La germinación y desarrollo de embriones somáticos ocurrió sin mayor problema. Se probaron tratamientos en sistemas de inmersión temporal Orbitabión® como en medio sólido. La expresión de embriones fue mayor en medio líquido que los reportados en medio sólido.
5. El éxito de sobrevivencia *in vitro* a *ex vitro* fue superior al 90%.
6. De las 19 plántulas adultas obtenidas se logró la extracción de ADN genómico, resultando y la amplificación con los 9 iniciadores RAPDs. Se detectó un alto polimorfismo entre las plantas a partir de la comparación de los diferentes iniciadores.
7. El análisis por agrupamiento UPGMA encontró la separación de cuatro grupos producidos por dos métodos de regeneración sólido y líquido.



8. Hubo concordancia con lo observado en el dendrograma y el comportamiento de la representación Structure, mostrando que el grado de variación somaclonal originada en todo el proceso de cultivo *in vitro* de *A. tequilana* es alto.
9. Como era de esperarse el método de embriogénesis somática introdujo un alto grado de variación somaclonal, donde cada individuo se comporta como genotipo único. El sistema de inmersión temporal empleado Orbitabion® generó mayor variación.



10. LITERATURA CITADA

- Agromonte, P., F. Jiménez, M. Dita. 1998. A climatización. En: Pérez-Ponce, J. Propagación y mejora genética de plantas por Biotecnología. Instituto de Biotecnología de las plantas. Cuba. 193-206p.
- Alfaro, G., J. Legarúa, J. Rodríguez. 2007. Diversidad genética en poblaciones de Agaves pulqueros (*Agave spp*) del noriente del estado de México. Rev. Fitotec. Mex 30 (001): 1-12.
- Alía, R., D. Agundez, N. Alba, C. González, A. Soto. 2003. Variabilidad genética y gestión forestal. Rev. Ecosistemas. 7(3): 1-8.
- Amhed, Z., F. Akhter, S. Haque, H. Banu, M. Rahman, M. Faruquzzaman. 2001. Novel Micropropagation System. Journal of Biological Sciences1 (11): 1106-1111.
- Aragón, C., M. Escalona, I. Capote, D. Pina, I. Cejas, J. Gonzales. 2004. Evaluación del efecto de las condiciones generadas por Biorreactores de inmersión temporal sobre enzimas y procesos clave del metabolismo del carbono en plantas *in vitro* de plátano cv. Biotecnología vegetal. 4 (3): 147-152.
- Arnold, C., J. Macnally, J. Henry. 2002. The application of SSRs characterized for grape (*Vitisvinifera*) to conservation studies in Vitaceae. Am. J. Bot. 89: 22-28.
- Araújo, L., A. Prabhu, P. Arraes-Pereira. 2004. RAPD marker linked to a gene conferring resistance to raceI^B-9 of *Pyriculariagriseain* somaclones of the rice cultivar Araguaia. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 78: 151-158.
- Araya, C. 2003. Coevolución de Interacciones Hospedante-Patógeno en Frijol Común. Fitopatol. Bras. 28(3): 222-234.
- Arcade, A., F. Anselin, F. Rampant, C. Lesage, E. Paques, D. Prant. 2000. Application of AFLP and RAPD and ISSR markers to genetic mapping of European AND Japonase larch. Theor. Appl. Genet. 100: 299-307.
- Azofeifa-Delgado, A. 2006. Uso demarcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. Agronomía Mesoamericana 17: 221-242.
- Barraza, A., F. Lorenzo, M. Robert, M. Esqueda, A. Gardea. 2006. Variabilidad genética en *Agave angustifolia* haw. De la sierra sonorensis de México. Determinada con marcadores AFLP. Rev. Fitotec. Mex. 29(001): 1-8.
- Barrier, M., H. Dulieu. 1980. Effects génétiques observés sur des plantes de tabac régénérées a partir decotyledons par culture *in vitro*. Ann Amél. Plant. 30: 321-344.



- Bewley, J., M. Black. 1985. Seeds: Physiology of development and germination. Plenus press. New York 367p.
- Briones, E., A. León, M. Terrones. 2008. Análisis proteómico de hojas de *Agave tequilana* En: XXVII CONGRESO NACIONAL de Bioquímica. Mérida Yucatán. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica IPIC y T San Luis Potosí, México 2008.1-2 p.
- Calva, G. 2005. Cultivo de células y tejidos vegetales: fuente de alimento para el futuro. Rev. Digital Universitaria. 6(11): 2-16.
- Cardone, S., S. Picca. 2000. Biotecnología y mejoramiento vegetal. INTA, Argentina. 445p.
- Castro-Concha L., M. Loya-Varga, J. Chan, M. Robert. 1990. Glutamate dehydrogenase activity in normal and vitrified plants of *Agave tequilana* Weber propagated *in vitro*. Plnt. Cell. Tiss. Org. Cult. 22: 147-151.
- Chakrabarty, D., S. Park, M. Ali, S. Shin, K. Paek. 2006. Hiperhydricity in apple: Ultrastructural and physiological aspects. Tree Physiology 26(3): 377-388.
- Chen, Y., X. Chen, F. Hu, H. Yang, L. Yue, R. Trigiano, Z. Ming. 2014. Micropropagation of *Agave Americana*. Hort Science 49(3):320-327.
- Colunga-García M., P., A. Larque, L. Eguiarte, D. Zizumbo. 2007. En lo ancestral hay futuro: del tequila, los mezcales y otros agaves. México D.F 322p.
- Consejo Regulador del Tequila, A. C. 2000. Estadísticas de producción, exportación y consumo de materias primas para la elaboración de tequila. Guadalajara, Jalisco, México. <http://www.crt.org.mx> [consulta: 20 febrero de 2009].
- Domínguez, S., L. Gonzalez, R. Citlalli, C. Valles, S. Díaz, S. Ordaz, E. Pérez. 2008. El cultivo *in vitro* como herramienta para el aprovechamiento, mejoramiento y conservación de especies de género *Agave*. Investigación y Ciencia 16:41 53-62.
- Domínguez-Rosales, M., A. Añpuche, L. Nora, V. Méndez. 2008. Efecto de citocininas en la propagación *in vitro* de Agaves Mexicanos. Rev. Fitotec. Mex. 31(4): 317-322.
- Eguiarte, L., A. Silva, V. Souza. 2000. Biología evolutiva de la familia Agavaceae: biología reproductiva, genética de poblaciones y filogenia. Boletín de la Sociedad Botánica de México. 166: 131-150.



- Eide, C., P. Munster, R. Heyerdahl, O. Lyngved. 2003. Liquid Culture Systems for Plant Propagation. ISHS Acta Horticulturae 625: XXVI International Horticultural Congress: Biotechnology in Horticultural Crop Improvement: Achievements, Opportunities and Limitations.
- Endress, R. 1994. Plant Cell Biotechnology. Springer-Verlag. Berlin, Alemania. 353 p.
- Escalona, M., I. Cejas, J. González-Olmedo, I. Capote, S. Roels, M. Cañal, R. Rodríguez J. Sandoval. 2003. The effect of meta-topolin on plantain propagation using a Temporary Immersion Bioreactor. Infomusa 12 (2): 28-30.
- Etienne, H., M. Berthouly. 2002. Temporary immersion systems in plant micropropagation. Plant Cell Tissue Organ Cult. 69(3): 215-231.
- Flores, D., J. Brenes. 1999. Producción en Invernadero de semilla de papa a partir de vitroplantas. Instituto Tecnológico de Costa Rica Centro de Información Tecnológica. Serie Información Tecnología Apropiaada N° 26. 5.
- Flores, D., A. Abdelnour. 2000. Manual de Laboratorio de Cultivo de Tejidos II. Instituto Tecnológico de Costa Rica, Escuela de Biología. 11p.
- Fucikovsky, Z. 2004. *Agave tequilana* Weber var. azul y sus principales problemas fitosanitarios. En: Avances de la investigación en el agave tequilero. Consejo Regulador del Tequila A. C. Guadalajara, México. 147-178p.
- García, M., H. Serrano. 2009. Tres agaves importantes en la agroindustria. Tecno Agro 48(3): 4-6.
- García-Mendoza, A. 1995. Riqueza y endemismos de la familia Agavaceae en México. En: Conservación de Plantas en peligro de extinción. UNAM. México, D.F. 51-71p.
- García-Mendoza, A. 1998. Con sabor a Maguey, guía de colección nacional de Agaváceas y Nolináceas del Jardín Botánico del Instituto de Biología-UNAM, México D.F 105p.
- García-Mendoza, A. 2002. Distribution of *Agave* (Agavaceae) in Mexico. Cactus and Succulent Journal 4:177-188.
- García, D., A. Quílez, M. Sáenz, M. Martínez-Domínguez .2000. De la Puerta R. Anti-inflammatory activity of *Agave intermixta* Trel. and *Cissussicyoides* L., species used in the Caribbean traditional medicine. J Ethnopharmacol. 71(3): 395-400.
- Gentry, H. 1982. *Agaves of Continental North America*. The University of Arizona Press, Tucson, Arizona. 670 p.



- George, E. 1993. Plant propagation by tissue cultures. The Technology. Exegetics. Ltd. Edington. Inglaterra. 274-243 p.
- Gil-Vega, K., M. González-Chavira, O. Martínez-de la Vega, J. Simpson, G. Vandemark. 2001. Analysis of genetic diversity in *Agave tequilanavar*. Azul using RAPD markers. *Euphytica* 119: 335-34.
- González, M., R. Galván, E. López, L. Resendiz, M. Socorro. 2009. Agaves-magueyes, lechuguillas y noas del estado de Durango. Instituto Politécnico Nacional. México, D.F. 163 p.
- Grabin, A., J. Ortiz, T. Lescot, N. Ferriere, F. Cote. 2000. Recovery and regeneration of embryogenic cultures from female flowers of false horn plantain. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 61: 237-244.
- Granich, C. 2007 *Campesinos y la tradición mezcalera mexicana*. México D.F. 250 p.
- Gray, D. 2000. Nonzygotic embryogenesis. In: concepts and laboratory exercises. Boca Ratón, Florida. CRC, Press. 189 p.
- Guillot, D., P. Meer. 2006. Claves del genero *Agave* cultivadas como ornamentales en la península ibérica. Barcelona España 346p.
- Hartmann, H., E. Kester. 1995. Propagación de plantas. Principios y Prácticas. México. D.F. Continental. 760 p.
- Hartmann, H., E. Kester, F. Davis, R. Geneve. 2002. Plant propagation principles and practices. 879 p.
- Hodgkin, T., R. Roviglioni, M. Vicente, N. Dudnik. 2005. Molecular methods in the conservation and use of plant genetic resources. *Acta Horticulture* 546: 107-118.
- Hurtado, M., M. Merino. 1994. Cultivo de tejidos vegetales. Trillas. México D.F. 25-99p.
- Infante, D., G. González, L. Peraza-Echeverria, M. Keb-Llanes. 2003. Asexual genetic variability in *Agave fourcroydes*. *Plant Science* 164: 223-230.
- Infante, D., M. Osorio, S. Molina, G. González. 2007. Genetic improvement of asexually propagated plants. *ISHS Acta Horticulturae* 738: 920-922.
- Ingram, D. 1993. Propagation by Cuttings. New York. McGraw- Hill. 545p.
- IPGRI, 2003. Genetic diversity analysis with molecular marker data: Learning Module. IPGRI and Cornell University. 71p.



- Jiménez, V. 1999. Embriogénesis Somática. Instituto Tecnológico de Costa Rica, Escuela de Biología. Cartago, Costa Rica. 11p.
- Juárez, J., G. Carrillo-Castañeda. 2003. Producción de biomasa y capacidad de rediferenciación en cultivos *in vitro* de caña de azúcar sometidos a estrés por cloruro de sodio y kanamicina. Colegio de Posgraduados. 20: 155-159.
- Kaepler, S., H. Rhee. 2000. Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. *Plant Molecular Biology* 43: 179-188.
- Keb-Llanes, M., B. González, Chi-Manzanero, D. Infante. 2002. A rapid and simple method for small-scale DNA extraction in Agavaceae and other tropical plants. *Plant Mol. Biol. Rep.* 20: 299-300.
- Kelly, M., M. Mio, M. Robert. 2013. Direct somatic embryogenesis of *Agave Fourcroydes* Lem. Through thin cell layer culture. *In Vitro. Cell.Dev.Biol. Plant.* 49: 541-549.
- Klug, W., M. Cummings. 1999. Conceptos de genética. Prentice Hall Ibero. Madrid España. 840p.
- Kozai, T., B. Jeong, C. Kubota, Y. Murai. 1994. Effects of volume and initial strength of medium on the growth, photosynthesis and ion uptake of potato (*Solanum tuberosum*) plantlets in vitro. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 64(1): 63-71.
- Lara, A., R. Valverde, O. Rocha, L. Gómez. 2003. Variabilidad y diferenciación génica en cuatro poblaciones de la planta medicinal *Psychotria acuminata*. En Costa Rica. *Agronomía Costarricense* 27(2): 29-42
- Larkin, P., Scowcroft. 1981. Somaclonal variation a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theor. Appl. Genet.* 60: 197-214.
- Margara, J. 1998. Multiplicación vegetativa y cultivo *in vitro*. Mundi-Prensa. 232p.
- Martin, S. 1980. Mass culture systems for plant cell suspensions. En: Staba E. J. *Plant tissue culture as a source of biochemicals*. C.R.C. Press. Inc. Boca Raton. Florida., U.S.A. 149-166p.
- Martínez, A., J. Pastrana, A. Sánchez, J. Lara, L. Herrera, A. Herrera, O. Martínez, J. Simpson. 2007. Geonómica de *Agave tequilana*: identificación de genes útiles para la industria tequilera y desarrollo de usos alternativos del agave. Colegio de posgraduados. Campus Campeche, México. 19p.
- Martínez-Palacios, A., M. Ortega-Larrocea, V. Chávez, R. Bye. 2003. Somatic embryogenesis and organogenesis of *Agave victoria-reginae*: consideration of its conservation. *Plant Cell. Tiss. Org. Cult.* 74: 135-142.



- Mansilla, A. 2004. Propagación vegetativa mediante estaquillado en especies nativas de los géneros *Mutisia*, *Escalloniay* *Gaultheria*. Tesis de Lic. Valdivia Chile. Universidad Austral de Chile. 65p.
- Márquez, J., V. Rebolledo, J. Contreras. 2007. Variación de conos de *Pinus oaxacana* Mirov. En una población de los molinos, municipio de perote Veracruz. *Foresta veracruzana*. 9(2): 45-50.
- Medina, C., I. García, M. Caro, F. Aristizibal. 2007. Análisis AFLP de variación somaclonal en embriones somáticos de *Hevea brasiliensis*. *Rev. Col. Cienc. Quim. Farm.* 36(1): 70-80.
- Monroy, F., H. Palacios, F. Zamora, L. Portillo. 2010. Uso de polietilenglicol para cortes histológicos en embriogénesis somática de *Agave tequilana* Weber. *Bol. Nakari*, 21(1): 1-4.
- Mondal, T., A. Bhattacharya, M. Laxmicumaran, P. Ahuja. 2004. Recent advances of tea (*Camellia sinensis*) biotechnology: Plant cell, tissue and Organ culture. 76(3): 195-252.
- Mroginski, L., P. Sansberro, E. Flaschland. 2004. Establecimiento de cultivo de tejidos vegetales. En: *Biotecnología y mejoramiento vegetal*. Corrientes, Argentina. 445p
- Murashige, T. 1974. Plant propagation through tissues. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 25:135-166.
- Murashige, T., F. Skoog. 1962. A revised médium for rapid growth and bioassays with tabaco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-479.
- Nikam, T. 1997. High frequency. Shoot regeneration in *Agave sisalana*. *Plant Cell. Tiss. Org. Cult.* 51: 225-228.
- Nikam, T., M. Bansude, K. Aneesh. 2003. Somatic embryogenesis in sisal (*Agave sisalana* Perr. Ex. Engelm) *Plant Cell Rep.* 22:188-194.
- Nobel, P., T. Hartsock. 1976. Watering converts a CAM plants to daytime CO₂ uptake. *Nature* 262: 574-576.
- Noro, Y., T. Takano-Shimizu, S. Syono, Y. Kishima, Y. Sano. 2007. Genetic variations in rice *in vitro* cultures at the *EPSPs-ORPS20* region. *Theoretical and Applied Genetics* 114: 705–711.
- Ozório Z., M. D, Infante S., Molina M. 2006. Estudio de la variabilidad genética asexual en *Agave cocui* Trelease mediante el uso de marcadores moleculares. *Bol. Nakari*. 17(1): 1-7.



- Páez, O., R. Valverde, L. Gómez, A. Brenes. 2005. Diversidad genética de aislamientos de *Phytophthora infestans* en plantaciones de papa en Costa Rica con el uso de RADPS. *Agronomía Costarricense* 29(1): 41-55.
- Pantaroli, A., E. Camadro. 2005. Somaclonal variation in *Asparagus officinalis* plants regenerated by organogenesis from long-term callus cultures. *Genetic Molecular Biology*. 28(3): 423-430.
- Pardo, A., C. Michelangeli, C. Ramis, N. Mogollon, C. Silva. 2008. Evaluación de la estabilidad genética mediante marcadores RAPD en brotes de *Billbergia rosea* Hortus Ex Beer, conservados *in vitro*. *Bioagro* 20(2): 97-102.
- Pastorino, M., M. Florencia, V. Postler. 2008. Criterios Genéticos para la Gestión de los Bosques. *Bioagro* 21(4): 85-112.
- Pérez, J. 1998. Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Santa Clara Cuba. Instituto de Biología de las Plantas. 390p.
- Pérez-Molphe, E., R. Ramírez-Malagon, G. Núñez-Palenius, N. Ochoa-Alejo. 1999. Introducción al cultivo de tejidos vegetales. Universidad Autónoma de Aguascalientes. 179p.
- Peschke, M., R. Phillips. 1992. Genetic variations of somaclonal variation in plants. *Advances in Genetics* 30: 41-75.
- Piñero, D., A. Barahona, L. Euguiarte, A. Rocha, R. Salas. 2008. La variabilidad genética de las especies: aspectos conceptuales y sus aplicaciones y perspectivas en México, en *Capital natural de México, Conocimiento actual de la biodiversidad*. Conabio, México. 1: 415-435p.
- Polanco, C., M. Ruiz. 2002. AFLP analysis of somaclonal variation in *Arabidopsis thaliana* regenerated plants, *Plant Science*, 17: 162-817.
- Portillo, L. 1997. Embriogénesis somática indirecta en *Agave tequilana* Weber: efecto de auxinas. Tesis de maestría. Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías, Universidad de Guadalajara. 65p.
- Portillo, L., F. Santacruz-Ruvalcaba. 2006. Factibilidad de uso de un Nuevo sistema de inmersión temporal (Orbitabion®) para embriogénesis somática de *Agave tequilana* Weber. *Bol. Nakari* 17(2): 43-48.
- Portillo, L., F. Santacruz-Ruvalcaba. 2006. Obtención de embriones de *Agave tequilana* weber a partir de explantes de raíz. *Zonas Áridas* N°10. 19.



- Portillo, L., F. Santacruz-Ruvalcaba, A. Gutiérrez-Mora, B. Rodríguez-Garay. 2007. Somatic embryogenesis in *Agave tequilana* Weber cultivar azul. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*. 43(6): 569-575.
- Portillo, L. 2007. Morfogénesis y variación somaclonal de embrioides de *Agave tequilana* Weber cv. Azul en biorreactores de inmersión temporal. Tesis de doctorado. Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías, Universidad de Guadalajara. 115 p.
- Praymod, K., P. Gupta, D. Durzan. 1987. Biotechnology of somatic polyembryogenesis and plantlet regeneration in loblolly pine. *Bio/Technology* 5: 147-151.
- Premoli, G., A. González, B. Mendoza, T. Percoco. 2004 Diagnóstico de *Helicobacter pylori* mediante la reacción en cadena de la polimerasa. *Rev Cubana Med Trop*. 56: 85-90.
- Rakoczy-Trojanowska, M. 2002. The effects of growth regulators on somaclonal variation in rye (*Secale cereale* L.) and selection of somaclonal variants with increased agronomic traits. *Cellular and Molecular Biology Letters* 7: 1111–1120.
- Riasco, J., J. Victoria, F. Angel. 2003. Diversidad génica en variedades de caña de azúcar *Saccharum spp* usando marcadores moleculares. *Rev. Colombiana de biotecnología*. 5(1): 6-15.
- Rickoow, D., B. Hames, 1990. Gel electrophoresis of nucleic acids: A practical approach. Oxford University Press. U.S.A. 65-66 p.
- Rietveld, C., A. Brassan, P. Hassegawa .1993. Somaclonal variation in tuber disc-derives populationsof potato. II Differential effect of genotype. *Theor. Appl. Genet.*, 87: 305-313.
- Robert, M., J. Herrera, F. Contreras, N. Scorer. 1987. *In vitro* propagation of *Agave fourcroydes* Lem. *Plant Cell Tiss. Org. Cult*. 8: 37-48.
- Robert, M., J. Herrera, L. Chan, F. Contreras. 1992. Micripropagation of *Agave furcroydes* Lem. *Plant Cell Tiss. Org. Cult*. 8:37-42.
- Robert, M., J. Herrera, M. Herrera, A. Quijano, E. Balam. 2004. Manual for *in vitro* culture of agaves. Common Fund for Commodities, Vienna, Austria. Unido, Technical Paper N° 38, 148.
- Rohlf, F. 2002. NTSYS. NumericalTaxonomySystem. Exeter. Publishing, Setauket.
- Ruiz, R., R. Nava, L. Pérez, J. Sanchez, R. Reynaga, J. López. 2000. Aspectos poblacionales y productivos de los cultivos de maguey en el norte de Zacatecas México. *Agraria* 16(2): 65- 88.



- Ruvalcaba-Ruiz, D. 2003. Estudios citogenéticas en *Agave tequilana* Wueber var. Azul. Tesis de doctor en ciencias en procesos biotecnológicos. Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías, Universidad de Guadalajara. 89p.
- SAGARPA (Subdelegación de Agricultura). 2004. Plan rector del sistema producto *Agave-tequila*. http://www.inforural.com.mx/IMG/pdf/prn_ateq.pdf [consulta: 13 mayo de 2009].
- Saghai-Marooif, M., K. Soliman, A. Jorgensen, R. Allard. 1984. Ribosomal DNA spacer length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance. Chromosomal location and population dynamics. Proc. Natl. Acad. Sci. 81(2): 8014-8018.
- Sahijram, L., J. Soneyi, K. Bollamma. 2003. Analyzing somaclonal variation in micropropagated bananas (*Musa* spp.). *In Vitro Cellular and Developmental Biology*. Plant 39: 551–556.
- Sambrook, J., D. Russell. 2001. Molecular cloning: A laboratory manual. 3 vol. 3er ed. Cold spring Harbor Laboratory Press. Nueva York. 999 p.
- Santacruz-Ruvalcaba, F., M. Torres-Moran, L. Portillo. 2008. Micropropagación de *Agave tequilana* Weber cv. Azul. Problemática y perspectivas. *Sientia CUCBA*. 10(1-2): 7-20.
- Sánchez-Teyer, L., F. Quiróz-Figueroa, V. Loyola-Vargas, D. Infante. 2003. Culture-induced variation in plants of *Coffea arabica* cv. Caturrarojo, regenerated by direct and indirect somatic embryogenesis. *Molecular Biotechnology* 23: 107–115.
- Sánchez-Chiang, N., V. Jiménez. 2009. Técnicas moleculares para la detección de variantes somaclonales. *Agronomía Mesoamericana*. 20(1): 135-151.
- Santiz, J., R. Rincón-Rosales, F. Gutiérrez-Miceli. 2012. Propagación *in vitro* de *Agave grijalvensis* B.Ullrich, una especie endémica de Chiapas bajo protección especial. *Gayana Bot.* 69 23-30
- Seiber, M., P. Kadkade. 1980. Environmental factors En: Staba, E. Plant tissue culture as a source of biochemicals. CRC Press. Florida. E.U. 123-141p.
- Soltero-Quintana, R. 2006. Manual de biotecnología vegetal. Departamento de Botánica y Zoología. CUCBA. Jalisco México. 58p.
- Sotolongo, R., M. García, L. Junco, G. Greda, E. Quiñones. 2003. Micropropagación de *Psidium salutare* (Myrtaceae). *Rev. Del Jardín Botánico Nacional* 24(1-2) 245-250.
- Smith, M., R. Drew. 1990. Current Application of Tissue Culture in Plant Propagation and Improvement. *Aust. J. Plant Physiol* 17: 267-89.



- Smulders, M. 2005. Are there adequate methods for assessing somaclonal variation in tissue culture propagated plants *In*: Libiaková, G; Gaidosová, Slovakia. 201-203p.
- Torres-Morán, M., M. Morales-Rivera, A. Santerre. 2005. Antecedentes de Variación Somaclonal en *Agave tequilana* Weber variedad azul proveniente de micropropagación. En: Avances en la Investigación Científica en el CUCBA. XVI Semana de la Investigación Científica. 204-205.
- Torres-Morán, M., M. Morales-Rivera, R. Nuño-Romero, F. Santacruz-Ruvalcaba A. Rodríguez G. 2007. Variabilidad de *Agave tequilana* Weber variedad Azul encontrada en micropropagación y su exploración a nivel molecular. Bol. Nakari 18(1): 3-4.
- Torres-Morán, M. 2009. Caracterización molecular del complejo *Agave duranguensis* por medio de marcadores ISTR. Tesis de Doctorado. Instituto Politécnico Nacional. México D.F. 119 p.
- Urdaneta, J., R. Valerio, E. Vargas, E. García. 2006. Aspectos morfoanatomicos de callos originados durante el proceso de embriogénesis somática en banano williams subgrupo cavendish (*Musa spp.* Grupo AAA). Agronomía Trop. 56(4): 697-703.
- Valenzuela, Z. 1994. El agave tequilero: su cultivo e industrialización. Monsanto, México. 119 p.
- Valenzuela-Sánchez, K., S. Juárez-Hernández., V. Crus-Hernández, M. Valverde, O. Paredes-López. 2006. Plant regeneration of *Agave tequilana* by indirect organogénesis. *in vitro* cell. Dev. Biol-Plant. 42: 340-336.
- Van, Eck., H. J. 1999. List of acronyms used in literature on genome research. www.dpw.wan.nl/PV/aflp/acronyms.html[consulta: 20 junio de 2009].
- Vásquez-García, J., M. Chazaro, G. Hernández, E. Flores-Berrios, Y. Vargas- Rodríguez. 2007. *Agaves* del occidente de México. Pandora. Jalisco, México. 221p.
- Velasco-Ramírez, A., M. Torres-Morán, S. Molina-Moret, J. Sánchez-González, F. Santacruz-Ruvalcaba. 2014. Efficiency of RAPD, ISSR, AFLP and ISTR markers for the detection of polymorphisms and genetic relationships in camote de cerro (*Dioscorea spp.*) Electronic Journal of Biotechnology 17: 65–71.
- Vendrame, W., G. Cochert, H. Wetzstein. 1999. AFLP analysis of variation in pecan somatic embryos. Plant Cell Rep 18: 853-857.
- Villalobos, A., V. Villegas, M. Escobar. 1986. Estudio de las condiciones de enraizamiento, establecimiento y conservación del nopal tunero *Opuntia amycaea*



Tenore. Propagado *in vitro*. Tesis. Centro de Fruticultura, Colegio de Posgraduados, Chapingo, México. 80p.

Williams J., A. Kubelik, K. Livak, A. Rafalski, S. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*. 18: 653-653.

Yeoman, M. 1970. Early development in callus cultures. *Int. Rev. Cytol.* 29: 383-409.

Ziv, M. 2002. Simple bioreactor for mass propagation of plants. 1st. Int. Symp. Liquid Systems for *in vitro* mass propagation of plants. Ås Noruega. 13-14 p.