



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

**Embriogénesis somática y
crioconservación en *Agave* spp.**

Tesis

que para obtener el grado de

**Maestra en Ciencias en Biosistemática
y Manejo de Recursos Naturales y
Agrícolas**

Presenta

María de Lourdes Delgado Aceves

DIRECTOR

Dr. Fernando Santacruz Ruvalcaba

Zapopan, Jalisco

11 de julio de 2017



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

**Embriogénesis somática y
crioconservación en *Agave* spp.**

Tesis

que para obtener el grado de

**Maestra en Ciencias en Biosistemática
y Manejo de Recursos Naturales y
Agrícolas**

Presenta

María de Lourdes Delgado Aceves

DIRECTOR

Dr. Fernando Santacruz Ruvalcaba

CODIRECTOR

Dr. Moisés Cortes Cruz

Zapopan, Jalisco

11 de julio de 2017



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

Embriogénesis somática y crioconservación en *Agave* spp.

Por

María de Lourdes Delgado Aceves

Maestra en Ciencias en Biosistemática y Manejo de Recursos Naturales y
Agrícolas

Aprobado por:

Dr. Fernando Santacruz Ruvalcaba
Director de Tesis e integrante del Jurado

6/Junio-2017

Fecha

Dr. Moisés Cortes Cruz
Asesor del Comité Particular e integrante del Jurado

07/Junio/2017

Fecha

Dr. Liberato Portillo Martínez
Asesor del Comité Particular e integrante del Jurado

07 junio 2017

Fecha

Dr. Takao Niino
Asesor del Comité Particular e integrante del Jurado

6/June/2017

Fecha

Dra. Patricia Zarazúa Villaseñor
Asesor del Comité Particular e integrante del Jurado

6/Junio/2017

Fecha

Dr. Lino de la Cruz Larios
Sinodal e integrante del Jurado

08/Junio/2017

Fecha

AGRADECIMIENTOS

A Dios y la vitalidad que tuve para desarrollar este proyecto con voluntad y entereza.

Al cariño y ética con la que ejercen su profesión, primeramente al apoyo y dedicación fundamental de mi director Dr. Fernando Santacruz Ruvalcaba, ya que sin usted esto difícilmente fuera posible, al Dr. Moisés Cortes por ofrecerme la oportunidad de colaborar e integrar sus conocimientos, y a mis asesores Dr. Liberato Portillo, Dra. Patricia Zarazúa, Dr. Lino de la Cruz y Dr. Takao Niino que fueron complemento importante para el desarrollo de mis metas. Mi admiración y respeto a todos ustedes.

Al Dr. Shin-Ichi Yamamoto, por darme la oportunidad de mostrarme otra visión de la ciencia, por su enseñanza, tiempo y atenciones en la estancia académica en el *National Agriculture Research Organization (NARO)*, Japón.

A mis padres por siempre anhelar y desear lo mejor para mi vida, por inculcarme valores que hoy en día rinden frutos, mismos que me hacen sentir orgullosa y agradecida con ustedes. Además, por acompañarme en cada triunfo y ser mi razón de ser, pero sobre todo por ser proveedores de dicha y ejemplo en mi vida.

Gracias a mis hermanos y amigos, por ser los principales promotores para cumplir mis sueños, gracias a ellos por creer en mí y en mis expectativas.

A mi cómplice, colega y pareja, Felipe Romo, estaré infinitamente agradecida por todo el aprendizaje, apoyo incondicional, motivación y cariño en este andar, siempre juntos.

A ti Terapis, por la fortaleza que me has dado aún con tu partida, mucho de lo que soy hoy en persona y profesional, se debe a ti.

A todos aquellos que me brindaron su amistad, su soporte y alegrías compartidas, en especial a Juvencio Castañeda, Mariela Espíritu, Mónica Limón, Yeyé Núñez, Memo, Isaac Sandoval, Blanca Amaro, y mis compañeros del laboratorio que, afortunadamente coincidimos en el espacio y tiempo.

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo otorgado de beca durante los estudios de Maestría en Ciencias, a María de Lourdes Delgado Aceves (número de becario: 581229).

I. RESUMEN	x
II. ABSTRACT	xi
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Descripción general del género <i>Agave</i>	3
2.1.1 Taxonomía y origen de <i>Agave</i> spp.	3
2.1.2 Reproducción del agave	5
2.1.3 Importancia ecológica de las especies.....	6
2.1.4 Factores en la degradación de sus poblaciones	6
2.2 Cultivo de tejidos en la conservación de recursos genéticos vegetales	7
2.2.1 Cultivo de tejidos vegetales.....	7
2.2.2 Regeneración <i>in vitro</i> de agaves.....	8
2.2.3 Embriogénesis somática indirecta	9
2.2.3.1 Origen de los embriones somáticos.....	11
2.2.3.2 Morfología y fisiología de embriones somáticos	12
2.3 Conservación <i>ex-situ</i> de los recursos genéticos vegetales	13
2.3.1 Crioconservación del material fitogenético.....	14
2.3.2 Material biológico	16
2.3.3 Preparación del germoplasma para crioconservación	16
2.3.4 Pretratamientos.....	17
2.3.5 Crioprotección.....	17
2.3.6 Técnicas de crioconservación.....	19
2.3.7 Regeneración post-crioconservación.....	21
2.4 Integridad genética	21
2.4.1 Sistemas de marcadores moleculares	22
2.4.2 Marcadores moleculares en la detección de variaciones en <i>Agave</i> spp.....	23
2.4.3 Variación somaclonal	23
2.4.4 Evaluación de la estabilidad de germoplasma vegetal conservado	24
3. HIPÓTESIS	25
4. OBJETIVOS	26
5. MATERIALES Y MÉTODOS	27
5.1 Embriogénesis somática indirecta	27
5.1.1 Experimentos para eficientar la producción de embriones somáticos <i>en A. tequilana</i> Weber cv. azul (genotipo ES4).....	27
5.1.1.1 Embriogénesis somática en ES4 con adición de aminoácidos	28

5.1.1.2 Comparación de las concentraciones de 2,4-D y picloram (auxinas) para la inducción de callo en ES4 a partir de raíz	29
5.1.1.3 Inducción de embriogénesis somática con diferentes concentraciones de picloram en ES4	30
5.1.1.4 Inducción de embriogénesis somática con diferentes concentraciones de 2,4-D en ES4	30
5.1.2 Embriogénesis somática en diversos genotipos	31
5.1.2.1 Inducción de embriogénesis somática en Agave tequilana Weber cv. azul genotipo A3H1 y ES4 por selección de tejido embriogénico.....	31
5.1.2.2 Inducción de embriogénesis somática en raíz con 2,4-D y BA en genotipos G0 (Agave maximiliana, A3H1 (hijuelo de A. tequilana) y ES4 (A. tequilana línea embriogénica).....	32
5.1.2.3 Inducción de embriogénesis somática en A. tequilana cv. chato	33
5.2 Crioconservación de embriones somáticos.....	34
5.2.1 Deshidratación en silica gel.....	34
5.2.2 Vitrificación con PVS2	35
5.3 Análisis de integridad genética por marcadores AFLP's de embriones somáticos crioconservados.	36
5.3.1 Preparación de material vegetal	36
5.3.2 Extracción del ácido desoxirribonucleico (ADN)	36
5.3.2.1 Calidad y cuantificación del ADN	37
5.3.2.2 Digestión y amplificación de las muestras de ADN por marcadores AFLP's	37
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	39
6.1 Embriogénesis somática indirecta.....	39
6.1.1 Experimentos para eficientar la producción de embriones somáticos en <i>A. tequilana</i> Weber cv. azul (genotipo ES4).....	39
6.1.1.1 Embriogénesis somática en ES4 (A. tequilana) con adición de aminoácidos	39
6.1.1.2 Comparación de las concentraciones de 2,4-D y picloram para la inducción de callo en ES4.....	41
6.1.1.3 Inducción de embriogénesis somática con diferentes concentraciones de picloram en ES4	43
6.1.1.4 Inducción de embriogénesis somática con diferentes concentraciones de 2,4-D en ES4	44
6.1.2 Embriogénesis somática en diversos genotipos	46
6.1.2.1 Inducción de embriogénesis somática en Agave tequilana Weber cv. azul genotipo A3H1 y ES4 por selección de tejido embriogénico.....	46
6.1.2.2 Inducción de ESI en raíz con 2,4-D y BA en genotipos G0 (Agave maximiliana, A3H1 (hijuelo de A. tequilana) y ES4 (A. tequilana línea embriogénica).....	48

6.1.2.3 Inducción de embriogénesis somática en <i>A. tequilana</i> cv. chato con picloram y 2,4-D.....	49
6.2 Crioconservación de embriones somáticos.....	52
6.3 Análisis de integridad genética por marcadores AFLP's	56
6.3.1 Calidad y cuantificación del ADN	56
6.3.2 Análisis de los perfiles electroforéticos generados para muestras de ADN por marcadores AFLPs	57
7. CONCLUSIONES	63
8. LITERATURA CITADA.....	64
ANEXOS	80

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Métodos adecuados (+) y no recomendados (-) para las diferentes formas de cultivo *in vitro* de plantas para la crioconservación.....20

Cuadro 2. Tratamientos con aminoácidos para la inducción de ES4.....29

Cuadro 3. Tratamientos de 2,4-D y picloram en combinación con la citocinina BA....29

Cuadro 4. Tratamientos para la inducción de callo en ES4 con picloram y BA.....30

Cuadro 5. Tratamientos para la inducción de callo en ES4 con 2,4-D y BA.....31

Cuadro 6. Tratamientos para la inducción de callo en diversos genotipos con 2,4-D y BA.....32

Cuadro 7. Inducción de embriogénesis somática en *Agave tequilnana* cv. chato con diferentes concentraciones de picloram y BA..... 33

Cuadro 8. Inducción de embriogénesis somática en *Agave tequilnana* cv. chato con diferentes concentraciones de 2,4-D y BA.....34

Cuadro 9. Número de embriones por tipo de explante.....40

Cuadro 10. Número de embriones por tipo de auxina y concentración.....42

Cuadro 11. Número de embriones por concentración de picloram en ES4.....43

Cuadro 12. Número de embriones por concentración de BA en ES4.....44

Cuadro 13. Número de embriones promedio por concentración de 2,4-D en ES4 en explantes de hoja y raíz.....45

Cuadro 14. Número de embriones promedio por concentración de BA en ES4 en explantes de hoja y raíz.....45

Cuadro 15. Diferencias mínimas significativas de raíz y hoja.....46

Cuadro 16. Número de embriones por concentraciones de 2,4-D en diferentes genotipos de *Agave* spp.....49

Cuadro 17. Número de embriones promedio por concentraciones de picloram en hoja del cv. chato.....51

Cuadro 18. Número de embriones promedio por concentraciones de BA en hoja del cv. chato (proveniente del experimento de picloram).....51

Cuadro 19. Número de embriones promedio por concentraciones de 2,4-D en hoja del cv. chato..... 51

Cuadro 20. Número de embriones promedio por concentraciones de BA en hoja del cv. chato (proveniente del experimento de 2,4-D).....52

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Morfología de las principales partes de la planta y su propagación vegetativa (Arizaga y Ezcurra, 2001).....5

Figura 2. Principales etapas en el proceso para la crioconservación de especies.....15

Figura 3. Procedimiento para la deshidratación por sílica gel y la vitrificación de embriones somáticos.....36

Figura 4. Producción de embriones de diferentes explantes. A) Embriones a partir de callo de raíz. B) Embriones a partir de callo de hoja.....41

Figura 5. Embriones somáticos generados a partir de raíz. A) Callo embriogénico generado por 2,4-D. B) Callo embriogénico generado por picloram.....42

Figura 6. Comparación de la morfología de embriones somáticos en *Agave* spp. A) Diferentes etapas de embriones somáticos generados a partir de raíz de *A. tequilana*. B) Desarrollo embriogénesis somática indirecta a partir de cortes transversales del tallo de *A. fourcroydes* (tomado de Monja et al. 2013).....44

Figura 7. Producción de embriones somáticos en diferentes etapas del cultivo en el genotipo A3H1.....47

Figura 8. Capacidad embriogénica en genotipo A3H1. A) Callo no embriogénico como control. B) Callo embriogénico seleccionado. C) Callo a partir de embriones germinados. D) Conversión de embriones somáticos (60 d).....47

Figura 9. Inducción de embriogénesis somática por 2,4-D en genotipo ES4 a partir de callo friable y embriones germinados. A) y B) Producción de callo a los 30 d. C) y D) Desarrollo de embriones a los 60 d. E) y D) Desarrollo de embriones a los 90 d.....48

Figura 10. Embriogénesis somática indirecta en cultivar chato. A) Embriones generados a partir de hoja por inducción de 2,4-D. B) Embriones generados a partir de hoja por inducción de picloram (40 d).....50

Figura 11. Material en estudio para criconservación A) Etapas de embriones somáticos en el explante. B), C), D) y E) Respuesta de los embriones a nitrógeno líquido con sus controles F) Selección de embriones por tamaño y etapa (torpedo). G) Embriones germinados post-crioconservados (120 d).....	53
Figura 12. Porcentaje de recuperación de embriones somáticos de <i>A. tequilana</i> por efecto del tamaño y técnica aplicada.....	54
Figura 13. Meristemos como material biológico. A) Conversión de embriones en callo a partir de hoja. B) Embriones germinados a los 90 d. C) Disección de embriones (3-4 mm) en medio de precultivo 0.3 M. D) Disección de meristemo apical de <i>Agave tequilana</i>	55
Figura 14. Etapas de desarrollo de embriones somáticos de <i>A. tequilana</i>	56
Figura 15. Gel de calidad de agarosa (1%) mostrando las bandas obtenidas de ADN de las muestras (carriles del 2 al 13) del genotipo ES4 (<i>Agave tequilana</i> Weber cultivar azul). Letra M es el marcador fago Lambda, letra R es repetición de muestras al aza...57	57
Figura 16. Dendrograma generado a partir de cuatro combinaciones de cebadores para 68 muestras del genotipo ES4. Plantas madre (PM), embriones somáticos (PIV) y embriones somáticos post-crioconservados (PIC), basado en el coeficiente de similaridad de Nei (1973) y agrupamiento UPGMA.....	59
Figura 17. Dendrograma generado para la población de plantas madre (PM), basado en el coeficiente de similaridad de Nei (1973) y agrupamiento UPGMA.....	60
Figura 18. Dendrograma generado para la población de embriones germinados (PIV), basado en el coeficiente de similaridad de Nei (1973) y agrupamiento UPGMA.....	61
Figura 19. Dendrograma generado para la población de embriones post-crioconservados (PIC), basado en el coeficiente de similaridad de Nei (1973) y agrupamiento UPGMA.....	61

I. RESUMEN

Dentro de las especies del género *Agave* spp., *A. tequilana* Weber cv. azul, es la materia prima de bebidas destiladas de alto impacto en México, por ello, la explotación de monocultivos y alta demanda de esta especie, así como de sus cultivares o formas reportadas de la propia especie; son susceptibles al manejo inapropiado (no sustentable) siendo un factor crucial para la disminución de variabilidad, degradación de poblaciones y en algunos casos su extinción. En el presente estudio se probó la eficiencia de inducción de embriogénesis somática indirecta en *A. tequilana* cv. azul a partir de concentraciones y tipos de reguladores de crecimiento (2,4-D y picloram), así como de diferentes explantes (raíz y hoja) permitiendo mayor producción de embriones somáticos. Inclusive, se por primera vez la inducción de embriogénesis somática en *A. tequilana* cv. chato por la presencia de forma independiente de 2,4-D-BA y picloram-BA en el medio de cultivo. Además se llevó a cabo la crioconservación de los embriones somáticos (ES) generados verificando la integridad genética del material. La crioconservación, se desarrolló por dos métodos en criolamina: deshidratación por sílica gel y vitrificación; donde se evalúan como estrategia diferentes tiempos de exposición a los tratamientos. Los ES se seleccionaron con base en el tamaño de 3-4 mm (fase torpedo) y una vez congelados por inmersión en nitrógeno líquido (NL) se germinaron en medio MS con modificaciones en nitratos. El porcentaje de supervivencia fue en respuesta de la técnica usada en los ES tratados, con sílica gel el porcentaje de supervivencia fue del 77% sin embargo con solución vitrificante PVS2 se observó por debajo con 40%. El análisis por marcadores moleculares se realizó con el objeto de verificar la fidelidad genética del material, mismo que se llevó a cabo por polimorfismos de la Longitud de los Fragmentos Amplificados (AFLP por sus siglas en inglés) los cuales detectaron polimorfismos en plantas madre (PM) así como en los embriones somáticos germinados (PIV) y post-crioconservados (PIC).

II. ABSTRACT

Among the species of the genus *Agave* spp., *A. tequilana* Weber cv. azul, is the plant material of distilled drinks of high impact in Mexico, for that reason, the monoculture exploitation and high demand of this species, as well as of its cultivars or reported forms of the own species; Are susceptible to inappropriate (unsustainable) management being a crucial factor for the decrease of variability, degradation of populations and in some cases extinction. In the present study we tested the efficiency of induction of indirect somatic embryogenesis in *A. tequilana* cv. azul based on concentrations and types of growth regulators (2,4-D and picloram), as well as different explants (root and leaf) that allows for greater production of somatic embryos. Even if, for the first time, the induction of somatic embryogenesis in *A. tequilana* cv. chato by the independent presence of 2,4-D-BA and picloram-BA in the culture medium. In addition it was carried out a breeding of the somatic embryos (ES) generated verifying the genetic integrity of the material. Cryopreservation was developed by two methods in cryoplates: dehydration by silica gel and vitrification; where different treatment times are evaluated as a strategy. ES were selected based on the size of 3-4 mm (torpedo phase) and frozen by immersion in liquid nitrogen (NL) they have been germinated in MS with modifications in nitrates. The survival rate was in response to the technique used in the ES treated, with the gel survival percentage of 77% however with the PVS2 solution was observed below 40%. Molecular markers analysis was performed with the purpose of checking the genetic fidelity of the material, which was carried out by Amplitude Fragment Length (AFLP) polymorphisms, which detected the polymorphisms in the Mother plants (PM) As well as somatic embryos germinated (IVP) and post-cryopreserved (PIC).

1. INTRODUCCIÓN

México es considerado como el centro de origen del género *Agave* (Colunga-GarcíaMarín *et al.*, 2007; García-Herrera *et al.*, 2010), taxón que recientemente fue incluido a la familia *Asparagaceae* Juss. (1789) (AP APG III, 2009) y que comprenden más de 200 especies reportadas de las cuales el 75 % están presentes en este país (García-Mendoza y Galván, 1995). Actualmente hay 26 estados de la República Mexicana en los que se cultivan de forma intensiva los agaves (García-Mendoza, 2011; Castro-Díaz y Guerrero-Beltrán, 2013).

La relación que ha existido desde tiempos remotos entre hombre-planta, va desde el aprovechamiento de ejemplares silvestres hasta el cultivo extensivo de numerosas especies domesticadas para la producción de alimentos, fibras, sapogeninas y bebidas (García-Mendoza, 2011; Iñiguez *et al.*, 2014; Torres *et al.*, 2015;). Desde entonces, el agave ha adquirido suma importancia a partir de un punto de vista económico, ecológico y social (Castillo *et al.*, 2007). En los últimos años, la demanda y por ende la productividad de los cultivos de agave han aumentado (Martínez-Gándara, 2008; SIAP-SAGARPA, 2015). Dentro de la amplia gama de este género, *A. tequilana* Weber cultivar azul, es la materia prima para la elaboración del tequila, ésta bebida destilada es de alto impacto económico en el país, esto obliga a que sea un monocultivo intensivo que desplaza no sólo a las variedades silvestres, sino también a los cultivos alimenticios; por ello, la explotación de esta especie, entre otras, son susceptibles al manejo inapropiado (no sustentable), siendo un factor crucial para la degradación de poblaciones, variabilidad genética y en algunos casos la extinción de especies (Norma Oficial Mexicana, 2010).

Por lo anterior, durante la última década se ha puesto atención a los puntos vulnerables que han ido modificando sus ecosistemas, tales como; cambio climático, deforestación (extracción de agaves en etapas reproductivas), cambio del uso de suelo (ganado en áreas forestales), recolecta de semillas, plagas y enfermedades, entre otras (Zizumbo-Villarreal *et al.*, 2013; Torres *et al.*, 2015; Flores *et al.*, 2016), los cuales afectan de manera directa a la diversidad biológica y riqueza del género *Agave*. Esto ha propiciado a recurrir a herramientas necesarias (Domínguez *et al.*, 2008), como el desarrollo de

nuevas técnicas en cultivo de tejidos *in vitro* que permitan la multiplicación a gran escala, para su conservación y/o preservación (Santacruz-Ruvalcaba y Portillo, 2009; Levitus *et al.*, 2010; Rodríguez-Sahagún *et al.*, 2011;).

Los procesos biológicos a los cuales se someten las células por embriogénesis somática, se basan en la totipotencia celular (Gautheret, 1983; Bhojwani y Razdan, 1986; Rai, 2007; Thorpe, 2007), el producto de esta metodología se le denomina, “semilla sintética” que a diferencia de la cigótica no tiene endospermo, ni cubierta. Esta semilla puesta en condiciones adecuadas germina (Rai, 2007) permitiendo la producción a gran escala de plantas libres de enfermedades (Arnold *et al.*, 2002; Portillo *et al.*, 2007; Beyl y Sharma, 1983; Tejavanthi *et al.*, 2007).

En este caso y aunado a la crioconservación los embriones generados por esta vía son sometidos a temperaturas de ultracongelación a través del uso de nitrógeno líquido (-196 °C), logrando la interrupción de la división celular y de la mayoría de los procesos metabólicos y físicos, manteniendo la viabilidad y funcionalidad celular (González-Arno y Engelmann, 2013).

Cabe señalar que a fin de evaluar los posibles cambios en el ADN de las plantas propagadas por estas técnicas (cultivo de tejidos y crioconservación), se han empleado diferentes estrategias que incluyen desde el análisis de caracteres morfológicos, análisis citogenéticos, hasta el empleo de marcadores bioquímicos y moleculares para asegurar su integridad genética (Rani *et al.*, 1995).

Es así que, estas técnicas representan una alternativa viable, segura y efectiva para la conservación a largo plazo de los recursos fitogenéticos en especies con semillas recalcitrantes (no ortodoxas), con conflictos de incompatibilidad o especies que su propagación es vegetativa (González-Arno y Engelmann, 2013). Por lo cual, en el presente trabajo se muestra la estandarización de técnicas para la inducción de embriogénesis somática indirecta y crioconservación de los embriones generados con el fin de conservar germoplasma del género *Agave* spp. a largo plazo así como asegurar su estabilidad genética.

2. ANTECEDENTES

2.1 Descripción general del género *Agave*

Los agaves en México, representan una fuente importante para el desarrollo debido a sus múltiples aplicaciones industriales tales como bebidas (tequila, mezcal, bacanora y el pulque), alimentos (miel, producción de insectos comestibles), biocombustibles, fructanos y fibras naturales (García-Herrera *et al.*, 2010). Hoy en día, los productores consideran a esta planta, con un gran potencial en el aspecto económico, sin embargo; desde nuestros ancestros esta planta comparte un valor cultural, ecológico, étnico, ambiental y social (Bautista y Smit, 2012). Las tradiciones y costumbres para la elaboración y manejo de los productos derivados son de valor trascendental puesto que se conservan peculiares procesos artesanales y elementos simbólicos que representan a una región (Macías y Valenzuela, 2009; García-Mendoza, 2007).

Por su origen y progreso, los cultivos de agave se destacan para la elaboración del tequila y mezcal. El valor de las exportaciones de mezcal se incrementó en el periodo de 2012 a 2015 en un 322% anual. Por otro lado, el tequila sobresale debido a la demanda para su consumo, en el año 2006 se reporta el segundo producto mexicano de mayor exportación en el sector agroalimentario y para el 2015 las exportaciones sumaron los 84.6 millones de dólares siendo una significativa contribución económica para la industria en el país; particularmente en Jalisco, ya que el agave es el tercer cultivo con mayor expansión en la entidad (Castro-Díaz y Guerrero-Beltrán, 2013; CRT, 2016).

2.1.1 Taxonomía y origen de *Agave* spp.

El género *Agave* pertenece al orden *Asparagales* mismo que se encuentra comprendido dentro de la subfamilia *Agavoideae* con más de 200 especies, de las cuales 159 están presentes en este país, incluyendo 119 endémicas; siendo el Valle de Tehuacán la zona con más riqueza biológica (García-Mendoza y Galván, 1995; García-Mendoza, 2011).

Los agaves son plantas monocotiledóneas, monocárpicas y perennes, el metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM) está presente en el género. Estas plantas disminuyen el consumo total de agua y la transpiración, ya que la absorción de CO² se produce durante la noche (Nobel, 1990). Sus hojas son grandes, suculentas y fibrosas que terminan en una espina y tienen un crecimiento basal dispuesto en roseta, los márgenes de las hojas presentan pequeñas espinas en forma de gancho o rectas (figura 1). Durante su ciclo de vida acumulan agua, nutrientes y azúcares en un tallo grueso con entrenudos extremadamente cortos, en el mismo tallo yace el escapo floral (comúnmente llamado quiote). Las inflorescencias son bracteadas, escamosas y racemosas o paniculadas (Robert *et al.*, 2007).

A partir del uso continuo, los pobladores han seleccionado más de 20 variedades tradicionales de *Agave angustifolia* Haw., misma especie de la que se originó *Agave tequilana* Weber en donde se agrupan por lo menos nueve cultivares de la propia especie (de acuerdo con todas las evidencias científicas), de los cuales destaca la variedad azul con la que se elabora el tequila, (Zizumbo *et al.*, 2012; Gil-Vega *et al.*, 2007; Valenzuela, 1995). La especie *Agave tequilana* Weber cultivar azul es la única variedad aprobada por la Norma Oficial Mexicana (NOM-006-SCFI) (Diario Oficial de la Federación, 2006) para la producción de tequila teniendo así, protección de denominación de origen (DOT). Esta norma determina que sólo se puede cultivar agave para la elaboración tequila dentro del territorio mexicano exclusivamente en los estados y municipios de: Jalisco (125), Nayarit (8), Michoacán (30), Guanajuato (7) y Tamaulipas (11) (Diario Oficial de la Federación, 1974).

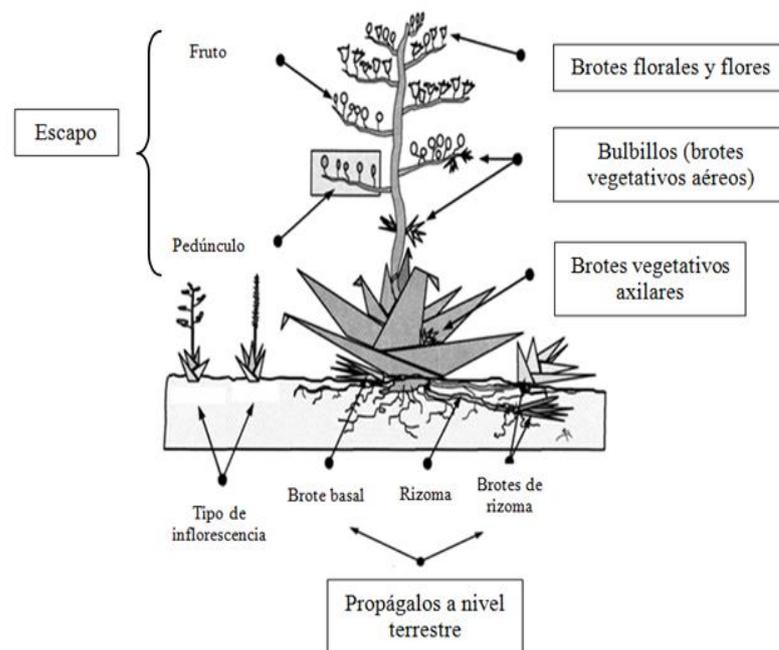


Figura 1. Morfología de las principales partes de la planta y su propagación vegetativa (Arizaga y Ezcurra, 2001).

2.1.2 Reproducción del agave

Los agaves sólo tienen una floración durante su ciclo de vida (monocárpica), al cabo de esta, la planta muere (Gentry, 1982). Las estrategias de reproducción que ha adquirido el *Agave tequilana* son por tres formas: semillas (sexual), por hijuelos del rizoma (asexual) y bulbillos que provienen de la inflorescencia (asexual) (Valenzuela, 1994; García-Mendoza, 2007).

La vía sexual es poco utilizada ya que se interrumpe la floración en el cultivo para impedir que ésta consuma los carbohidratos de reservas. Además, las semillas (planas y negras) del *A. tequilana* tienen un bajo porcentaje de germinación, el crecimiento es lento y las plántulas resultantes son muy heterogéneas para el cultivo. A diferencia, en la vía asexual, los hijuelos son dados por rizomas originados en la parte terrestre de la planta progenitora, esta forma de reproducción es la más utilizada para el establecimiento de las plantaciones debido a la rapidez con las que se propaga, el tamaño y número de hijuelos producidos por la planta. Finalmente, la reproducción por bulbillos, son plantas pequeñas que emergen en el quiote junto a las flores no

fecundadas que caen posteriormente sin formar frutos, esta vía es poco utilizada ya que el tiempo y costo de producción es mayor (Gentry, 1982; Valenzuela, 1994).

2.1.3 Importancia ecológica de las especies

Las plantas de agave por su metabolismo, fisiología y las características morfológicas les permiten sobrevivir en condiciones extremas. Se encuentran en los valles, llanuras, colinas y laderas pedregosas, desde el nivel del mar hasta 3,400 m de altitud, aunque son más comunes entre 1,000 y 2,000 m (García-Mendoza, 2007). Crecen en suelos con pH neutro o ligeramente alcalino. Estas plantas crecen en diferentes regiones del país y tienen capacidad de adaptación a diferentes condiciones ambientales (Pinos-Rodríguez *et al.*, 2008). En el caso del agave, el alto grado de endemismo de especies que existe en México se debe a la heterogeneidad del territorio y a las características particulares de este taxón, tales como su plasticidad genética, tolerancia ecológica, capacidad de dispersión, germinación de sus semillas, así como a sus interacciones bióticas con otros organismos, como los polinizadores, y a eventos históricos que han tenido lugar en Norteamérica, los cuales han influenciado la distribución actual de las especies (García-Mendoza 2007), preexistiendo el agave como una fuente de nutrientes, tanto para humanos como para animales (Nava-Cruz *et al.*, 2014).

2.1.4 Factores en la degradación de sus poblaciones

A pesar de la diversidad e importancia etnobotánica y económica de muchas especies de agaves, sólo especies como *Agave tequilana*, *A. fourcroydes* o *A. sisalana* se cultivan en forma extensiva, utilizando variedades seleccionadas que son casi exclusivamente mediante propagación vegetativa. No obstante, más de 30 especies de agaves se extraen de los bosques de México para producir mezcal, lo que ha determinado la degradación o extinción de numerosas poblaciones (Torres *et al.*, 2015). Esto ha ocasionado una considerable pérdida de riqueza genética, favoreciendo así la susceptibilidad de los cultivos a riesgos fitosanitarios (Valenzuela, 1995; Zizumbo *et al.*, 2012), la problemática presentada recientemente como la podredumbre producida por algunos patógenos entre ellos *Erwinia corotovora* y marchitez (*Fusarium spp.*) entre otros (Rubio, 2007; Flores *et al.*, 2016), probablemente hayan sido beneficiadas por la alta

homogeneidad genética existente en las poblaciones actuales debido a su propagación vegetativa y a las prácticas agrícolas predominantes (Robert *et al.*, 2007).

Por otra lado, el cambio climático, la deforestación (extracción de agaves en etapas reproductivas), cambio del uso de suelo (ganado en áreas forestales), la recolecta de semillas, la erosión de suelos, las plagas y enfermedades (Zizumbo-Villarreal *et al.*, 2013; Torres *et al.*, 2015; Flores *et al.*, 2016), afectan de manera directa a la diversidad y riqueza del género *Agave*. Por lo anterior, se sugiere de forma prioritaria mejoras en los programas de conservación *in-situ* y *ex-situ* de las especies domesticas así como las de sus parientes silvestres junto con políticas que promuevan su uso sostenible (Semedo, 2015), ya que es probable que los parientes silvestres tengan características genéticas que podrían ser utilizados para desarrollar cultivos con capacidades adaptativas o tolerantes ante un decadencia medioambiental (FAO, 2015).

2.2 Cultivo de tejidos en la conservación de recursos genéticos vegetales

2.2.1 Cultivo de tejidos vegetales

De manera general, el cultivo de tejidos vegetales es un término que se usa para describir diferentes técnicas de cultivo de células, tejidos u órganos en un medio nutritivo en condiciones asépticas y con la capacidad de regenerar individuos completos, los cuales se pueden desarrollar hasta una etapa madura, y de ahí ser transferidos a invernadero para su aclimatación. Estas técnicas ofrecen la posibilidad de producir plantas a tasas más altas que las que se obtienen mediante procedimientos tradicionales de cultivo (Levitus *et al.*, 2010).

A pesar de que se han establecido las bases generales del cultivo de tejidos, es necesario para cada especie y genotipo determinar los requerimiento específicos para su propagación *in vitro*, lo cual se logra mediante la experimentación (Lascuráin *et al.*, 2009).

Los técnicas de regeneración tiene grandes ventajas ante sistemas de propagación convencional debido a que se realiza todo el proceso en un laboratorio bajo ambientes controlados estando totalmente aislado a condiciones externas, por lo tanto, no se ve afectado por las estaciones del año, sequías, heladas, altas temperaturas u otros factores

ambientales. El espacio que se requiere es mínimo y el tiempo del proceso se acorta en relación con la propagación en campo, además el número de plantas que se pueden obtener mediante micropropagación es prácticamente ilimitado. Otra de las ventajas, es que las plantas están libres de bacterias y hongos. Dado el caso, y con técnicas más específicas, se pueden liberar incluso de virus y viroides. Incluso, en un sistema de propagación clonal se mantiene todas las características genotípicas del material inicial seleccionado. Sin embargo para el agave, una de las desventajas es que por técnicas de regeneración como embriogénesis somática directa e indirecta se presente variación somaclonal (Domínguez *et al.*, 2008).

2.2.2 Regeneración *in vitro* de agaves

Por varias décadas el mejoramiento genético y la propagación convencional han contribuido significativamente a la demanda alimentaria que exige población, sin embargo, actualmente uno de los principales retos que se tienen, es la necesidad de incrementar la productividad por un lado y por el otro conservar la diversidad genética antes las amenazas que repercuten en la degradación de sus poblaciones, por lo tanto en éste sentido el uso de herramientas biotecnológicas es una alternativa viable para resolver estos retos (Torres *et al.*, 2015).

La utilización de cultivo de tejidos en el género *Agave*, se ha llevado a cabo principalmente en especies de importancia económica y en especies en peligro de extinción (Domínguez *et al.*, 2008). Diversas especies de este género, han sido manipuladas biotecnológicamente, principalmente para la producción a gran escala (Powers y Backhaus, 1989; Santacruz-Ruvalcaba *et al.*, 1999; Hazra *et al.*, 2002; Martínez-Palacios *et al.*, 2003; Nikam *et al.*, 2003; Ramírez-Malagón *et al.*, 2008). Las metodologías aplicadas son perfiladas para cada especie. En particular, *A. tequilana* por su alta demanda, se reportan diversos protocolos para su propagación; organogénesis (Valenzuela-Sánchez *et al.*, 2006), proliferación de yemas axilares (Castro-Concha *et al.*, 1990), embriogénesis somática (Rodríguez-Garay *et al.*, 2003; Portillo *et al.*, 2007).

2.2.3 Embriogénesis somática indirecta

Los primeros indicios de embriogénesis somática indirecta (ESI) fue observada por primera vez por Steward *et al.*, (1958) en suspensiones celulares de zanahoria, por otro lado se observaba el mismo fenómeno en callos con medio de cultivo semisólido (Reinert *et al.*, 1958). La embriogénesis somática indirecta (ESI), como sistema de regeneración de plantas ha sido empleada para la propagación de plantas, como herramienta para la conservación y el mejoramiento genético de germoplasma (George, 1993). Este sistema está basado en la totipotencia de las células vegetales (Gautheret, 1983; Bhojwani y Razdan, 1986; Rai, 2007; Thorpe, 2007) y es la vía para generar embriones a partir de células somáticas previamente estimuladas con reguladores de crecimiento para la inducción y diferenciación de las células (callos o suspensiones celulares), permitiendo la producción a gran escala de plantas libres de enfermedades. El material biológico generado a partir del método de regeneración *in vitro* son los embriones somáticos, su producción es un proceso que se asemeja a la embriogénesis cigótica, sin embargo, se genera a partir de células somáticas sin la ocurrencia de la fusión de los gametos pasando por etapas similares en su desarrollo (Arnold *et al.*, 2002; Portillo *et al.*, 2007; Beyl y Sharma, 1983; Tejavanthi *et al.*, 2007), excepto por el hecho de que los embriones somáticos no son latentes y no están recubiertas por tegumentos ni endospermo (George, 1993). Este material *in vitro* tiene la ventaja de ser "sincronizado" por lo tanto los procedimientos de crecimiento relativamente se homogenizan en términos de tamaño, composición celular y estado fisiológico, por lo cual la respuesta ante su congelación, aumentan debido a la aplicación uniforme a los tratamientos (Freire, 2003; Thorpe *et al.*, 2011).

Se ha observado en *Agave* spp. la diferenciación de células por estímulos químicos y ambientales (plasticidad) a través de hojas inmaduras en la inducción de callogénesis por la auxina ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y otros reguladores de crecimiento, así como aditivos en el medio, dando lugar a la embriogénesis somática. La inducción de la división celular como respuesta a esta auxina se expresa en un callo con crecimiento desorganizado o bien en un crecimiento polarizado para la formación de un embrión (Portillo *et al.*, 2007; Ayala, 2010; Rodríguez *et al.*, 2011). Rodríguez-Garay *et al.*, (1996), reportaron el uso de esta metodología en *A. victoriae-reginae* a partir de explantes de hoja, destacando como tratamiento el uso de la auxina 2,4-D para

inducción y reducción de nitratos en el medio basal para la conversión de embriones somáticos.

Sin embargo, el primer protocolo exitoso reportado en *A. tequilana* Weber cultivar azul fue por Portillo *et al.*, (2007) donde demostraron la inducción de callo a partir de hojas jóvenes, y la diferenciación de las células a embriones somáticos con la estimulación de diferentes citocininas como 6-bencilaminopurina (BA), 1-fenil-3-(1,2,3-tiadiazol-5-il)urea (TDZ), y 6-(g-g-dimetilalilamino)purina (2ip) en combinación de una auxina 2,4-D, dando como resultado óptimo mayor número de embriones somáticos obtenidos en la combinación con la citocinina BA (Portillo *et al.*, 2007). Al contrastar el producto regenerado por este tratamiento con las contrapartes cigóticas fueron morfológicamente similares. Los trabajos anteriores indican que el empleo de auxinas favorece la inducción de la ESI a partir de células somáticas.

Evidentemente los procesos embriogénicos son afectados por una serie de factores que en algunos casos favorecen y en otros dificultan los manejos *in vitro* del material vegetal siendo; el genotipo de la planta, condiciones de cultivo, reguladores de crecimiento y demás componentes del medio del cultivo, y el tipo y estado fisiológico del explante (Fiore, 2002; Portillo *et al.*, 2007; Takamori *et al.*, 2015; Tejavathi *et al.*, 2007).

La naturaleza misma de la embriogénesis somática permite su aplicación en sistemas de cultivo líquido e inmersión temporal (Portillo y Santacruz-Ruvalcaba, 2006; Santacruz-Ruvalcaba y Portillo, 2009; Monja-Mio y Robert, 2013). Los mismos regeneran una mayor cantidad de material vegetal uniforme y el procedimiento es de gran valor para acelerar los métodos de mejoramiento genético clásico, pues permitirían lograr una multiplicación de variedades de importancia (Santacruz-Ruvalcaba y Portillo, 2009).

Al proceso de desarrollo de plantas completas en condiciones *ex vitro* a partir de embriones somáticos se le denomina conversión y es esencial para finalizar un proceso completo de un sistema basado en la embriogénesis somática. La conversión de los embriones somáticos difiere entre los genotipos, las especies y los sistemas de cultivo (Freire, 2003).

2.2.3.1 Origen de los embriones somáticos

Desde el comienzo del desarrollo de metodologías por esta técnica de regeneración (ES) coexisten teorías acerca del origen unicelular o multicelular de los embriones somáticos, algunas referencias señalan un origen unicelular de los embriones en varios cultivos (Haccius, 1977), pero también se ha demostrado que el embrión puede tener un origen multicelular (Williams y Maheswaran, 1986). Una de las teorías supone que los embriones de origen unicelular, observando las divisiones celulares coordinadas y el embrión algunas veces está conectado a el callo de origen mediante una estructura de tipo suspensor (Quiroz-Figueroa *et al.*, 2006). A diferencia, embriones de origen multicelular se observan inicialmente como una protuberancia teniendo contacto con el área basal sin observarse dependencia al callo de origen de tal forma se considera como organogénesis. Sin embargo, preexisten suficientes excepciones dentro de esta teoría (Freire, 2003) que aún no son claras. Los factores que estipulan si un embrión somático ha tenido un origen uni o multicelular son hasta hoy debatidos (Nikam *et al.*, 2003; Portillo *et al.*, 2007; Monja-Mio y Robert, 2013).

Las células pre-embriogénicamente muestran propiedades comunes a las células en activa división, presentando una intensa síntesis de ARN y actividad metabólica así como cambios histoquímicos y estructurales de las células, las cuales son de tamaño pequeño, citoplasma denso, núcleo grande con nucléolo prominente y acumulación de gránulos de almidón (George, 1993; William y Mahescuaran, 1986; Freire, 2003; Portillo, 2007).

La característica más distintiva de un embrión somático es la capacidad de formar una planta completa a partir de una célula. Es así, que los postulados sugieren las siguientes características principales:

- Es una estructura bipolar con un ápice radical, uno apical y cotiledones.
- Tiene autonomía frente al tejido generador (protegido generalmente por una epidermis).
- Histológicamente se plantea que no tiene conexión vascular con el tejido que le dio origen, por lo que pueden ser separados fácilmente de este.

- Presenta bandas procambiales entre los ápices.

La inducción del estado embriogénico incluye la activación de los mismos mecanismos genéticos que conllevan a la embriogénesis cigótica. En comparación a los embriones cigóticos, los embriones somáticos no contienen un nuevo grupo de genes, sino que poseen la misma combinación genética del explante (George, 1993; Parrot *et al.*, 1988). Con esto se concluye que la inducción de la embriogénesis somática consiste en la terminación del patrón de expresión de los genes presentes en el tejido del explante, siendo esto reemplazado con un programa de expresión de genes o gen de la embriogénesis en aquellas células del tejido del explante que pudieran dar lugar a embriones somáticos (Evans *et al.*, 1981).

2.2.3.2 Morfología y fisiología de embriones somáticos

Se han observado referencias morfológicas que han revelado la existencia de cuatro etapas embrionarias. Las primeras tres etapas tempranas se han descrito por Fujimura y Komamine (1980) en la embriogénesis *Daucus carota L.* (zanahoria). La etapa cero comienza el proceso de dediferenciación donde las células sufren continuas divisiones para formar agregados celulares con la presencia de altas concentraciones de auxina en el medio de cultivo. En la etapa uno, los agregados celulares adquieren cierta totipotencia celular capaz de desarrollar embriones (calogénesis). La etapa dos, da lugar cuando el callo o agregado celular es inducido por la transferencia a un medio de cultivo libre de reguladores de crecimiento, en esta misma etapa se inicia la polarización en sitios puntuales del agregado por la síntesis de ADN, dando lugar al embrión globular y su suspensor en la zona que no ocurrió división. La tercera etapa y última, las plantas dicotiledóneas continúan el desarrollo del embrión en las etapas de corazón y torpedo. Para las especies monocotiledóneas existen las etapas cero, uno y dos; pero la etapa tres no, ya que el embrión globular sufre un proceso de transición en el cual se alarga hasta llegar a formarse el embrión maduro, pasando por las fases de escutelar y coleoptilar (George, 1993; Fujimura y Komamine, 1980; Freire, 2003), sin embargo, recientemente se reporta la ocurrencia de embriones con características dicotilenares (Ayala-González *et al.*, 2014).

2.3 Conservación *ex-situ* de los recursos genéticos vegetales

Las estrategias *ex situ* que se implementan para la conservación de las especies, han sido desarrolladas a causa de factores como la destrucción de los diferentes ecosistemas por cambio de uso de suelo en consecuencia del acelerado crecimiento poblacional, cambio climático y la continua explotación de sólo unas pocas especies (Forero, 1989).

La planeación para la conservación de especies vegetales se ha implementado en el establecimiento de jardines botánicos, colecciones en campo y arboretos. Estas colecciones son grupos de plantas vivas establecidas en espacios determinados, con criterios geográficos o ecológicos, clasificadas taxonómicamente y documentadas debidamente así como en mantenimiento continuo, estas alternativas contienen el máximo de especies del grupo en cuestión (Normah *et al.*, 2012).

Sin embargo, los bancos de germoplasma son un sistema para la conservación de material biológico vegetal tiene amplias ventajas frente a los sistemas de preservación de recursos fitogenéticos antes mencionados, ya que reduce el esfuerzo en mano de obra y costos que representan el mantenimiento, evitando riesgos fitopatológicos y ambientales de colecciones de germoplasma vegetal *in vivo* (Reed, 2008; Normah *et al.*, 2012; Gonzalez-Arno y Engelmann 2013).

Las categorías implementadas en los bancos de germoplasma son respecto al metabolismo y fisiología de los recursos genéticos a conservar dado que algunas especies producen semillas ortodoxas y otro grupo semillas recalcitrantes, incluyendo a especies con las que no se puede implementar la conservación de semillas, ya que se reproducen vegetativamente, que no suele producir semilla o que presentan altos niveles de heterogeneidad (Engelmann 2004; Panis y Swennen, 2005).

Las semillas ortodoxas pueden ser almacenadas a largo plazo con bajos contenidos de humedad y a bajas temperaturas (-20 °C) almacenadas en cámaras frías (Engelmann, 2010).

Por otro lado, las especies con semillas recalcitrantes no pueden ser conservadas de esta manera, ya que pierden su viabilidad en corto tiempo y no toleran las condiciones de almacenamiento (Engelmann, 1997). Debido a esto, el cultivo de tejidos juega un papel

fundamental ante estas especies que son propagadas vegetativamente, manipulando los procesos metabólicos con bajas concentraciones de aditivos en el medio de cultivo, fotoperiodos, temperatura, entre otros (conservación a corto y mediano plazo) (González-Arno y Engelmann 2013).

Estos protocolos son de gran utilidad para plantas con mayores complejidades, aunque esto implique el subcultivo de extensas colecciones prolongadamente, contaminación por error humano, monitoreo de la respuesta frente a estímulos fisiológicos y metabólicos que le ocasiona el medio de cultivo y factores en control, pérdida de la integridad genética del material debido al excesivo “repique” induciendo variación somaclonal (Normah *et al.*, 2012).

La crioconservación comparada con otras técnicas, presenta ventajas muy favorables en cuanto a la optimización de costos y procesos. Desde que el material se almacena en tanques, el espacio para mantener la colección resulta ser mucho menor, el costo para labores y mantenimiento es mínimo (solamente el llenado continuo del tanque) y, una vez almacenadas las muestras, estas no se manipulan, lo que disminuye significativamente los costos (Villalobos y Engelmann, 1995).

Ese hecho, sumado a la difícil manipulación del germoplasma de algunas especies tropicales y forestales, hace que la crioconservación se perfila como una solución a los desafíos de la conservación a largo plazo de especies en países con gran biodiversidad (Abdelnour, 1999).

2.3.1 Crioconservación del material fitogenético

La crioconservación es una técnica que tiene como objetivo el mantenimiento de la viabilidad y funcionabilidad celular a temperaturas bajas, con el fin de almacenar especies por largo tiempo (Ávila-Portillo *et al.*, 2006). Todos estos materiales vegetales contienen, en estado fresco, altas cantidades de agua en sus células; además, la gran mayoría de ellos son extremadamente sensibles a la congelación o incluso no pueden tolerarla. Por esta razón, a fin de evitar los daños que causa la cristalización del agua intracelular, las células de los tejidos deben ser deshidratadas o protegidas de alguna manera (Meryman y Williams, 1985).

Estas particularidades han generado diversos métodos que se aplican según la especie y la parte que se desee conservar, así como de modificaciones en los procesos que van desde el régimen de enfriamiento, tipo de desecación, concentraciones de soluciones crioprotectoras como las soluciones vitrificadoras llamadas PVS (“Plant Vitrification Solution”) por sus siglas en inglés, hasta la duración del tiempo en las que las muestras se someten al tratamiento y los medios de cultivo (Engelmann, 2004) (Figura 2). Colecciones crioconservadas ubicadas en varios países alrededor el mundo, son una evidencia de la utilidad de esta metodología, con el fin de resguardar copias de seguridad de materiales vegetales valiosos (Reed, 2008). En el caso particular de *Agave* spp., su origen unicelular por ES ya reportado (Portillo *et al.*, 2007), la problemática que enfrenta ante amenazas ambientales, degradación de poblaciones, así como la alta demanda de este género, permitirá preservarlo bajo los requerimientos de mantenimiento y espacio mínimo que ofrece la crioconservación, con el fin de aprovechar su gran potencial de manera segura, sustentable y racional (Gonzalez-Arno y Engelmann, 2013).

Durante la última década, se han iniciado importantes esfuerzos dirigidos al rescate y uso de la biodiversidad, principalmente mediante la aplicación de nuevas técnicas que representen una solución viable y segura para la conservación a largo plazo de los recursos fitogenéticos.

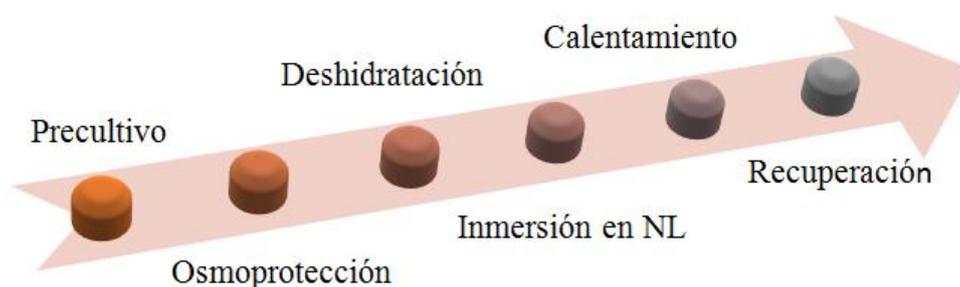


Figura 2. Principales etapas en el proceso para la crioconservación de especies.

2.3.2 Material biológico

Hoy existen novedosos protocolos de crioconservación cuyo uso se ha extendido con éxito a una gran diversidad de especies vegetales y que contribuyen, cada vez más, al uso de ésta técnica para la conservación de germoplasma. El material biológico utilizado son: semillas, embriones cigóticos y somáticos, callos, yemas apicales, meristemas y suspensiones celulares (Engelmann, 1997; Reed 2008; Normah *et al.*, 2012; Martínez-Montero *et al.*, 1998; González-Arno *et al.*, 2008). Engelmann (2004), señala la ventaja de utilizar embriones somáticos a partir de tejidos jóvenes para la obtención de clones eficientemente; pudiéndose conservar líneas elite, líneas celulares con atributos especiales y dado el caso, material genéticamente transformado (hasta que los resultados de las pruebas de campo estén disponibles). Sin embargo, el material dependerá de la disposición de cada especie, y la óptima regeneración de cada material (Engelmann, 2010; Wilkinson *et al.*, 2003).

2.3.3 Preparación del germoplasma para crioconservación

Para cada especie y tipo de tejido, el protocolo de crioconservación debe adaptarse en relación a su resistencia a la congelación natural, el tamaño del explante y contenido de agua (Panis *et al.*, 2002). La parte fundamental para que un material biológico soporte bajas temperaturas se basa en la eliminación de agua con el fin de evitar el daño de la cristalización del hielo ante procesos de enfriamiento, además de la estabilización de las membranas y la estructura molecular de las células por la pérdida de agua (Pence, 2014).

Los estudios realizados tratan de entender los efectos de las temperaturas bajas sobre los sistemas celulares, ya que el tiempo biológico es una consecuencia de determinadas reacciones bioquímicas y el frío prolonga el tiempo biológico puesto que enlentece estas reacciones metabólicas (Ávila-Portillo *et al.*, 2006).

Debido a la gran cantidad de agua que contiene la célula en su interior, esta debe ser protegida y preparada de alguna forma mediante el uso de soluciones altamente concentradas, en combinación o no, con la deshidratación física (sílica gel o flujos de aire) y química (soluciones PVS), regulando los cambios osmóticos y la congelación, pudiéndose recuperar posteriormente (Reed, 2008).

2.3.4 Pretratamientos

Durante el precultivo, las concentraciones de sacarosa se aumentan en los medios de cultivo. La acumulación de crioprotectores endógenos como el azúcar puede aumentar la estabilidad de las membranas en condiciones de severa deshidratación, la tolerancia que presentan los tejidos ante el enfriamiento es debido a la respuesta del estrés osmótico en el que se sometieron, causado por el precultivo. Además, en el precultivo hay producción de ácido abscísico, prolina, y ciertas proteínas (abundantes en embriogénesis tardía), y la absorción de manitol (Reed, 2008; Hirai y Sakai, 1999; Wen y Wang, 2010). Cuando se utilizan soluciones concentradas, algunas veces se combinan los aditivos o se utilizan con conjunto con técnicas de vitrificación y deshidratación, éstos se aplican en un medio de cultivo deshidratando físicamente la células (Escobar *et al.*, 1997).

2.3.5 Crioprotección

Se debe tomar en cuenta Al seleccionar un tratamiento crioprotector, se debe considerar la velocidad de enfriamiento que se utilizará, ya que existe crioprotección química o física. La primera enunciada, son sustancias que al embeber el material vegetal en ellas, hacer que disminuyan los daños producidos a la congelación (Reed, 2008).

Dentro de esas soluciones, cabe destacar que interactúan de forma distinta, clasificándose en dos grupos; las que penetran al interior de la célula y las que no. Las primeras, reducen la velocidad de crecimiento y tamaño de los cristales de hielo, al aumentar la viscosidad de las soluciones intracelulares evitando la excesiva pérdida de agua, por lo tanto los daños producidos son por desecación. Por el contrario, las soluciones que no penetran al interior de la célula, producirán la deshidratación osmótica, bajando así la temperatura de congelación de las soluciones intra y extra celular, además de estabilizar la membrana plasmática y de orgánulos (Normah *et al.*, 2012).

El manejo de soluciones crioprotectantes que se adicionan para el proceso de crioconservación pueden estar vinculados a la toxicidad química, a la presión osmótica

que se genera, a la pérdida de agua que se induce y, en especial, a la formación de cristales de hielo en el medio intracelular, causando daños letales y/o cambios a nivel de ADN (González-Arno y Engelmann, 2013)

Los crioprotectores no deben causar toxicidad a la célula ni alguna alteración ajena a los procesos que se pretenden controlar. Los más utilizados son el dimetilsulfóxido (DMSO) y glicerol, esta combinación suele funcionar con el enfriamiento rápido. Mientras que la combinación de otros compuestos como sacarosa (0.5 M como pretratamiento) parece más efectiva en enfriamiento lento (Martínez-Montero *et al.*, 1998). También se reporta el uso de polietilenglicol (PEG) y la polivinilpirridoxona (PVP) (Reed, 2008; Hubálek, 2003).

El tiempo de aplicar los crioprotectores está en relación con la temperatura. A temperatura ambiente reduce el tiempo de congelación con respecto a la aplicación en frío (1-2 °C), que suele ser de 30-60 min, para evitar problemas de toxicidad (Guzmán-García *et al.*, 2013).

Las soluciones vitrificadoras son más concentradas a los crioprotectantes, para su efecto, las muestras primeramente son expuestas a soluciones de carga con concentración intermedia (generalmente 2 M glicerol + sacarosa 0.4 M) (Yamamoto *et al.*, 2015). Después el material biológico es deshidratado por alguna solución vitrificadora. Se han desarrollado una serie de soluciones dando origen a PVS2 Y PVS3 (las más utilizadas) (Panta *et al.*, 2014), compuestas por, PVS3: 50 % de glicerol+ 50 % de sacarosa y PVS2: 30 % de glicerol + 15 % de etilenglicol + 15 % DMSO (en medio de cultivo con 0.4 M de sacarosa), respectivamente. Después de que se sometan a congelación en algunos casos, las muestras sufren un rápido calentamiento en un baño de agua a 37-40 °C, y las soluciones vitrificantes altamente tóxicas se retiran sustituyéndose por una solución de sacarosa que contiene desde 0.8 hasta 1.2 M de sacarosa, lo que permite la rehidratación progresiva de las muestras (Sakai y Engelmann, 2007; Reed, 2008).

La deshidratación física consiste en un procedimiento más sencillo, ya que en este se enfoca en que exista una extracción de la cantidad de agua mínima que contenga el material biológico, sin que pierda su viabilidad. Esto se logra mediante la corriente de aire de flujo laminar, en cápsulas de desecación con sílica gel soluciones salinas saturadas (Yamamoto *et al.*, 2015; Awad, 2011).

Es de importancia tener en cuenta la humedad relativa en el ambiente, ya que si ésta es alta, no permite la deshidratación correcta (Reed, 2008).

La deshidratación se ha aplicado a semillas, embriones y ejes embrionarios de un gran número especies (Pence, 2014). Se obtiene generalmente una supervivencia óptima cuando las muestras son criopreservados con un contenido de agua comprendido entre 10% y 20% (base en peso fresco).

Entre tanto, el método de vitrificación como en la deshidratación pueden aplicarse con una encapsulación previa del material, esta se logra con alginato de sodio polimerizadas con cloruro de calcio (CaCl_2), permitiendo que la desecación sea indirecta haciéndola más lenta y paulatina (Balwinder *et al.*, 2007; Niino *et al.*, 2013).

2.3.6 Técnicas de crioconservación

En las últimas décadas, el progreso de nuevas investigaciones ha promovido el desarrollo de metodologías y técnicas para crioconservación con el objetivo de mejorar y eficientar protocolos para diversas especies (Cuadro 1). Al presente, se practican una serie de métodos tales como: la inmersión directa en nitrógeno líquido, la deshidratación, la encapsulación-deshidratación, la vitrificación, la encapsulación-vitrificación, Droplet-vitrification D- and V-cryoplate (Sakai, 1995; Panis y Swennen, 2005; Engelmann, 2010; González-Arno y Engelmann, 2013; Niino *et al.*, 2013).

La posibilidad de generar procedimientos generales para criogenia fue innovado mediante la utilización de crioláminas de aluminio con pozos (Niino *et al.*, 2013), lo cual facilitó la manipulación de fluidos y tratamientos de secado por sílica gel y vitrificación (Yamamoto *et al.*, 2012). Estos protocolos han sido empleados exitosamente en la conservación y almacenamiento, de importantes colecciones de germoplasma de papa (Engelmann, 2004; Yamamoto *et al.*, 2015; Niino *et al.*, 2014).

Cuadro 1. Métodos adecuados (+) y no recomendados (-) para las diferentes formas de cultivo *in vitro* de plantas para la crioconservación.

Método	Susp. celulares y callos	Ápices	Embriones somáticos/cigóticos	Semillas
1. Protocolos convencionales	+++	+	-	-
2. Encapsulación-deshidratación	-	+++	++	-
3. Vitrificación y protocolos derivados: gota-vitrificación, encapsulación/vitrificación y crio-lámina	-	+++	++	-
4. Precultivo-desección	-	-	++	-
5. Desección	-	-	-	++

Fuente: González-Armao y Engelmann, 2013.
 + recomendado
 - no recomendado

Congelación:

Por la nucleación del agua se forman cristales de hielo, si el enfriamiento no es un proceso muy rápido, al aumentar la concentración de la solución extracelular (por congelación del agua), la célula (por osmosis) pierde agua. Con esta desecación la solución intracelular, baja su temperatura de congelación con el descenso gradual de la temperatura la célula deshidratándose y provocando una plasmólisis permanente causando muerte celular (Normah *et al.*, 2012).

Si el enfriamiento es rápido, no hay tiempo que el agua salga de la célula y si el punto de congelación del líquido se alcanza, se producirá lisis celular. Es así que, si la velocidad de descenso de la temperatura es intermedia se producirá una desecación gradual de la célula y se llegará a un punto en que las soluciones adquieren un estado vítreo (amorfo), o se formen muy pequeños cristales de hielo. Sin embargo si el enfriamiento es muy rápido (inmersión directa al nitrógeno líquido) y las soluciones intra y extracelulares están muy concentradas estas se vitrifican no provocando daños (Sakai, 2000).

En conclusión, el enfriamiento rápido; requiere que haya una baja disponibilidad de agua para que no se formen cristales de hielo, si bien, porque el material biológico se haya desecado previamente, o se hayan concentrado las soluciones intra y extracelular (Reed *et al.*, 1998). En el enfriamiento lento; se produce la desecación al formarse hielo extracelular (descenso lento hasta los 40 °C y después a inmersión en nitrógeno líquido)

la temperatura es constantemente controlada por rangos de 0.1 a 1.0 °C /min (Pence, 2014).

2.3.7 Regeneración post-crioconservación

Una vez logrado un óptimo almacenamiento del material, se presenta un factor importante; el calentamiento y regeneración del material.

Los tejidos pueden contener pequeños cristales, estos deben ser descongelados rápidamente para evitar que los cristales se descongelen momentáneamente y recristalicen de nuevo con un tamaño mayor, la temperatura a la que se pueden recristalizar puede ser desde los 80 °C (Reed, 2008; Gonzalez-Arno y Engelmann, 2013).

Por lo tanto, el uso de sustancias crioprotectoras, después de congelación son necesarias así como el de retirarlas una vez cumplida su función ya que pueden ser tóxicas (Yamamoto *et al.*, 2015). Un procedimiento consiste en pasar los especímenes por soluciones cada vez más diluidas del crioprotector o de sacarosa, o pasarlas un medio fresco después de uno a dos días de cultivo, asimismo se ha observado que una intensidad lumínica baja o la adición de algún regulador de crecimiento favorece la recuperación y regeneración (Pence, 2014).

2.4 Integridad genética

Para la conservación del germoplasma es indispensable la detección de algún cambio morfológico o a nivel de ADN, ya que es preciso mantener la estabilidad genética del genotipo deseado (Tabares *et al.*, 1991). Para la identificación de alguna alteración a nivel molecular en plantas micropropagadas y expuestas a condiciones extremas como crioconservación, los marcadores moleculares son una posible alternativa para la detección. Las técnicas empleadas para su uso son muy diversas, todo depende del uso adecuado y el criterio en su selección, ya que estos proporcionan información como la identidad de la planta donadora y sus regenerantes micropropagados, estimar los polimorfismos en loci diseminados por todo el genoma, fidelidad genética, uniformidad y estabilidad, niveles y mecanismos de la variación somaclonal, entre otros (Azofeifa-Delgado, 2006).

2.4.1 Sistemas de marcadores moleculares

Como se ha mencionado, los marcadores moleculares son herramientas adecuadas para la detección de algún cambio en el genoma (Karp *et al.*, 1997), estos sistemas se basan fundamentalmente en el análisis de las diferencias en pequeñas secuencias del ADN entre individuos los cuales pueden ser de carácter dominante o codominante (Karp y Edwards, 1998). El uso de marcadores moleculares para la evaluación de las variaciones representa grandes ventajas comparado con otros métodos (como la evaluación fenotípica), sobre todo en aquellas plantas en donde los cambios fenotípicos no han sido obvios (Rahman y Rajora, 2001).

Según Karp *et al.* (1997), los marcadores se pueden clasificar en tres categorías básicas; en la categoría uno se incluyen los métodos que no se basan en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Categoría dos: técnicas que utilizan iniciadores (“primer”) arbitrarios o semiarbitrarios, por ejemplo, iniciadores PCR múltiples arbitrarios (MAAP). Categoría tres: PCR con sitio “objetivo específico”, por ejemplo, Intersecuencias simples repetidas (ISSR). Las categorías dos y tres son marcadores basados en la PCR (Azofeifa-Delgado, 2006).

Dentro de la gama de marcadores moleculares, las ínter-secuencias simples repetidas (ISSR, por sus siglas en inglés) (Zietkiewikz *et al.*, 1994), amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD, por sus siglas en inglés) (Williams *et al.*, 1990; Rani *et al.*, 1995; Gil-Vegas *et al.*, 2001), los polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados (AFLP, por sus siglas en inglés) (Infante *et al.*, 2003; Gil-Vegas *et al.*, 2006) han sido de los más utilizados.

Sin embargo, para el uso de marcadores moleculares, el ADN debe estar preparado de la manera más limpia, ya que las enzimas son sensibles a la calidad y la pureza del ADN, además que aumenta la agudeza de las bandas (Keb-Llanes *et al.*, 2012). Los cebadores generados por medio de la amplificación por PCR, demuestran ser útiles para determinar variaciones genéticas entre los materiales analizados, en donde se ha observado más diferencia entre poblaciones y dentro de poblaciones (Dávila *et al.*, 2007). La forma de evaluar e interpretar los resultados, es a través de la comparación de los patrones de bandas entre la planta madre y de los genotipos seleccionados para su

estudio, en donde se puede detectar un buen número de polimorfismos con tan solo uno o dos pares de cebadores (Medina *et al.*, 2007)

En particular, los AFLP son marcadores bialélicos dominantes y son capaces de detectar las variaciones en muchos loci simultáneamente en específico, estos revelan variaciones en nucleótidos únicos de regiones genómicas desconocidas, en las que puede hallarse frecuentemente una mutación en genes funcionales indeterminados (Vos *et al.*, 1995).

2.4.2 Marcadores moleculares en la detección de variaciones en *Agave* spp.

Los estudios moleculares han sido muy útiles en el establecimiento de las diferencias genéticas en algunas especies, especialmente en aquellos en los que la base de datos del ADN es conocido. En particular, en algunas especies del género *Agave*, principalmente de origen tropical, se ha reportado el uso de marcadores ISSRs con el propósito de evaluar su utilidad en el estudio de establecer relación genética entre especies del mismo género, así como la variabilidad genética que existe entre los individuos de la especie (Dávila *et al.*, 2007; Torres-Morán *et al.*, 2013). A pesar de su utilidad, existen marcadores moleculares como los AFLPs que son robustos y reproducibles, teniendo como ventaja que pueden ser usados sin conocimiento previo del genoma (Keb-Llanes *et al.*, 2012). Infante *et al.*, (2006) reportan la efectividad del uso de estos dos sistemas de marcadores, detectando la variabilidad que existe entre planta madre y los clones en diferentes especies de *Agave* comparando los patrones de bandas de marcadores moleculares.

2.4.3 Variación somaclonal

Los cambios genéticos y epigenéticos observados en las plantas regeneradas a partir de cultivos de células somáticas se denominan variación somaclonal (soma-cuerpo vegetativo, clon-copia idéntica) (Bhojwani y Dantu, 2013; Portillo *et al.*, 2007).

Existen diferentes factores que pueden influir en la variación somaclonal, tales como los reguladores de crecimiento, el tipo de explante y el genotipo, el medio de cultivo, tamaño de explante, ambiente, estado de desarrollo, vitaminas, fuentes de carbono, antioxidantes y concentración de nitrógeno (Ayala, 2010; Viñas y Jiménez, 2011;

Portillo *et al.*, 2012). Dentro de las variaciones que presentan las plantas en el ambiente *in vitro*, estas pueden ser definitivas (genéticas) o temporales (epigenéticas). Dentro de las variaciones definitivas, la principal causa encontrada son los rearrreglos cromosómicos, sin embargo también se ha observado cuando hay un entrecruce (crossing over) somático, un intercambio de cromáticas hermanas, una metilación por cambios en la secuencia de nucleótidos, alguna alteración en la replicación del ADN, o al silenciamiento o alteración de genes por mutaciones ocurridas en regiones no codificadas. La detección de estos cambios ha sido mediante pruebas de transmisión genética o análisis de ADN (Tabares *et al.*, 1991).

Hasta hoy, el origen de la variación somaclonal no ha sido claro ya que difiere de una planta y otra, presentándose de manera atípica en el mismo cultivo.

2.4.4 Evaluación de la estabilidad de germoplasma vegetal conservado

Las pruebas de estabilidad genética puede ser aplicada en cualquier etapa del proceso; sin embargo, los estudios realizados hasta la fecha han demostrado que no existe ninguna inestabilidad en las muestras crioconservadas. Un gran número de estudios utilizando parámetros morfológicos, citológicos, técnicas bioquímicas y moleculares indican que la eintegridad genética permanece inalterada (Harding, 2004).

En todos los protocolos de crioconservación, la regeneración de los explantes es un factor muy importante. El nuevo crecimiento de los tejidos organizados sin callo proporciona una recuperación segura de los materiales almacenados. El almacenamiento en nitrógeno líquido (NL) debe dar lugar a un menor número de mutaciones que los materiales que se tienen en campo o en algún proceso de regeneración *in vitro*. Para los protocolos que incluyen una fase de cultivo *in vitro* y o en algún protocolo de conservación a mediano y corto plazo, es necesario evaluar su integridad genética (Reed, 2008).

3. HIPÓTESIS

Especies del género *Agave* responden de la misma forma si se estimulan en las mismas condiciones y concentraciones de suplementos *in vitro* para la producción de embriones somáticos a partir de callo, mismos que serán aptos para la crioconservación sin verse afectada su integridad genética.

4. OBJETIVOS

General

- Inducir embriogénesis somática indirecta y crioconservar los embriones generados, de *A. tequilana* cv. azul y *A. tequilana* cv. chato.

Específico

- Optimizar y establecer un protocolo estandarizado mediante la adición de aminoácidos por embriogénesis somática en *A. tequilana* cv. azul.
- Establecer un protocolo de regeneración por embriogénesis somática en *Agave tequilana* cv. chato.
- Desarrollar un protocolo criogénico para embriones en *A. tequilana* cv. azul.
- Analizar mediante marcadores moleculares la integridad genética a partir de plantas regeneradas por embriogénesis somática y criogénicamente preservadas.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Embriogénesis somática indirecta

El material biológico se obtuvo a partir de una línea celular embriogénica (ES4) de *Agave tequilana* Weber cultivar azul del Laboratorio de Cultivo de Tejidos en el Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA), en la Universidad de Guadalajara. La propagación del material *in vitro* se realizó en medio MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con las vitaminas L2 (Phillips y Collins, 1979) y la adición de $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de 6-bencilaminopurina (BA).

Todos los cultivos se incubaron en condiciones de fotoperiodo (16 h luz / 8 h oscuridad) con una intensidad luminosa de 2,000 lux., bajo temperatura de $27\pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ en frascos de cristal con capacidad 100 mL y se añadieron 25 mL medio de cultivo.

5.1.1 Experimentos para eficientar la producción de embriones somáticos *en A. tequilana* Weber cv. azul (genotipo ES4)

Con la finalidad de eficientar el protocolo reportado por Portillo *et al.* (2007) para la producción de embriones somáticos, se realizaron los siguientes cuatro experimentos factoriales, los factores a evaluar fueron aminoácidos, explantes y concentraciones de reguladores de crecimiento (según sea el caso).

Los explantes utilizados fueron segmentos de 1 cm de hojas jóvenes y raíces, la fase de inducción se llevó a cabo en medio basal MS con adición de $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y $0.3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA $\text{mg}\cdot\text{L}$ (control) en frascos de cristal con 25 mL de medio durante 40 d a una temperatura de $27 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. Los medios de cultivo fueron ajustados a un pH 5.8 ± 0.5 y con 8 g L^{-1} de agar (A-1296 Sigma[®]) como agente gelificante. Su esterilización fue en una autoclave a $121 \text{ }^\circ\text{C}$ y 1.1 kg cm^{-2} de presión por 15 min. Para la fase de expresión, se realizaron modificaciones en las sales basales MS disminuyendo la cantidad de nitrato (Castro-Concha *et al.*, 1990) y la adición de aminoácidos de $500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ glutamina y $250 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ hidrolizado de caseína generando un medio denominado LOG, para su solidificación se agregaron $6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de Phytigel[®] (P-8169 Sigma[®]). Se vació 25 mL del medio LOG en cajas Petri plásticas estériles de

10 cm de diámetro. Las evaluaciones se realizaron a los 30 d después de la transferencia.

5.1.1.1 Embriogénesis somática en ES4 con adición de aminoácidos

El objetivo de este experimento fue eficientar con nuevos aditivos al medio de inducción y expresión. El diseño experimental fue un factorial evaluando la adición de aminoácidos; triptófano ($100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) y adenina ($40 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), así como el tipo explante. Cada tratamiento contó cinco repeticiones por tratamiento. Los explantes (ocho por caja Petri) fueron hojas jóvenes para todos los tratamientos (cuadro 2) y para raíz solo se sometió a tratamientos A y B en inducción y en expresión al medio 1, los tratamientos fueron los siguientes:

Fase 1.- Inducción

A.- MS+2.0 mg/L 2,4-D+ 0.3 mg/L BA (**control**)

B.- MS+ 2,4-D+ BA+ GLUTAMINA+ HIDROLIZADO DE CASEINA

C.-MS+2,4-D+ BA+ GLUTAMINA+ HIDROLIZADO DE CASEINA+ TRIPTOFANO

D.- MS+2,4-D+ BA +GLUTAMINA+ HIDROLIZADO DE CASEINA + ADENINA

E.- MS+2,4-D+ BA +GLUTAMINA+ HIDROLIZADO DE CASEINA + ADENINA + TRIPTOFANO

Posteriormente a los 40 d en inducción se hizo la transferencia a medio de expresión para la diferenciación de las células y expresión de embriones, registrando el peso en gramos del callo generado por cada tratamiento.

Fase 2.- Expresión

1.- LOG +GLUTAMINA+ HIDROLIZADO DE CASEINA

2.- LOG +GLUTAMINA+ HIDROLIZADO DE CASEINA+ TRIPTOFANO

3.- LOG +GLUTAMINA+ HIDROLIZADO DE CASEINA+ ADENINA

4.-LOG +GLUTAMINA+ HIDROLIZADO DE CASEINA+ TRIPTOFANO+ ADENINA

Las evaluaciones realizadas fueron a los 30 d a partir de la segunda fase de manera continua registrando el número de embriones por callo.

Cuadro 2. Tratamientos con aminoácidos para la inducción de ES4

TRATAMIENTOS	1	2	3	4
A	A1	A2	A3	A4
B	B1	B2	B3	B4
C	C1	C2	C3	C4
D	D1	D2	D3	D4
E	E1	E2	E4	E5

5.1.1.2 Comparación de las concentraciones de 2,4-D y picloram (auxinas) para la inducción de callo en ES4 a partir de raíz

El propósito de probar las concentraciones y formas de acción de las auxinas para demostrar la capacidad de producción del número de embriones por explante, permite comparar la factibilidad de usar mayores o menores cantidades de las mismas y así, la estandarización del protocolo de la manera más óptima.

El diseño experimental fue un bifactorial para evaluación de dos reguladores de crecimiento; 2,4-D y picloram en la fase de inducción. Cada tratamiento se realizó con cinco repeticiones (cuadro 3) y cada unidad experimental consistió en una caja Petri con 25 mL de medio sólido con ocho explantes de raíz.

Cuadro 3. Tratamientos de 2,4-D y picloram en combinación con la citocinina BA.

TRATAMIENTOS	2,4-D	PICLORAM
M·L ⁻¹		
	1.0	1.0
BA	2.0	2.0
0.3	4.0	4.0
	8.0	8.0

Después de 40 d en fase de inducción fueron transferidos los callos de raíz a medio de cultivo de expresión. Las evaluaciones realizadas fueron cada 30 d.

5.1.1.3 Inducción de embriogénesis somática con diferentes concentraciones de picloram en ES4

La auxina picloram ha sido reportada (Monja *et al.*, 2013) como una de las más eficientes en la generación de mayor masa callogénica, mismo factor permite generar mayor cantidad de células desdiferenciadas que en su caso podrían polarizarse hasta generar embriones. Sin embargo, el genotipo y tipo de callo (friable), entre otros factores, determinan el origen de un embrión. Por consiguiente, el uso de esta auxina en combinación con la citocinina BA (cuadro 4), genera una alternativa para embriogénesis somática indirecta. El diseño experimental fue un trifactorial con diez repeticiones por tratamiento probando concentraciones de picloram y BA y explante (hoja y raíz).

Cuadro 4. Tratamientos para la inducción de callo en ES4 con picloram y BA

		PICLORAM				
		mg·L ⁻¹	4.0	6.0	8.0	10.0
BA	0	1	2	3	4	
	0.3	5	6	7	8	
	0.6	9	10	11	12	
	0.9	13	14	15	16	

5.1.1.4 Inducción de embriogénesis somática con diferentes concentraciones de 2,4-D en ES4

La detección de posibles concentraciones de reguladores de crecimiento idóneas para la producción de embriones, es indispensable para disminuir tiempos y costos en el proceso. Por lo tanto, la prueba de diferentes cantidades (cuadro 5) en la adición al medio MS permitió observar con el diseño trifactorial con diez repeticiones por tratamiento la tendencia que tienen los reguladores de crecimiento (2,4-D y BA) en el genotipo ES4 para la inducción de callo embriogénico, además de observar la vía para estimular cada explante (hoja y raíz).

Cuadro 5. Tratamientos para la inducción de callo en ES4 con 2,4-D y BA

		2,4-D				
		mg·L ⁻¹	2.0	4.0	6.0	8.0
BA	0	1	2	3	4	
	0.3	5	6	7	8	
	0.6	9	10	11	12	
	0.9	13	14	15	16	

5.1.2 Embriogénesis somática en diversos genotipos

El material en estudio *in vitro* se obtuvo del Laboratorio de Cultivos de Tejidos del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias el genotipo seleccionado proviene de hijuelos y fue propagado hasta obtener la mayor cantidad de brotes y hojas.

Con el fin de obtener ESI en otros genotipos ajenos a la línea embriogénica (ES4) se probó las concentración de la auxina (2,4-D) y citocinina (BA) basándose en el protocolo reportado por (Portillo *et al.*, 2007), y mismas condiciones ambientales y aditivos de los experimentos antes mencionados. Después de un período de 40 d en el medio de inducción, los callos formados se transfirieron al medio de expresión y en él se llevó a cabo la expresión de los embriones. Se evaluó el número de embriones cada 15 d de cada experimento (ver apartado 5.1.1).

5.1.2.1 Inducción de embriogénesis somática en *Agave tequilana* Weber cv. azul genotipo A3H1 y ES4 por selección de tejido embriogénico

Para observar la capacidad embriogénica que tiene un tejido al estimularlo nuevamente con auxinas, se seleccionó callo (previamente generado a partir de hoja) no embriogénico (control), callo embriogénico y embriones como explantes para inducción. Para el caso de A3H1 se realizaron tres cajas por tipo de tejido (cuatro explantes por caja).

Para el genotipo ES4 se colocaron cuatro explantes de callo embriogénico (previamente generado a partir de hoja y raíz) y cuatro de tejido de embrión geminado (90 d).

5.1.2.2 Inducción de embriogénesis somática en raíz con 2,4-D y BA en genotipos G0 (*Agave maximiliana*, A3H1 (hijuelo de *A. tequilana*) y ES4 (*A. tequilana* línea embriogénica).

En el diseño bifactorial donde se evaluó el genotipo y concentraciones de 2,4-D, se llevó a cabo con 10 repeticiones por tratamiento y ocho explantes de raíz por repetición. Los explantes expuestos en medio de inducción por 40 d fueron subcultivados en medio de expresión registrando el peso del callo generado.

En adición, se agregó 1 g/L de polivinilpirrolidona (PVP) a la mitad de las repeticiones de cada tratamiento (5 repeticiones), la presencia de este aditivo se justifica por la oxidación presente en los explantes de experimentos anteriores (cuadro 6). A partir de los 40 d en medio de expresión se evaluó la producción de embriones.

Cuadro 6. Tratamientos para la inducción de callo en diversos genotipos con 2,4-D y BA. G0 (*Agave maximiliana*, A3H1 (hijuelo de *A. tequilana*) y ES4 (*A. tequilana* línea embriogénica).

TRATAMIENTO	GENOTIPO	2,4-D MG·L ⁻¹	BA MG·L ⁻¹	PVP
1	G0	2.0	0.3	+/-
2	A3H1	2.0	0.3	+/-
3	ES4	2.0	0.3	+/-
4	G0	3.0	0.3	+/-
5	A3H1	3.0	0.3	+/-
6	ES4	3.0	0.3	+/-

+ Presencia
- Ausencia

5.1.2.3 Inducción de embriogénesis somática en *A. tequilana* cv. chato

Se realizó la colecta de por lo menos doce bulbillos (altura 10-15 cm) en el Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias mismos que fueron obtenidos del escapo floral de un individuo que presentaba vigor. Para su establecimiento *in vitro* los bulbillos se limpiaron, enjuagaron con agua corriente y deshojaron hasta quedar con las últimas hojas fusionadas, cortando la raíz. Posteriormente se sometieron a una solución con 200 µL mefenoxam (RidomilGold®) al 46 % como fungicida sistémico en 100 mL agua destilada por 30 min en agitación continua, al término, se realizaron 3 enjuagues de forma repetida con agua destilada. Para su desinfección, los bulbillos se pasaron a una solución de cloro 50:50 v/v en agua estéril agitando continuamente por 10 min bajo condiciones de campana de flujo laminar, enseguida se enjuagaron tres veces en recipientes con agua estéril. Finalmente, se realizaron cortes eliminando tejido dañado por el cloro y se cultivaron en medio MS suplementado con las vitaminas con 5 mg·L⁻¹ de 6-bencilaminopurina (BA) para su propagación. Se seleccionó el genotipo 7 de los doce establecidos debido a la mayor producción de brotes.

Se diseñó un experimento para la inducción de embriones con este genotipo, se emplearon las concentraciones de mayor rendimiento de los experimentos anteriores de auxinas utilizadas picloram (cuadro 7) y 2,4-D (cuadro 8) para *A. tequilana* genotipo ES4, que consistió en un bifactorial por cada auxina con 5 repeticiones por tratamiento.

Cuadro 7. Inducción de embriogénesis somática en cv. chato con diferentes concentraciones de picloram y BA

TRATAMIENTOS MG·L ⁻¹	
BA	picloram
0.3	6
0.6	8
	10

Cuadro 8. Inducción de embriogénesis somática en cv. chato con diferentes concentraciones de 2, 4-D y BA

TRATAMIENTOS MG·L ⁻¹	
1	
BA	2, 4-D
0.3	2
0.6	4
	6

Para el análisis estadístico de los datos, se manejó el paquete Statgraphics Centurión XV. La variable de respuesta fue el número de embriones somáticos producidos a partir de los 30 d en fase de expresión (transferencia a medio LOG), las evaluaciones se realizaron cada 15 d. Los diseños experimentales fueron multifactoriales y completamente al azar (según sea el caso) mediante comparaciones múltiples de medias y la prueba de diferencia mínima significativa (LSD) con el 95% de confiabilidad.

5.2 Crioconservación de embriones somáticos

Los embriones generados por embriogénesis somática fueron seleccionados en etapa torpedo por tamaño chico (1-2 mm) y grande (3-4 mm) y se sometieron a un precultivo en 0.3 M de sacarosa por 24 h a 24 °C con 2000 lux. Posteriormente cada muestra (30 embriones por tratamiento) se encapsularon con 2 % alginato de sodio con 0.4 M de sacarosa y 0.1 M cloruro de calcio en un lapso de tiempo por 15 min en crioláminas de aluminio. Las crioláminas se sumergieron en solución de carga con 1.0 M de sacarosa y 2.0 M de glicina durante 30 min de acuerdo al protocolo por Yamamoto *et al.* (2015).

5.2.1 Deshidratación en silica gel

Se probaron diferentes tiempos para su deshidratación (30, 60 y 90 min). Los tejidos que previamente se habían encapsulado y tratado con solución de carga se pusieron a

exposición en cajas de Petri con silica gel (30 g por caja) previamente secadas en un horno a 200 °C por 24 h.

5.2.2 Vitricación con PVS2

Se probaron diferentes tiempos de exposición de solución vitrificadora (30, 60 y 90 min). Las muestras se sumergieron en la solución vitrificante PVS2 posterior al tratamiento de carga y la encapsulación en crioláminas de aluminio. Dicha solución contiene glicerol 30 %, etilenglicol 15 %, DMSO 15 % y 0.4 M de sacarosa, disueltos en sales MS y esterilizada por filtración.

En ambos tratamientos los embriones se colocaron en crioviales, después se realizó una inmersión rápida de los crioviales en nitrógeno líquido (NL) durante 30 min con el fin de someterlos a la máxima temperatura alcanzable (-196 °C); una vez congelados, las crioláminas se llevaron a tubos que contenían sacarosa al 1.0 M durante 15 min para su calentamiento. Para la recuperación, los tejidos se secaron superficialmente colocándolos sobre papel filtro en una caja Petri y se cultivaron en medio MS en oscuridad por 3 d, finalmente los embriones se transfirieron a medio LOG para su conversión a las condiciones de fotoperiodo establecidas (Figura 4). Cada criolámina tiene 10 pozos cada pozo donde se colocó un embrión se consideró como repetición, el total de crioláminas fueron 3 por tratamiento (30 embriones por tratamiento).

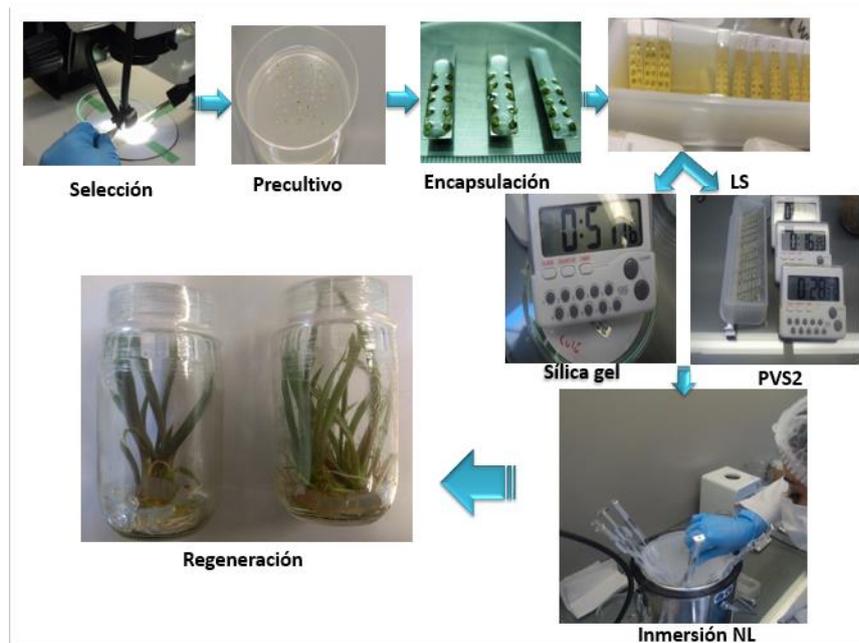


Figura 3. Procedimiento para la deshidratación por silica gel y la vitrificación de embriones somáticos.

5.3 Análisis de integridad genética por marcadores AFLP's de embriones somáticos crioconservados.

5.3.1 Preparación de material vegetal

Las muestras se seleccionaron de acuerdo al tamaño de la planta *in vitro* con el fin de tener mayor masa foliar. Se tomaron de 2 a 3 hojas jóvenes (5-7 cm aproximadamente) por muestra en cada etapa, donde se incluyeron 40, 20 y 15 muestras de plantas madre, embriones somáticos y embriones post-crioconservados, respectivamente.

5.3.2 Extracción del ácido desoxirribonucleico (ADN)

La extracción del ADN se realizó en fresco de acuerdo con el protocolo Shagai-Marooof *et al.* (1984) con algunas modificaciones para agave. El material biológico se congeló durante 24 h a -80°C , posteriormente se realizó su molienda con nitrógeno líquido en un mortero. Una vez procesado el material, se colocaron aproximadamente 50 mg de

tejido en un tubo de 2 mL. A cada muestra se le agregó 1000 µL de solución amortiguadora (anexo 7) previamente calentada a 65 °C y se homogenizó la mezcla. Posteriormente se incubaron en un horno de secado a 65 °C por 30 min. Al término, las muestras se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se agregó 700 µL de cloroformo: octanol (24:1) mezclando suavemente por inversión durante 10 min y se centrifugó a 14,000 rpm por 15 min. El sobrenadante se decantó a un nuevo tubo que contenía 700 µL de cloroformo: octanol (24:1), nuevamente se mezcló suavemente por inversión durante 10 min seguido de centrifugación a 14,000 rpm durante 15 min. El sobrenadante de la interfase se transfirió a un tubo de 2 mL que contenía 10 µL de RNAsa (10 mg·L⁻¹), y se mezcló invirtiendo con suavidad los tubos y se incubó por 30 min a 37 °C. Posteriormente se agregaron 800 µL de isopropanol frío mezclando suavemente hasta formar una pastilla, en seguida se realizaron lavados con 1000 µL de etanol al 75 % y 90 % mezclando y centrifugando entre cada lavado como en los pasos anteriores. Finalmente se disolvió la pastilla formada del ADN en 100 µL de TE 1X (10 mM Tris-HCl pH8, 1 mM EDTA) (anexo 8) y se almacenó a 4 °C hasta su cuantificación.

5.3.2.1 Calidad y cuantificación del ADN

El ADN extraído fue cuantificado por espectrofotometría en el NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) y la integridad se evaluó de manera visual mediante un electroforesis de cada muestra en un gel de calidad al 1% de agarosa con 3 µL de colorante Gel-red. La carga del gel con las muestras se llevó a cabo con 5 µL de ADN y 3 µL de azul de bromofenol (SGB) mezclados, como referencia se tomó ADN lambda sin cortar a una concentración de 10 ng/µL. Para efecto de la electroforesis, se realizó en una cámara Mini gel II (Select Bioproducts®) donde el gel corrió a 60 V por 60 min.

5.3.2.2 Digestión y amplificación de las muestras de ADN por marcadores AFLP's

La digestión del ADN genómico y la ligación de adaptadores se realizó en un solo paso. Cada reacción se realizó en un volumen final de 11 µl que contenían 100 ng de DNA, 1X T4 DNA buffer ligasa, 5 U *Eco* RI, 1 U *Mse* I, 10 U de T4 ligasa DNA, 5 pmol del adaptador *Eco* RI y 50 pmol del adaptador *Mse* I. LA mezcla se incubó a 37°C durante

2 h y después se diluyó con 22 µl de buffer TE (1 mM Tris, 0.1 mM EDTA, pH 8.0) (anexo 9). La reacción de preamplificación se realizó empleando 3 µl del producto diluido de restricción-ligación, en un volumen total de 25 µl. La mezcla contenía 1X REDTaq® ReadyMix™, 0.2 µM Eco + A y 0.2 µ Mse + C. La reacción de preamplificación se realizó bajo las siguientes condiciones: un paso de desnaturalización inicial a 95°C durante 5 min, seguido de 25 ciclos de 20 s a 94°C, 30 S a 60°C y 2 min a 72°C. La reacción fue diluida 1:10 con buffer TE (anexo 10).

Las reacciones de amplificación selectiva se realizaron empleando 2.5 µl del producto diluido de la preamplificación, 1X REDTaq® ReadyMix™, 0.5 µM Eco + Ann y 0.5 µ Mse + Cnn (ACA+CAG, AGG + CAAC, AGG + CAAG, AGG + CAGC, ACA + CACT) en un volumen final de 12.5 µl. La reacción de amplificación se realizó bajo las siguientes condiciones: un paso de desnaturalización inicial a 95°C durante 5 min, seguido de 30 ciclos de 20 s a 94°C, 60 S a 66°C y 2 min a 72°C (anexo 11). Los productos de la amplificación selectiva fueron resueltos en geles de poliacrilamida al 6% y buffer TBE, con un voltaje constante de 200 v durante 120 min. Las bandas se visualizaron mediante tinción con plata. Los perfiles electroforéticos obtenidos de cada gel se analizaron visualmente y se elaboró una matriz de presencia (1) / ausencia (0). La matriz binomial de presencia/ausencia se analizó por medio del software NTSYSpc 2.0 (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System), mediante el algoritmo de distancias genéticas y se realizó el análisis de agrupamiento para generar un dendrograma. El agrupamiento de distancias genéticas se midió por el coeficiente de Nei (1973) y se construyó con el algoritmo UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Embriogénesis somática indirecta

La metodología empleada para inducir callo embriogénico con algunas modificaciones del protocolo reportado por Portillo *et al.* (2007), permitió con éxito la obtención de embriones somáticos, mismos que se utilizaron para los experimentos de crioconservación, y una vez germinados, para el análisis de integridad genética.

6.1.1 Experimentos para eficientar la producción de embriones somáticos en *A. tequilana* Weber cv. azul (genotipo ES4)

6.1.1.1 Embriogénesis somática en ES4 (*A. tequilana*) con adición de aminoácidos

El protocolo anteriormente mencionado se realizó con la adición de ciertos aminoácidos, los cuales no están reportados para tal metodología, los experimentos se generaron con el fin de proporcionar una fuente de nitrógeno orgánico adicional al medio de cultivo y observar si existe un cambio en la generación de embriones somáticos. Los resultados observados demuestran que los aminoácidos sometidos a experimentación (adenina y triptófano) no intervinieron de forma directa con el tejido en regeneración, debido a que no hubo un cambio observable en las muestras tratadas, esto muy probablemente se debió a que los aminoácidos trabajan como aditivos secundarios y en sinergia con otros aminoácidos, dependiendo fuertemente de la concentración de los mismos (Pintos *et al.*, 2010), inclusive se han reportado algunos casos donde el efecto causado es la inhibición de la generación de embriones (Eapen y George, 1990; Chowdhry *et al.*, 1993), en el caso del presente experimento se observó una inhibición parcial en la producción de embriones somáticos, dependiendo directamente de la concentración de los aminoácidos; mayor concentración de los compuestos, menor cantidad de embriones producidos (datos no mostrados). Sin embargo se ha reportado que aminoácidos como arginina, asparagina y serina están asociados a diversas vías biosintéticas participando en el proceso embriogénico, presentándose en abundancia en embriones germinados (Minocha *et al.*, 2004; Canovas *et al.*, 2007; Ali *et al.*, 2015). En *Silybum marianum* L. el aminoácido que presenta mayor actividad en embriones maduros es el triptófano comparado con otras fases de

desarrollo de la embriogénesis somática (Ali *et al.*, 2015). La adición de L-prolina o L-triptófano resulta en una mejora significativa en la regeneración del tejido de *Paspalum scrobiculatum* L. a partir de embriogénesis somática (Vikran y Rashid, 2002), por lo que es necesario realizar más estudios acerca de las vías metabólicas de los aminoácidos implicadas en *Agave* Spp. y la forma en que afectan en el desarrollo según la concentración del compuesto y las interacciones de las diferentes combinaciones de aminoácidos.

En los análisis estadísticos del experimento en cuestión se presentó diferencia significativa para otros factores (anexo 1), como es el caso del tipo de explante utilizado (hoja o raíz) ($P < 0.000$) donde según el análisis, el explante proveniente de raíz puede ser considerado como un tejido con gran potencial para la producción de embriones (figura 4) somáticos en *Agave tequilana* (cuadro 9). Es importante enfatizar el factor de la oxidación del tejido, pues en tratamientos donde el explante vino a partir de raíz, este fenómeno se observó con menos frecuencia, comparado con explantes de hoja. La hiperhidricidad es otra característica que sólo se observó en explante de hoja. Este evento es un desorden fisiológico que se da en cultivo *in vitro* producto de diferentes condiciones de estrés ocasionadas por elevados niveles de humedad, potencial hídrico, concentraciones de reguladores de crecimiento, intensidad lumínica y acumulación de gases en la atmósfera de cultivo, provocando la apariencia vidriosa, quebradiza y con deformaciones en tejido epidérmico (Abdelnour *et al.*, 2011). Sin embargo, existen evidencias que el estrés oxidativo es uno de los principales factores responsables de la hiperhidricidad *in vitro* (Saher *et al.*, 2004).

Cuadro 9. Número de embriones somáticos por tipo de explante.

Tipo de explante	Número de embriones	Grupos
ANOVA	0.000**	
Hoja	3.8	b
Raíz	38.8	a

**Altamente significativo $P < 0.01$

†En las columnas, datos que presentan diferente letra son estadísticamente distintas $P < 0.05$ prueba diferencia mínima significativa (LSD).

113 d

n= 5

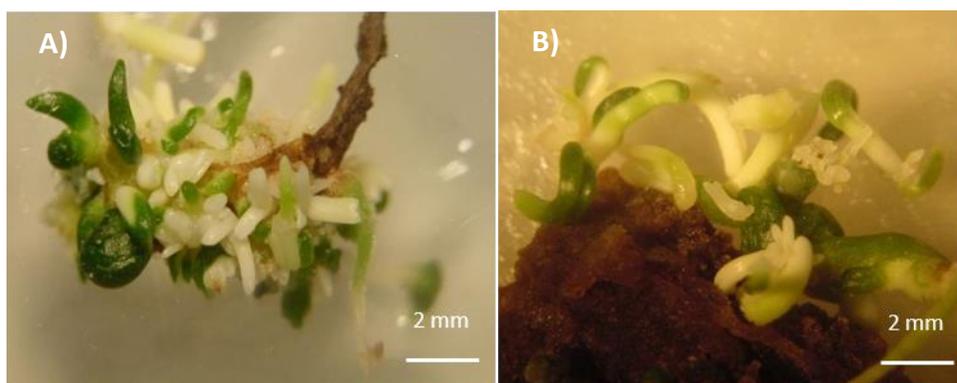


Figura 4. Producción de embriones somáticos de diferentes explantes. A) Embriones a partir de callo de raíz. B) Embriones a partir de callo de hoja.

6.1.1.2 Comparación de las concentraciones de 2,4-D y picloram para la inducción de callo en ES4

La comparación del tipo de auxina (picloram y 2,4-D), y sus respectivas concentraciones fueron analizadas por un diseño completamente al azar ya que se obtuvieron diferencias significativas entre estos factores, mismos factores demuestran que el efecto inductor actúa según la concentración del compuesto, como se observa claramente para las diferentes concentraciones de 2,4-D (cuadro 10). Las concentraciones más altas utilizadas de picloram ($8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) y 2,4-D ($4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) dieron como resultado la mayor cantidad de embriones somáticos generados de entre todos los demás tratamientos con esta misma auxina (cuadro 10), en recientes trabajos se ha observado el uso de picloram como potenciador de embriogénesis somática sobreponiéndose al efecto inductor de la auxina más utilizada (2,4-D) (Viñas y Jiménez, 2011; Takamori *et al.*, 2015), sin embargo existe similitud estadística con las muestras tratadas con $4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de 2,4-D. Con los resultados obtenidos y comparados con el protocolo inicial de embriogénesis somática para *Agave*, el picloram representa una alternativa en la inducción de tal fenómeno morfogénico (figura 5).

En cuanto al tipo de explante, cabe reconocer que la raíz responde estadísticamente igual para ambos tratamientos de mayor concentración, y que la función de BA ($0.3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) no se destacó en los tratamientos.

Cuadro 10. Número de embriones somáticos por tipo de auxina y concentración

Tratamiento	Número de embriones	Grupos
ANOVA	0.0046**	
2.0 mg·L ⁻¹ picloram	0	b
4.0 mg·L ⁻¹ picloram	0	b
1.0 mg·L ⁻¹ picloram	0	b
1.0 mg·L ⁻¹ 2,4-D	3.8	b
2.0 mg·L ⁻¹ 2,4-D	6.6	b
8.0 mg·L ⁻¹ 2,4-D	7.6	b
4.0 mg·L ⁻¹ 2,4-D	28.0	a
8.0 mg·L ⁻¹ picloram	29.6	a

**Altamente significativo $P < 0.01$

†En las columnas, datos que presentan diferente letra son estadísticamente distintos $P < 0.05$ prueba Diferencia mínima significativa (LSD).

90 d
n=5

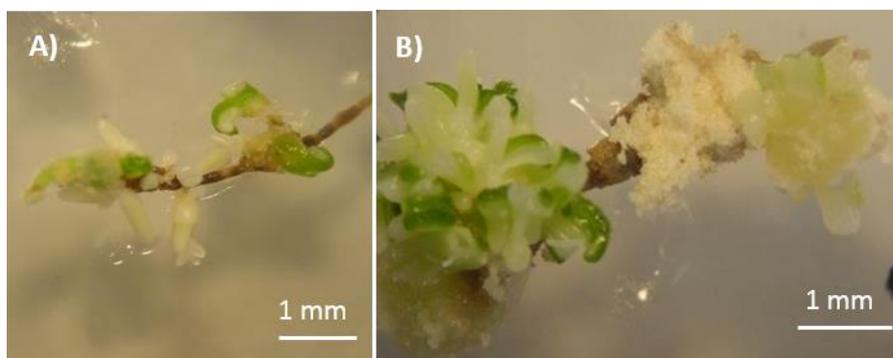


Figura 5. Embriones somáticos generados a partir de raíz. A) Callo embriogénico generado por 2,4-D. B) Callo embriogénico generado por picloram.

6.1.1.3 Inducción de embriogénesis somática con diferentes concentraciones de picloram en ES4

La acción del picloram en dos tipos de explantes (hoja o raíz), no muestra diferencia significativa (anexo 2), sin embargo se destacan los efectos que mostraron las concentraciones de la auxina ($P < 0.0072$) y la citocinina ($P < 0.0014$) ya que la respuesta del número de embriones aumenta con respecto a la concentración, sin tener alguna interacción entre ellos. Para el picloram las concentraciones 8 y 10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ son más factibles que a concentraciones menores como 6 y 4 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (cuadro 11), por otro lado las cantidades utilizadas para BA dieron respuesta similar ya que las concentraciones 0.9 y 0.6 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ produjeron mayor número de embriones respecto al control 0.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (cuadro 12). Por lo anterior, se puede recomendar el uso del picloram a altas concentraciones para obtener mayor número de embriones por explante. Haciendo énfasis en la morfología de los embriones producidos con picloram y en relación a lo reportado por Monja *et al.* (2013); es interesante observar una notable variación en cuanto a la morfología de los mismos (figura 6), ya que las características observadas propias de un embrión somático (etapas embrionarias de monocotiledóneas), no se encuentra alguna similitud en *Agave fourcroydes*.

Cuadro 11. Número de embriones somáticos por concentración de picloram en ES4

Tratamiento	Número de embriones	Grupos
ANOVA	0.0014**	
4 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	0.3	c
6 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	6.6	cb
8 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	14.7	ba
10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	20.8	a

**Altamente significativo $P < 0.01$

†En las columnas, datos que presentan diferente letra son estadísticamente distintas $P < 0.05$ prueba Diferencia mínima significativa (LSD).

90 d
n=10

Cuadro 12. Número de embriones somáticos por concentración de BA en ES4

Tratamiento	Número de embriones	Grupos
ANOVA	0.0072**	
0 mg·L ⁻¹	1.8	c
0.3 mg·L ⁻¹	6.2	cb
0.6 mg·L ⁻¹	16.3	ba
0.9 mg·L ⁻¹	18.1	a

**Altamente significativo $P < 0.01$

†En las columnas, datos que presentan diferente letra son estadísticamente distintas $P < 0.05$ prueba Diferencia mínima significativa (LSD).

90 d

n=10

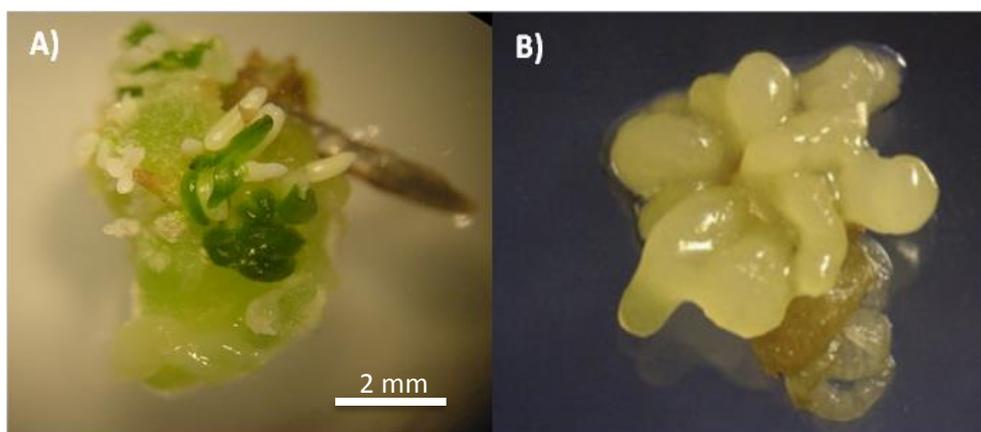


Figura 6. Comparación de la morfología de embriones somáticos en *Agave* spp. A) Diferentes etapas de embriones somáticos generados a partir de raíz de *A. tequilana*. B) Embriogénesis somática directa a partir de cortes transversales del tallo de *Agave fourcroydes* (este último tomado de Monja *et al.* 2013).

6.1.1.4 Inducción de embriogénesis somática con diferentes concentraciones de 2,4-D en ES4

Mediante el análisis de varianza (anexo 3), se determinó que no hay diferencia significativa para los factores 2,4-D y BA, existiendo un factor que determina fuertemente los mecanismos de la embriogénesis somática como el genotipo (Portillo *et al.* 2006; Amaury-Martín *et al.*, 2011). En el caso de las concentraciones por 2,4-D (cuadro 13), los promedios muestran una tendencia a la producción de embriones con

respecto a las concentraciones intermedias, en cambio con BA (cuadro 14) se observa tendencia con la más alta concentración, en este caso el papel que desarrollo la citocinina no se considera crucial en el caso del explante de hoja, aunque se obtiene mayor numero cuando es agregada al medio.

Por otro lado, el factor explante en este experimento fue importante, ya que el efecto que tienen los diferentes tejidos inducidos corresponde a elegir el tejido foliar (hoja) en comparación a la raíz, al indicar los resultados (cuadro 15) que existe una diferencia significativa entre los mismos ($P < 0.0015$).

Cuadro 13. Número de embriones somáticos promedio por concentración de 2,4-D en ES4 en explantes de hoja y raíz

<i>Concentración 2,4-D</i>	<i>Promedio de embriones en hoja</i>	<i>Promedio de embriones en raíz</i>
2	1.9±7.5	4.1± 13.2
4	48.8±84.5	7.5± 18.0
6	54.7 ±102.5	4.8± 9.5
8	22.8±54.9	6.6± 20.5
<i>total</i>	31.8±73.5	5.7± 15.7

±Desviación estándar
90 d
n=10

Cuadro 14. Número de embriones somáticos promedio por concentración de BA en ES4 en explantes de hoja y raíz

<i>Concentración BA</i>	<i>Promedio de embriones en hoja</i>	<i>Promedio de embriones en raíz</i>
0	11.3±29.1	0±0
0.3	18.2±59.5	7.3±14.7
0.6	60.1±95.7	10.8±25.4
0.9	37.1±85.5	5.0±9.8
<i>total</i>	31.8±73.5	5.7±15.7

±Desviación estándar
90 d
n=10

Cuadro 15. Diferencias mínimas significativas de raíz y hoja

Tipo de explante	Número de embriones	Grupos
ANOVA	0.0015 **	
Raíz	5.7	b
Hoja	31.8	a

**Altamente significativo $P < 0.01$

†En las columnas, datos que presentan diferente letra son estadísticamente distintas $P < 0.05$ prueba diferencia mínima significativa (LSD).

90 d

n=10

6.1.2 Embriogénesis somática en diversos genotipos

6.1.2.1 Inducción de embriogénesis somática en *Agave tequilana* Weber cv. azul genotipo A3H1 y ES4 por selección de tejido embriogénico

Los ensayos que se establecieron para la inducción de callos a partir de una fase reciente de embriogénesis somática (callos embriogénicos y embriones germinados), presentaron una respuesta positiva para la producción de mayor número de embriones. De los tejidos inducidos, los embriones somáticos germinados fueron los que por número de embriones superaron a los callos. La estrategia utilizada particularmente en el genotipo A3H1, fue interesante, ya que de sólo tres embriones se derivaron 39 en 90 d (figura 7). Por lo tanto se logró generar embriogénesis somática indirecta en nuevos genotipos (figura 8).

Por otro lado la respuesta del genotipo ES4 donde se contaba con material suficiente, fue sobresaliente, ya que a los 90 d la cantidad generada de embriones fue incontable (figura 9). Se requiere de más estudio y ensayos para identificar qué factores determinan la diferenciación celular y las variantes de este proceso morfogénico.

Cabe reconocer que en cultivos de agave, es observable que la capacidad embriogénica disminuye a través del tiempo en una línea celular seleccionada.

Respecto a los factores que pueden intervenir en la transición del tejido implica; el tiempo, mecanismos de expresión diferencial del genoma, actividad enzimática y variables cualitativas y temporales de cada especie (Mullins *et al.*, 1979).

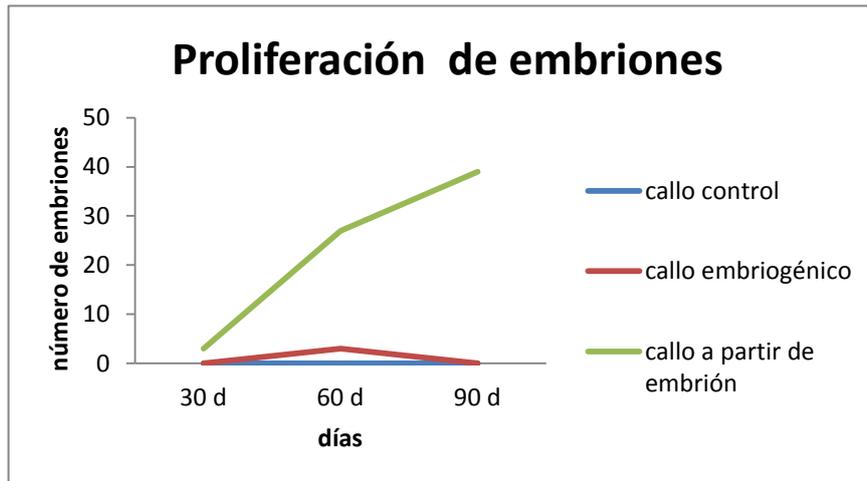


Figura 7. Proliferación de embriones somáticos a partir de diferentes etapas del cultivo en el genotipo de A3H1, tres repeticiones por tratamiento.

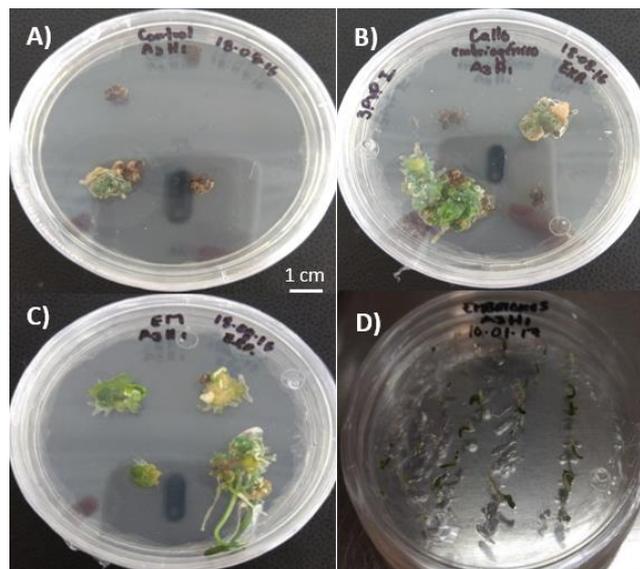


Figura 8. Capacidad embriogénica en genotipo A3H1. A) Callo no embriogénico como control. B) Callo embriogénico seleccionado. C) Callo a partir de embriones germinados. D) Conversión de embriones somáticos (60 d).

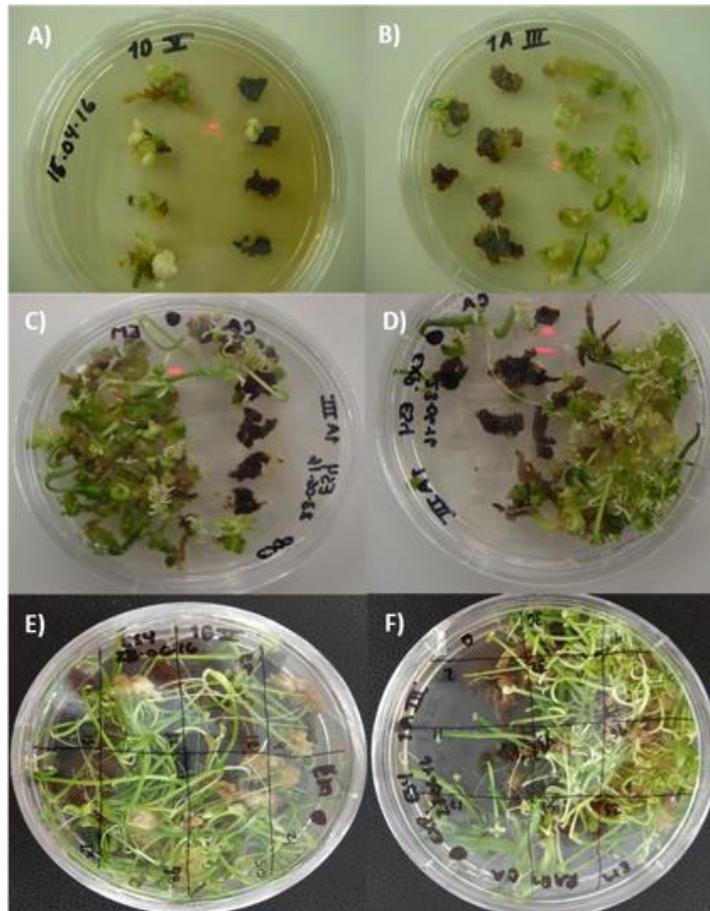


Figura 9. Inducción de embriogénesis somática por 2,4-D en genotipo ES4 a partir de callo friable y embriones germinados. A) y B) Producción de callo a los 30 d. C) y D) Desarrollo de embriones a los 60 d. E) y F) Desarrollo de embriones a los 90 d.

6.1.2.2 Inducción de ESI en raíz con 2,4-D y BA en genotipos G0 (*Agave maximiliana*, A3H1 (hijuelo de *A. tequilana*) y ES4 (*A. tequilana* línea embriogénica))

Los análisis estadísticos demostraron una diferencia significativa para los factores de genotipo y concentración de 2,4-D (anexo 4), además se muestra una interacción respecto a estos dos factores; por lo tanto, se prosiguió a realizar un análisis completamente al azar para detectar el tratamiento con mayor eficiencia (cuadro 16), del cual se identificó que la menor concentración utilizada de 2,4-D ($2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) con el genotipo ES4 fue la más productiva seguido de la concentración $3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Se puede distinguir el comportamiento particular de los genotipos hacia el proceso morfogénico, ha sido reportado en varias especies monocotiledóneas, incluido el agave (Portillo,

1997), lo que se sugiere ajustar los protocolos para cada genotipo en particular. En cuanto a la presencia o ausencia del PVP, no se observó diferencia tanto visual como estadística, por lo cual la recomendación de adicionar este compuesto al medio de cultivo es nula; aunque se propone realizar más experimentos aumentando su concentración para ser notable algún efecto.

Cuadro 16. Número de embriones por concentraciones de 2,4-D en diferentes genotipos de *Agave* spp.

<i>Tratamiento</i>	<i>Genotipo</i>	<i>Concentración de 2,4-D</i>	<i>PVP</i>	<i>Número de embriones</i>	<i>Grupos</i>
ANOVA	0.000 **	0.0000 **	NS		
10	GO	2	+	0	d
9	GO	3	+	0	d
2	A3H1	2	-	0	d
5	A3H1	2	+	0	d
1	GO	2	-	0	d
7	GO	3	-	0	d
8	A3H1	3	-	0	d
4	A3H1	3	+	0	d
12	ES4	3	+	3.8	d
9	ES4	3	-	25.6	c
3	ES4	2	-	61.6	b
6	ES4	2	+	97.2	a

+ Presencia

- Ausencia

**Altamente significativo $P < 0.01$

NS- no significativo

†En las columnas, datos que presentan diferente letra son estadísticamente distintas $P < 0.05$

Prueba diferencia mínima significativa (LSD)

n=10

6.1.2.3 Inducción de embriogénesis somática en *A. tequilana* cv. chato con picloram y 2,4-D

La importancia de obtener embriogénesis en otras especies o cultivares de gran interés donde se ha perdido su importancia biológica, es imprescindible ya que con esto se podría mantener la variabilidad genética en el género *Agave*. La inducción de ESI en el cultivar chato da pie a lo factible de realizar protocolos y estudios para el resto de cultivares silvestres.

Los tratamientos a los que se sometieron los explantes de hoja no demostraron una diferencia significativa (Anexo 5 y 6), sin embargo; ambas auxinas indujeron una respuesta favorable en cuanto a la generación de embriones (figura 10) de manera muy similar a los generados por los genotipos ES4 y A3H1. Aunque los promedios son relativamente bajos en picloram y BA (cuadros 17 y 18) y 2,4-D y BA (cuadros 19 y 20), es importante resaltar la generación de embriones en un nuevo cultivar evaluado. La selección de estos embriones y su posterior inducción nos puede llevar a obtener tejidos con mayor predisposición y tener en su momento líneas embriogénicas como el genotipo ES4.

Las altas concentraciones de auxinas y bajas de citocininas en el medio de cultivo mejoran esta propiedad; Vázquez y Torres (2001) consideran que las combinaciones de reguladores de crecimiento deber ser tratadas con extremo cuidado ya que la presencia de una puede inhibir la acción de la otra.

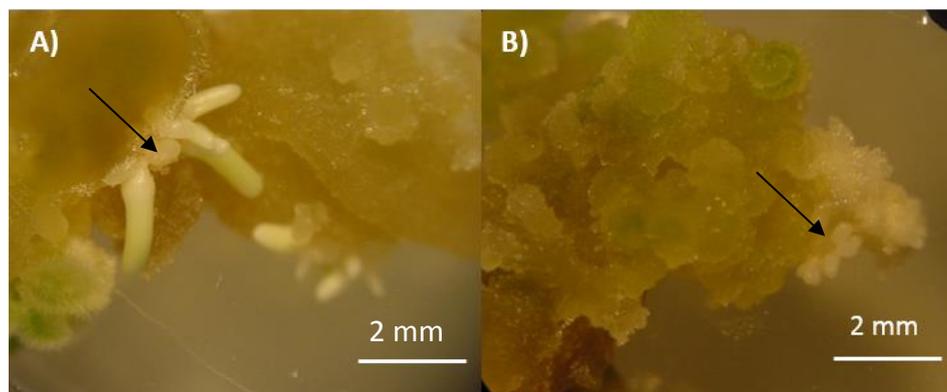


Figura 10. Embriogénesis somática indirecta en cv. chato indicado con flecha negra. A) Embriones generados a partir de hoja por inducción de 2,4-D. B) Embriones somáticos generados a partir de hoja por inducción de picloram (40 d).

Cuadro 17. Número de embriones promedio por concentraciones de picloram en hoja del cv. chato.

<i>Concentración picloram</i>	<i>Promedio de embriones en hoja</i>
6	0 ± 0
8	1.7 ± 2.9
10	3.6±6.3
<i>total</i>	1.7±4.2

±Desviación estándar
90 d
n=5

Cuadro 18. Número de embriones promedio por concentraciones de BA en hoja del cv. chato (proveniente del experimento con picloram).

<i>Concentración BA</i>	<i>Promedio de embriones en hoja</i>
0.3	2.9±5.5
0.6	0.57±1.2
<i>total</i>	1.7±4.2

±Desviación estándar
90 d
n=5

Cuadro 19. Número de embriones promedio por concentraciones de 2,4-D en hoja del cultivar Chato.

<i>Concentración 2,4-D</i>	<i>Promedio de embriones en hoja</i>
2	1.5±1.7
4	7.1±11.5
6	12.2±23.6
<i>total</i>	7.1±15.5

±Desviación estándar
90 d
n=5

Cuadro 20. Número de embriones promedio por concentraciones de BA en hoja del cultivar Chato (proveniente del experimento con 2,4-D).

<i>Concentración BA 2,4-D</i>	<i>Promedio de embriones en hoja</i>
0.3	4.4± 8.4
0.6	10± 20.7
<i>total</i>	7.1± 15.5

±Desviación estándar
90 d
n=5

6.2 Crioconservación de embriones somáticos

Los precultivos que se realizaron con 0.3 M por un día, no generó daño en los materiales ya que después de la exposición los controles no manifestaron un cambio aparente (figura 11).

La encapsulación en criolamina facilitó el manejo ya que el material biológico se fijó a la misma. Se ha observado que la combinación del alginato de calcio y la solución crioprotectante (LS) proporciona una tolerancia de deshidratación lenta ya que los explantes no se encuentran en contacto directo con la solución. Hirai y Sakai, 2003 indican que el éxito de la crioconservación por vitrificación depende del acondicionamiento para inducir osmotolerancia a soluciones vitrificantes, con esto, es posible que la encapsulación con alginato pudo haber intervenido de manera negativa para los embriones tratados con PVS2 (Rafique *et al.*, 2015; Salma *et al.*, 2014).

En el caso de *A. tequilana*, la exposición de los embriones a PVS2 durante más de 30 min produjo una reacción drástica disminuyendo los porcentaje de recuperación, demostrando así una sensibilidad de dicho material biológico a soluciones vitrificantes, en contraste; con la técnica por deshidratación por silica gel donde se consiguieron altas tasas de supervivencia (77 %) respecto a los controles. La técnica por deshidratación es más factible de acuerdo a Niino y Valle. (2015), debido a que los explantes de mayor tamaño son menos sensibles al daño físico y la toxicidad de los crioprotectantes (figura 12). Para el caso de embriones somáticos de caña de azúcar (Martínez-Montero *et al.*, 2008), estos respondieron favorablemente a la técnica por vitrificación por gota, sin

embargo las concentraciones de la soluciones y precultivo eran más intensivos y la etapa de los embriones era temprana (San José *et al.*, 2015).

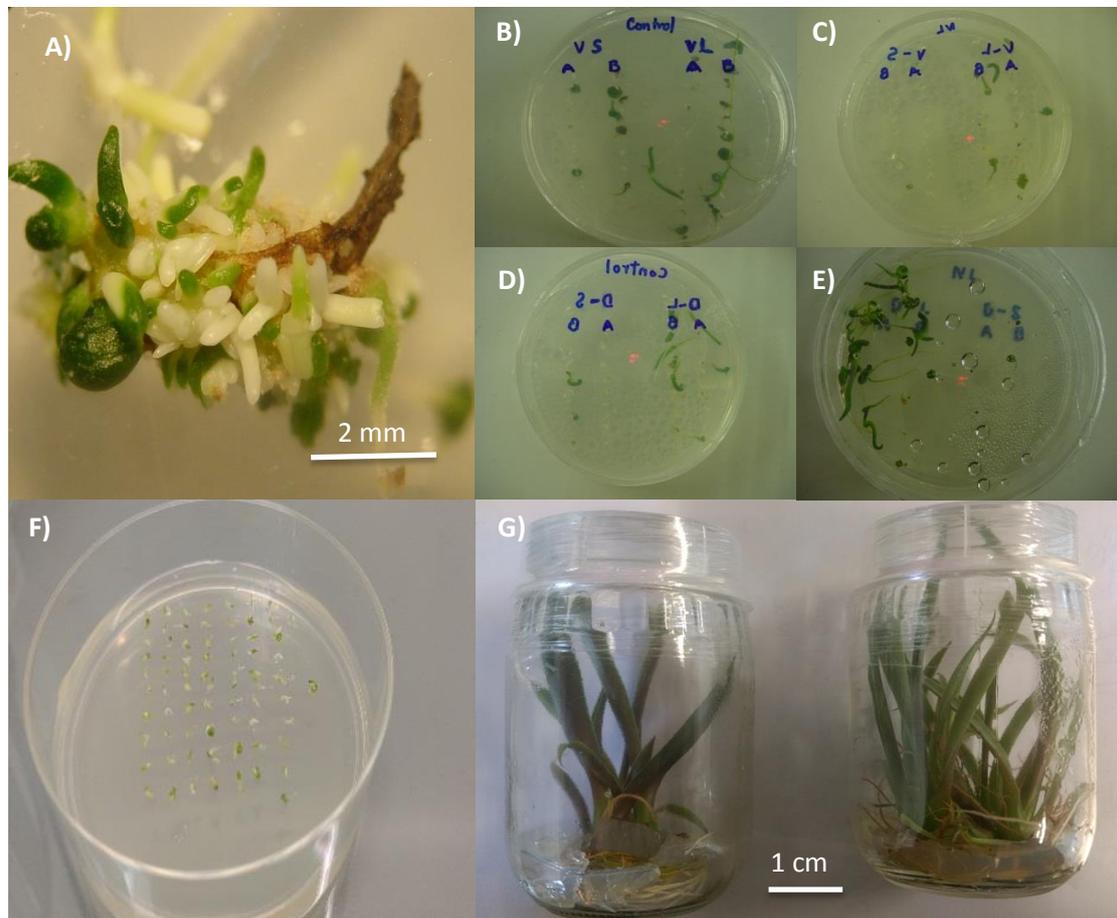


Figura 11. Material en estudio para crioconservación. A) Etapas de embriones somáticos en el explante. B), C), D), y E) Respuesta de los embriones a nitrógeno líquido con sus controles. F) Selección de embriones por tamaño y etapa (torpedo). G) Embriones germinados post-crioconservados (120 d).

Los ensayos realizados con ambas técnicas (silica gel y vitrificación) demuestra la importancia de adoptar una técnica con el fin de evitar mayores daños en el material, así como distinguir las técnicas más apropiadas y eficaces para cada especie. La importancia de la combinar diferentes parámetros a evaluar aumenta su eficiencia de manera notable (Salma *et al.*, 2014).

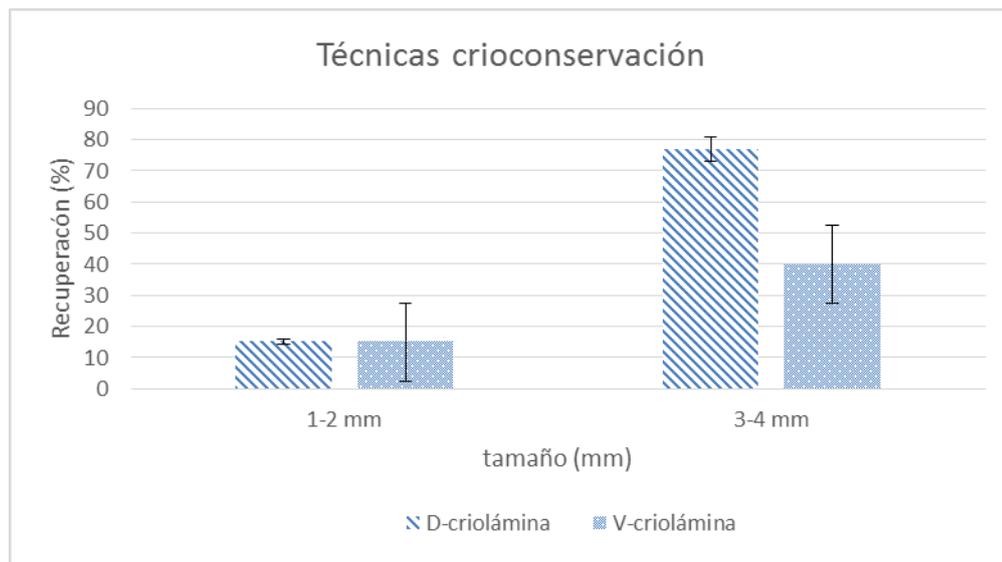


Figura 12. Porcentaje de recuperación de embriones somáticos de *Agave tequilana* por efecto del tamaño y técnica aplicada (n=30 embriones somáticos). Las barras indican desviación estándar.

Además de la técnicas aplicadas, otro factor en consideración fueron los tamaños de los embriones en etapa torpedo (figura 14), ya que se obtuvo un 62 % de mayor supervivencia con los embriones de 3-4 mm de tamaño; este resultado se debe al contenido de agua y el tiempo de desecación parcial sin perder viabilidad, una de las ventajas al trabajar con este material es que la estandarización de la selección de los embriones es posible ya que el protocolo no está limitado a la obtención de los mismos (Dumet *et al.*, 1993)

Las pruebas con meristemas (2-3 mm) de agave (figura 13) (datos no mostrados), nos conlleva a realizar más estudios con este material respecto a la exposición de PVS2, si consideramos solo los resultados obtenidos con embriones somáticos (3-4 mm) por deshidratación; estos tiene un gran potencial para la conservación a largo plazo, ya que respecto a lo derivado con integridad genética se conservarían individuos únicos con atributos especiales asegurando variabilidad genética en futuras colecciones (Engelmann, 2004).

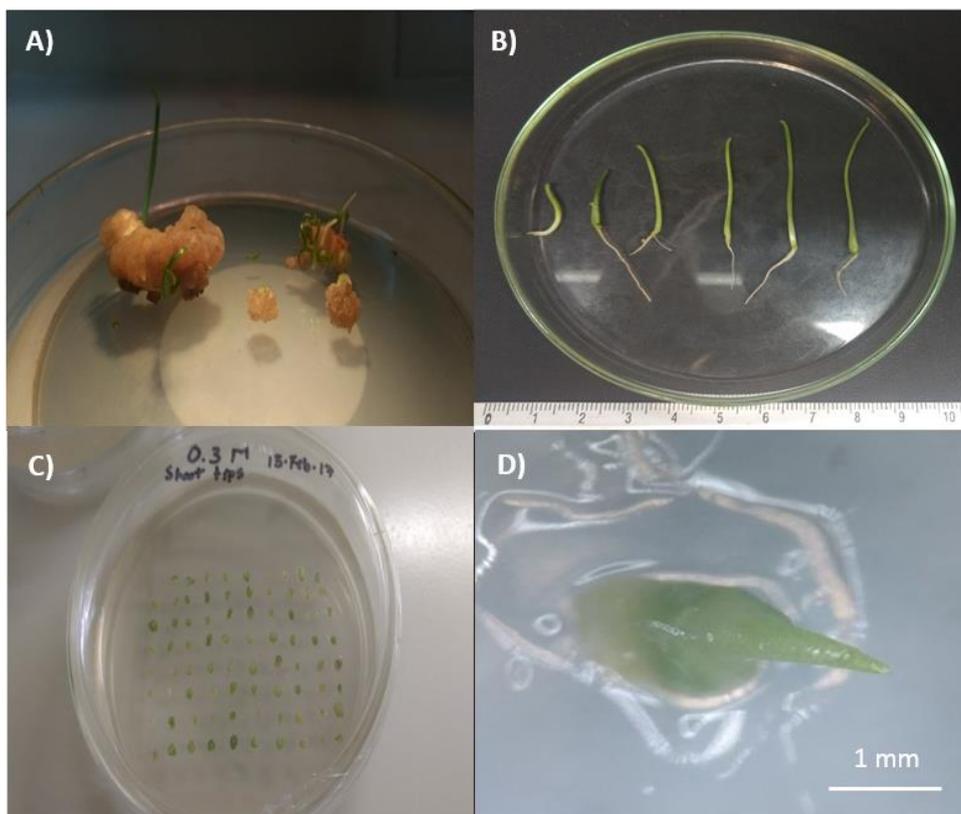


Figura 13. Meristemas como material biológico de *Agave tequilana*. A) Conversión de embriones en callo a partir de hoja. B) Embriones germinados a los 90 d. C) Disección de embriones (3-4) en medio de precultivo 0.3 M. D) Disección de meristemo apical.

Uno de los factores importantes para la crioconservación en el presente trabajo fue haberse seleccionado previamente con base al tamaño y etapa del embrión (figura 14) ya que fue crucial para los resultados obtenidos en agave, mismo factor favoreció alcanzar altas tasas de recuperación después de la congelación en cultivos embriogénicos de aguacate (Guzmán-García *et al.*, 2013). Además, fue conveniente y propicio contar con los protocolos básicos para establecimiento *in-vitro*, protocolos de propagación de la especie, así como medios de cultivos para inducción y conversión (Engelman, 2010).

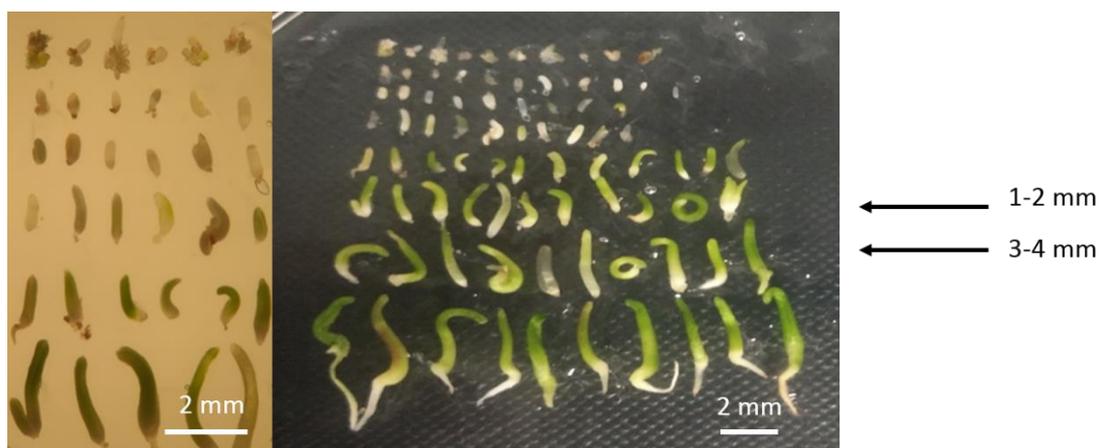


Figura 14. Etapas de desarrollo de embriones somáticos de *A. tequilana*, tamaños de embriones utilizados para criopreservación se indican en una flecha.

6.3 Análisis de integridad genética por marcadores AFLP's

6.3.1 Calidad y cuantificación del ADN

El método de extracción por Saghai-Marroof *et al.* (1984) con modificaciones, resultó efectivo y aplicable para agave, ya que se obtuvo ADN de alta calidad y rendimiento (50 ng/ μ L). La cuantificación se llevó a cabo por la lectura de espectrofotometría UV, empleando la relación de 260/280 OD (densidad óptica). Además, se realizó una valoración electroforética comparado con las concentraciones conocidas de ADN del fago lambda indicando un ADN de calidad e integridad de acuerdo a los patrones de migración de las muestras (figura 15).

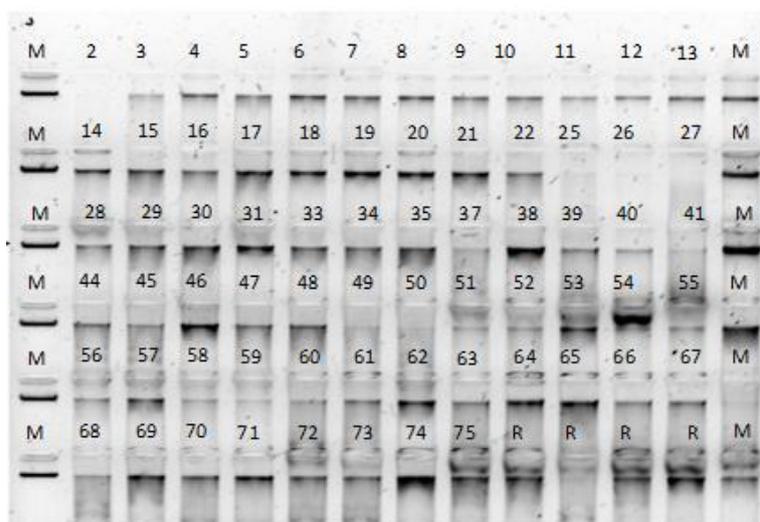


Figura 15. Gel de calidad de agarosa (1%) mostrando las bandas obtenidas de ADN de las muestras (carriles del 2 al 13) del genotipo ES4 (*Agave tequilana* Weber cultivar azul). Letra M es el marcador fago Lambda, letra R es repetición de muestras al azar.

6.3.2 Análisis de los perfiles electroforéticos generados para muestras de ADN por marcadores AFLPs

De las cinco combinaciones empleadas en el presente estudio, la combinación *EcoR* I ACA+ *MseI* GAGA fue la única donde no se detectaron polimorfismos. En comparación, la combinación *EcoR* I AGG+ *MseI* CAAG presentó el polimorfismo más alto de 54 %. Con base a la matriz binaria realizada por presencia/ausencia de las bandas, donde para fines de este estudio solamente se consideraron los fragmentos dentro del rango 500 a 80 pb, se construyeron árboles por cada grupo de muestras: plantas madre (PM; figura 17), embriones somáticos (PIV; figura 18) y embriones crioconservados (PIC; figura 19). Se obtuvieron un total de 69 loci, a través de los tres grupos de muestras: plantas madre (PM), embriones somáticos (PIV) y embriones somáticos post-crioconservados (PIC) de los cuales 25 fueron polimórficos, es decir, un 17.5 %. Con respecto a los porcentajes de loci polimórficos por grupo presentaron 42 % (PM), 38.8 % (PIV) y 47.2 % (PIC) respectivamente.

Portillo, (2007) empleando marcadores ISTR en agave, reportó un nivel de polimorfismo del 60% en embriones somáticos, sugiriendo que la variación somaclonal es frecuente dentro de este género y que el encontrar un alto porcentaje de variación

dentro del mismo genotipo, no se pueden considerar como clones al material regenerado. El porcentaje de polimorfismo reportado dentro del género *Agave* es alto, aunque comparado con otras especies de cultivos comerciales, donde se reportan valores de hasta el 95% de polimorfismo en embriones somáticos es relativamente menor (Medina *et al.*, 2007).

En particular, los individuos que pertenecen a los grupos PIV y PIC, presentan un valor de variación cercano a los de (PM). Esto se puede atribuir a los procesos de regeneración por embriogénesis somática indirecta y condiciones *in vitro* por el cual, los tres tipos de materiales han experimentado. Cabe señalar que las muestras de las PM también fueron obtenidas por embriogénesis somática.

Por lo anterior, considerando solamente los niveles de polimorfismo del grupo PIC el cual presentó mayor valor nos indica que posiblemente hubo cambios epigenéticos en la metilación del ADN que se dieron durante el proceso de crioconservación (Hao *et al.*, 2002; Johnston *et al.*, 2009). A pesar de lo observado, es recomendable realizar un muestreo con mayor número de individuos con el fin de detectar diferencias considerables entre las plantas madre y embriones somáticos post-crioconservados. Los análisis que se han aplicado para corroborar la estabilidad genética de los materiales conservados a largo plazo incluyen el uso de marcadores moleculares tales como AFLP y MSAP (Methylation Sensitive Amplified Polymorphism) (Hao *et al.*, 2002; Maki *et al.*, 2015), morfológicos (Matsumoto *et al.*, 2013) bioquímicos (Dixit-Sharma, 2005) y citológicos (San José *et al.*, 2015). En su mayoría, no se han detectado diferencias significativas en el material genético tratado por crioconservación.

A partir de las matrices binarias se generaron diversos dendrogramas que permitieron demostrar la diferencias genéticas (diferente número de bandas polimórficas) entre los embriones somáticos y la plantas madre de los cuales se regeneraron. La figura 16 representa el dendrograma obtenido con el total de individuos estudiados, cuyo resultado indica que existe una distancia genética mayor de los individuos PIC 70, 73 y 74 y una máxima del 0.54 por los individuos PIC 71 y PIV 44 con respecto a las plantas madre, esto sugiere que las frecuencias alélicas entre los individuos no son iguales.

Por otro lado, cabe señalar que los perfiles generados para la mayoría de los embriones, se agrupan entre sí alejándose de las plantas madre, además se observa una agrupación de similaridad mayor entre los individuos PM con respecto a los demás grupos, lo cual

sugiere la existencia de factores que dan origen a la variación somaclonal a través del proceso de embriogénesis somática.

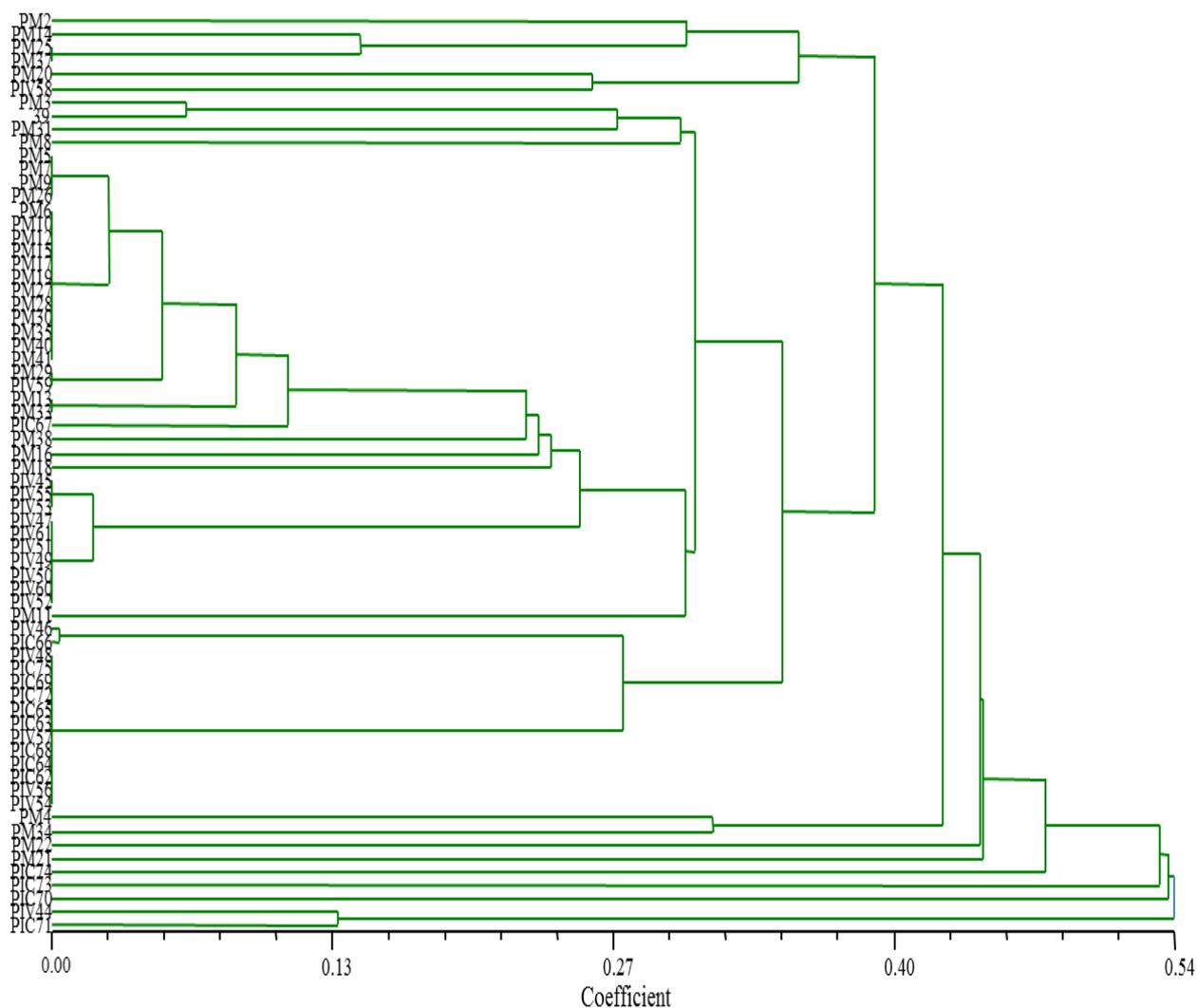


Figura 16. Dendrograma generado a partir de cuatro combinaciones de cebadores para 68 muestras del genotipo ES4. Plantas madre (PM), embriones somáticos (PIV) y embriones somáticos post-crioconservados (PIC), basado en el coeficiente de similitud de Nei (1973) y agrupamiento UPGMA.

Contrastando los árboles generados para cada grupo de muestras; PM (figura 17), PIV (figura 18) y PIC (figura 19) se puede observar que existe una mayor distancia genética en los individuos PIV (0.65) en comparación con las PM (0.45) a pesar de que se analizaron un mayor número de individuos en este último grupo. Sin embargo, se obtuvieron coeficientes muy cercanos entre los grupos de muestras PM (0.45) y PIC (0.46), este hecho nos demuestra que la distancia genética entre los individuos está

dentro de un rango no mayor al generado por PIV del 0.65 para el total de individuos analizados.

Si durante el proceso de embriogénesis somática no se generara ningún tipo de cambio genético, se esperaría que los perfiles de los AFLP's de los embriones obtenidos por embriogénesis somática indirecta fueran idénticos o al menos, el patrón de bandeo muy similar. Si este fuera el caso, los materiales deberían agruparse con las plantas madre o a una distancia genética mínima, lo que nos llevaría a plantear que no existe variación somaclonal.

Considerando que existen hay diferencias significativas entre árboles de una misma población, es importante establecer parámetros que detecten la fidelidad genética de los embriones somáticos o a los menos niveles de uniformidad aptas para el manejo de la especie ya sea en campo o a nivel laboratorio.

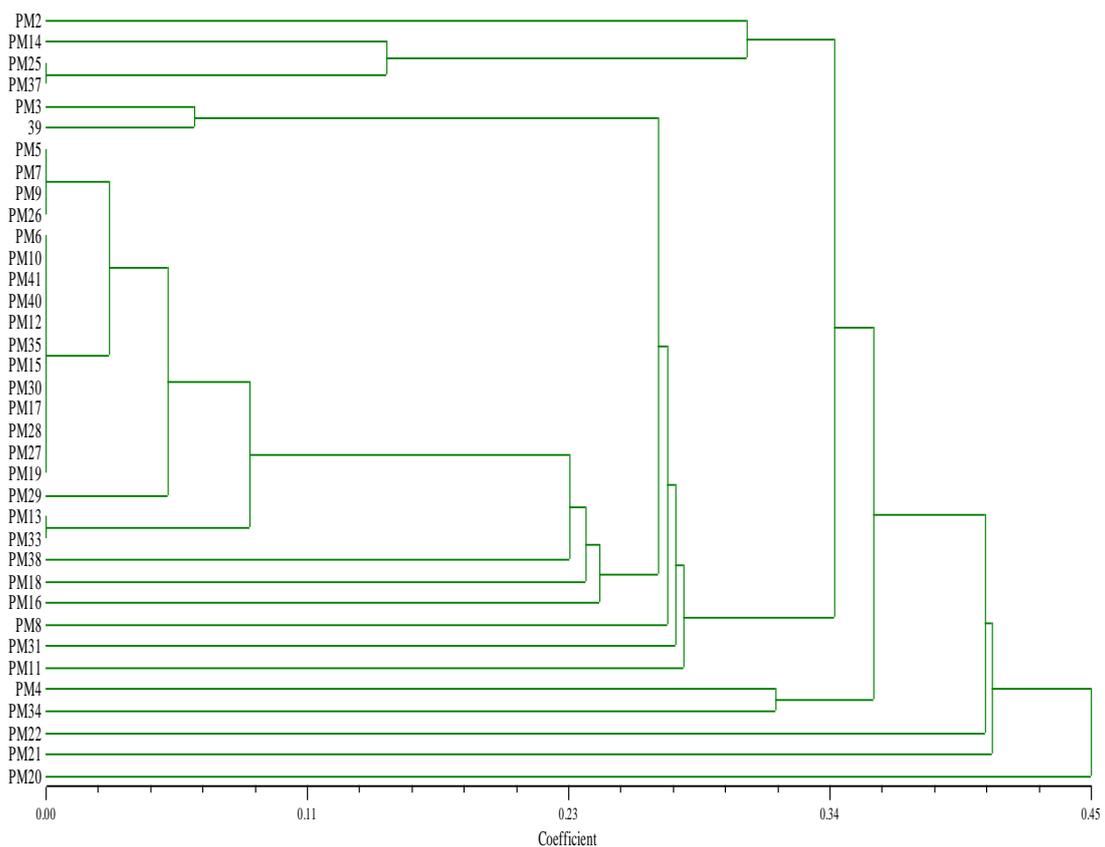


Figura 17. Dendrograma generado para la población de plantas madre (PM), basado en el coeficiente de similitud de Nei (1973) y agrupamiento UPGMA.

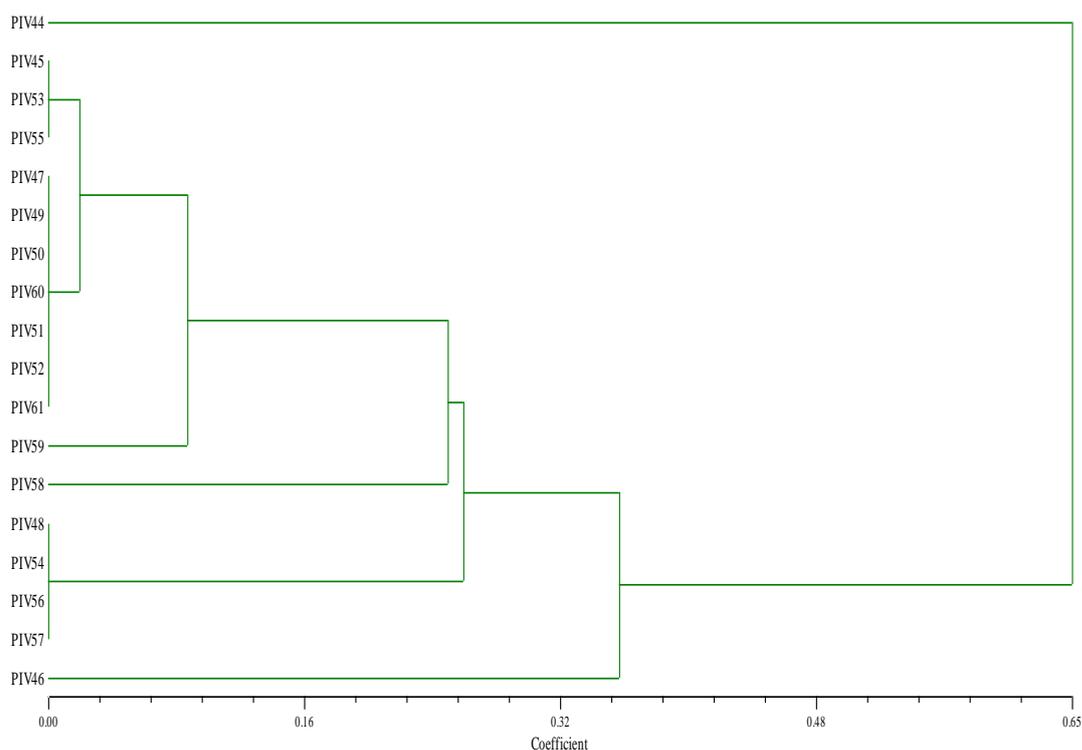


Figura 18. Dendrograma generado para la población de embriones somáticos germinados (PIV), basado en el coeficiente de similaridad de Nei (1973) y agrupamiento UPGMA.

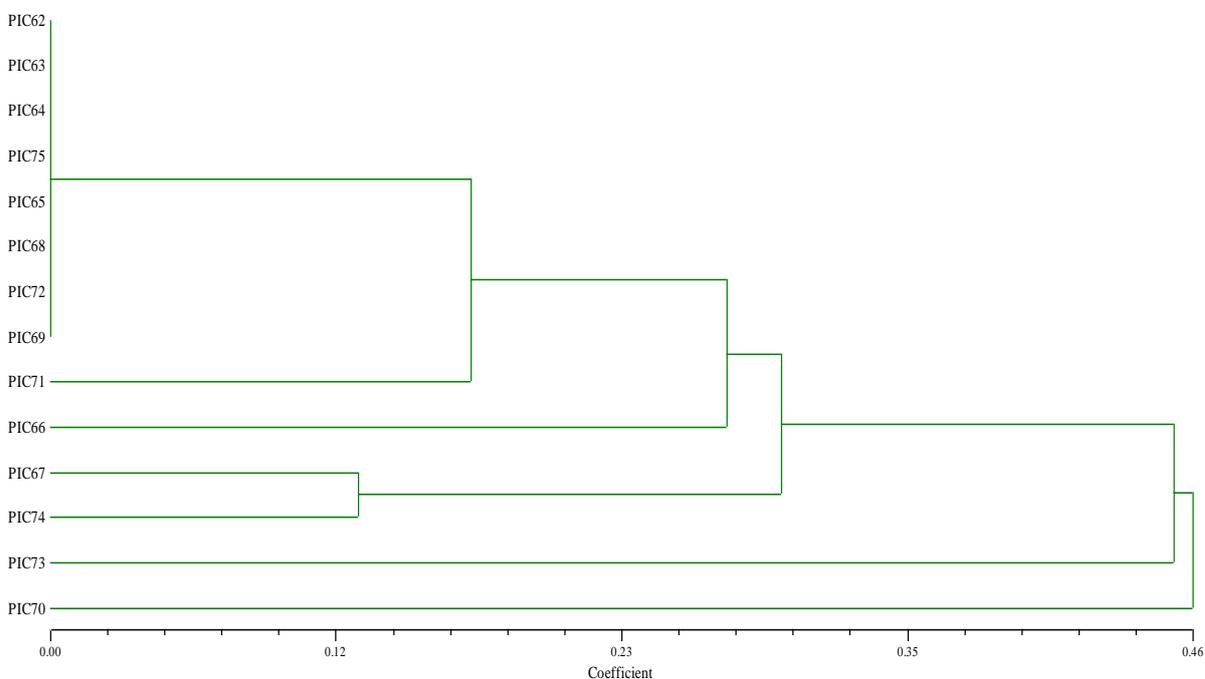


Figura 19. Dendrograma generado para la población de embriones somáticos post-crioconservados (PIC) basado en el coeficiente de similaridad de Nei (1973) y agrupamiento UPGMA.

Los cambios que presentan los cultivos de tejidos a través del tiempo y manejo de los reguladores de crecimiento del mismo, son imprecisos y con frecuencia son atribuidos a la variación somaclonal. Sin embargo, los daños que puede sufrir el ADN por los procesos de inducción con auxinas (por ejemplo 2,4-D), pueden producir variabilidad genética y aunque los mecanismos de dicha variabilidad no se han determinado, parecen estar expresados por una afectación de la división celular que provoca mutaciones cromosomales (Merkle *et al.*, 1995). Los resultados obtenidos en un estudio de la variación somaclonal por reproducción vegetativa de *Agave* establece que la variación puede ser ocasionada por la actividad de los transposones, mismos que generan arreglos en el genoma (Torres-Morán *et al.*, 2005; Infante *et al.*, 2006).

En ese sentido y en el presente trabajo, los materiales también pueden ser sensibles a cambios extremos de temperatura o soluciones tóxicas en el proceso de criopreservación siendo etapas críticas y perjudiciales.

En 2006, Portillo reportó variación somaclonal en embriones regenerados a partir de embriogénesis somática indirecta (ESI) en agave; sin embargo, si se compara los embriones somáticos del presente trabajo aunado a los procesos de criopreservación, nos demuestra que los polimorfismos observados por los marcadores moleculares AFLP's no son mayores a lo reportado por este autor. Si se consideran las distancias genéticas del dendrograma siendo la distancia mayor en PIV que PIC, nos sugiere que la variación no se debe al proceso de criopreservación sino al sistema de regeneración por embriogénesis somática.

Por último, cabe destacar que el análisis por AFLP's permitió evidenciar polimorfismos entre los individuos, pudiendo detectar variaciones genotípicas.

Al ser una técnica robusta, confiable y fácil de ejecutar, fue altamente reproducible ya que se utilizaron pequeñas cantidades de ADN. A pesar de los pocos explantes analizados de los embriones somáticos, se logró evidenciar la falta de la homogeneidad genética dentro del cultivo *in vitro* donde se realizó el muestreo.

7. CONCLUSIONES

- Las concentraciones y tipos de reguladores de crecimiento (2,4-D y picloram), así como los explantes (raíz y hoja) que se emplearon permitieron eficientar la producción de embriones en el genotipo ES4 (*Agave tequilana* cv. azul)
- La inducción de embriogénesis somática en *A. tequilana* cv. chato se logró por la presencia de forma independiente de 2,4-D-BA y picloram-BA en el medio de cultivo.
- Para la crioconservación, la técnica más propicia y con mayor porcentaje de recuperación para los embriones somáticos de agave fue deshidratación con sílica gel. Los tratamientos con la solución vitrificadora PVS2 produjeron más afectaciones en la sobrevivencia de los embriones de *A. tequilana*.
- El efecto del tamaño de embrión fue crucial para obtener mayores porcentajes de supervivencia para la crioconservación. Se recomienda seleccionar tamaños de 3-4 mm.
- Se detectaron polimorfismos por marcadores AFLP en plantas madre (PM), embriones somáticos germinados (PIV) y post-crioconservados (PIC). Los altos porcentajes de loci polimórficos entre los grupos nos permitió evidenciar la existencia de variación somaclonal.
- Se observó diferente número de bandas polimórficas en los tres grupos analizados demostrando que existe mayor distancia genética de PIV y PIC con respecto a PM.
- No se mostraron datos contundentes para determinar si los polimorfismos en los individuos post-crioconservados (PIC) son debido al proceso de crioconservación.

8. LITERATURA CITADA

- Abdelnour, A. 1999. Crioconservación de plantas, estado actual de la investigación en Costa Rica. *Agronomía Costarricense*. 23: 205-214.
- Abdelnour, A. Aguilar, E. Valverde, L. 2011. Micropropagación de pilón (*Hieronyma alchorneoides*). *Agronomía Costarricense*. 35: 9-19.
- Ali, K. M. Abbasi, B. H. Ali, H. Ali, M. Adil, M. y I. Hussain. 2015. Temporal variations in metabolite profiles at different growth phases during somatic embryogenesis of *Silybum marianum* L. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 120: 127-139.
- Amaury-Martín, Arzate-Fernández y R. Mejía-Franco. 2011. Capacidad embriogénica de callos inducidos en ejes embrionarios cigóticos de *Agave angustifolia* Haw. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 34: 101-106.
- Arizaga, S. y E. Ezcurra. 2001. Propagation mechanisms in *Agave macroacantha* (*Agavaceae*), a tropical arid-land succulent rosette. *American Journal of Botany*. 89:632-641.
- Arnold, S., Sabala, I., Bozhkov, P., Dyachok, J. y L. Filonova, L. 2002. Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 69:233-249.
- Ávila-Portillo, L., Madero, J., López, C., León, M., Acosta, L., Gómez, C., Delgado, M., Gómez, C., Lozano, J. y M. Reguero. 2006. Fundamentos de crioconservación. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*. 57:291-300.
- Awad, M. 2011. Cryopreservation of *Capparis spinosa* shoot tips via vitrification, encapsulation dehydration and encapsulation vitrification. *World Applied Sciences Journal* 15: 318-325.
- Ayala, L. M. 2010. Inducción de embriogénesis somática en cultivo in vitro de *Agave atrovirens* Karw. Dyck. Tesis de maestría en biotecnología aplicada. Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada, Instituto Politécnico Nacional. 83 p.

- Ayala-González, C., Gutiérrez-Mora, A. y B. Rodríguez-Garay. 2014. The occurrence of dicotyledonar embryos in *Agave tequilana*. *Biologia Plantarum*. 58:788-791.
- Azofeifa-Delgado, A. 2006. Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. *Agronomía Mesoamericana*. 17: 221-242.
- Balwinder, S., Sanjeev, S., Rani, G., Virk, G. y A. Zaidi. 2007. *In vitro* response of encapsulated and non-encapsulated somatic embryos of Kinnow mandarin (*Citrus nobilis* Lour., *C. deliciosa* Tenora). *Plant Biotechnology Reports*. 1:101–107.
- Bautista, J. A. y M. A. Smit. 2012. Sustentabilidad y agricultura en la “región del mezcal” de Oaxaca. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 3:5-20.
- Beyl, C. y G. Sharma. 1983. Picloram induced somatic embryogenesis in *Gasteria* and *Haworthia*. *Plant Cell Tissue Organ and Culture*. 2:123-132.
- Bhojwani, S. y P. Dantu. 2013. *Plant Tissue Culture: An Introductory Text*. Springer. Primera edición. India. 309 p.
- Bhojwani, S. y M. Razdan. 1986. *Plant Tissue Culture: Theory and Practice*. Elsevier. 511 p.
- Canovas F. M., Ávila C, Canton F. R., Canas R A. y T. F. Dela. 2007. Ammonium assimilation and amino acid metabolism in conifers. *Journal of Experimental Botanical*. 58: 2307- 2318.
- Castillo, D. Villarreal, J. y A. Cano. 2007. El género *Agave* L. bajo cultivo: Taxonomía, distribución y usos. *Ciencia forestal en México*. 101: 52-70.
- Castro-Concha, L., Loyola-Vargas, V. M. Chan, J. L. y M. L. Robert. 1990. Glutamate dehydrogenase activity in normal and vitrified plants of *Agave tequilana* Weber propagated *in vitro*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 22:147-151.
- Castro-Díaz, A. S. y J. A. Guerrero-Beltrán. 2013. El Agave y sus productos. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos* 7:53-61.

- Colunga-GarcíaMarín, P. Eguiarte, L. Larqué, A. y D. Zizumbo-Villarreal. 2007. En lo ancestral hay futuro: del tequila, los mezcales y otros agaves. CICY-CONACYT-CONABIO-INE. Yucatán, México. 395 p.
- Consejo Regulador del Tequila. 2016. Información estadística, enero-marzo 2006-2016. www.crt.org.mx/esp/estadisticas.asp. (Consultado 18 enero 2016).
- Chowdhry, C. N. Tyagi, A.K. Maheshwari, N. y S.C. Maheshwari. 1993. Effect of L-proline and L-tryptophan on somatic embryogenesis and plantlet regeneration of rice (*Oryza sativa* L. cv. Pusa 169). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 32: 357-361.
- Dávila, M., Castillo, M. y H. Laurentin. 2007. Uso de marcadores moleculares ISSR para inferir las relaciones genéticas y la variabilidad intraespecífico en agave. *Revista de la Facultad de Agronomía*. 33:93-111.
- Diario Oficial de la Federación. 9 de diciembre de 1974. Declaración General de Protección a la Denominación de Origen “Tequila”. www.crt.org.mx/esp/dot1.asp (Consultado 25 septiembre 2015).
- Diario Oficial de la Federación. 6 de enero de 2006. Norma Oficial Mexicana NOM-006-SCFI-2005, Bebidas alcohólicas-Tequila-Especificaciones. pp. 6-24.
- Diario Oficial de la Federación. 2010. Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. NOM-059-SEMARNAT.http://www.profepa.gob.mx/innovaportal/file/435/1/NOM_059_SEMARNAT_2010.pdf. (consultado 07 abril 2015).
- Dixit-Sharma, S. Ahuja-Ghosh. Mandel, B. B. y P. S. Srivastava. 2005. Metabolic stability of plants regenerated from cryopreserved shoot tips of *Dioscorea deltoidea* an endangered medicinal plant. *Science Horticulture*. 105: 513-517.
- Domínguez, M., González, M., Gómez, C., Valles, C., Delgadillo, S., Mireles, S. y B. Pérez. 2008. El cultivo *in vitro* como herramienta para el aprovechamiento, mejoramiento y conservación de especies del género *Agave*. *Investigación y Ciencia de La Universidad Autónoma de Aguascalientes*. 41: 53–62.

- Dumet, D. Engelmann, F. Chabrilange, N. y. Duva. 1993. Cryopreservation of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) somatic embryos involving a desiccation step. *Plant Cell Reports*. 12:352-355.
- Eapen, S. y L. George. 1990. Influence of phytohormones, carbohydrates, aminoacids, growth supplements and antibiotics on somatic embryogenesis and plant differentiation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 22: 87-93.
- Engelmann, F. 1997. Importance of desiccation for the cryopreservation of recalcitrant seed and vegetative propagated species. *Plant Genetic Resources Newsletters* 112:9-18.
- Engelmann, F. 2004. Plant cryopreservation: Progress and prospects. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant*. 40: 427-433.
- Engelmann, F. 2010. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant*. 47:5-16.
- Escobar, R., Mafia, G. y W. Roca. 1997. A methodology for recovering cassava plants from shoot tips maintained in liquid nitrogen. *Plant Cell Reports*. 16: 474-478.
- Evans, D., Sharp, W. y C. Flick. 1981. Growth and behavior of cell cultures, embryogenesis and organogenesis. En: *Plant Tissue Culture, methods and applications in agriculture*. Thorpe, T (Ed). Academic Press. New Cork pp. 45-113.
- FAO. 2015. La diversidad genética: una herramienta secreta para luchar contra el cambio climático. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura. <http://www.fao.org/news/story/es/item/275178/icode/> . (Consultado 03 feberero 2017).
- Flores, H., Chávez, A., Ruíz, J., Mora, C. y V. Rodríguez. 2016. Efecto del cambio climático sobre las zonas de riesgo por marchitez en el *Agave tequilana* Weber variedad Azul en Jalisco. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 13:2497-2510.
- Forero, E. 1989. Los jardines botánicos y la conservación de la naturaleza. *Acta Botánica Brasilica*. 3: 315-322.

- Freire, M. 2003. Aspectos básicos de la embriogénesis somática. *Biotecnología Vegetal*. 3:195-209.
- Fujimura, T. y A. Komamine. 1980. Synchronization of somatic embryogenesis in a carrot cell suspension culture. *Plant Science Letters*. 5:359-367.
- García-Herrera, E., Méndez-Gallegos, S. y D. Talavera-Magaña. 2010. El género *Agave* spp. En México: principales usos de importancia socioeconómica y agroecológica. *Salud Pública y Nutrición*. 5:109-129.
- García-Mendoza, A. J. 2007. Los Agaves de México. *Ciencias*. pp 14-23.
- García-Mendoza, A. J. 2011. Flora del valle de Tehuacán-Cuicatlán: *Agavaceae*. CONABIO. México. 88.1- 95 p.
- García-Mendoza, A. y R. Galván. 1995. Riquezas de las familias Agavaceae y Nolinaceae en México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. 56:7-24.
- Gautheret, R. J. 1983. Plant tissue culture: A history. *Botanical magazine*. 96:393-410.
- Gentry, H. S. 1982. *Agaves of continental North America*. The University of Arizona Press, Tucson. 670 p.
- George, E. 1993. *Plant propagation by tissue culture*. 2nd ed., London: Exegetics. 574p.
- Gil-Vega, K., Díaz-Quezada, C. E., Nava-Cedillo, A., García-Mendoza, A. y J. Simpson. 2007. Análisis AFLP del género *Agave* refleja la clasificación taxonómica basada en caracteres morfológicos y otros métodos moleculares. En: *En lo ancestral hay futuro: del tequila, los mezcales y otros agaves*. Centro de Investigación Científica de Yucatán. Yucatán, México. .23-37 pp.
- Gil-Vega, K., Díaz, C., Nava-Cedillo, A. y J. Simpson. 2006. AFLP analysis of *Agave tequilana* varieties. *Plant Science*. 170: 904-909.
- Gil-Vegas, K., González-Chavira, M., Martínez de la Vega, O., Simpson J, y G. Vandermark. 2001. Analysis of genetic diversity in *Agave tequilana* var. Azul using RAPD markers. *Euphytica*. 119:335-341.
- González-Arno, M. T., Panta, A., Roca, W. M., Escobar, R. H. y F. Engelmann. 2008. Development and large scale application of cryopreservation techniques for

- shoot and somatic embryo cultures of tropical crops. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 92:1-13.
- González-Arnao, M. y F. Engelmann. 2013. Crioconservación de plantas en América Latina y el Caribe. San José, C.R.: IICA, XII, 204 p.
- Guzmán-García, E. Brada, F. y C. Sánchez-Romero. 2013. Cryopreservation of avocado embryogenic cultures using the droplet-vitrification method. *Acta Physiology Plant.* 35:183-193.
- Haccius, B. 1977. Question of unicellular origin of nonzygotic embryos in callus cultures. *Phytomorphology.* 28:74-81.
- Hao, Yu-Jin, You, Chun-Xiang, Deng, Xiu-Xin. 2002. Effects of cryopreservation on developmental competency, cytological and molecular stability of citrus callus. *Cryoletters,* 23:27-35.
- Harding, K. 2004. Genetic integrity of cryopreserved plant cells: A review. *CryoLetters.* 25:3-22.
- Hazra, S. H., Das, S., y A. K. Das. 2002. Sisal plant regeneration via organogenesis. *Plant Cell Tissue and Organ Culture.* 70:235-240.
- Hirai, D. y A. Sakai. 1999. Cryopreservation of *in vitro* grown meristems of potato (*Solanum tuberosum* L.) by encapsulation vitrification. *Potato Research.* 42:153-160.
- Hirai, D. y A. Sakai. 2003. Simplified cryopreservation of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) by optimizing conditions for osmoprotection. *Plant Cell Reports.* 21:961-966.
- Hubálek, Z. 2003. Protectants used in the criopreservation of microorganisms. *Cryobiology.* 46: 205-229.
- Infante, D., González, G., Peraza-Echeverría, L. y M. Keb-Llanes. 2003. Asexual genetic variability in *Agave fourcroydes*. *Plant Science.* 164: 223-230.
- Infante, D., Molina, S., Demey, J. R. y E. Gaméz. 2006. Asexual genetic variability in *Agavaceae* determined with inverse sequence-tagged repeats and amplification

- fragment length polymorphism analysis. *Plant Molecular Biology Reporter*. 24:205-217.
- Iñiguez, C. Bernal, J., Ramírez, M. y N. Villalvazo. 2014. Recycling *Agave* bagasse of the tequila industry. *Advances in Chemical Engineering and Science*. 4:135-142.
- Johnston, J.W. Benson, E. y K. Harding. 2009. Cryopreservation induces temporal DNA methylation epigenetic changes and differential transcriptional activity in *Ribes* germplasm. *Plant Physiology and Biochemistry* 47:23-131.
- Karp, A., Edwards, K. 1998. DNA markers: a global overview. In: G. Caetano- Anollés, P.M. eds. *DNA markers: protocols, applications and overviews*. Gresshoff. New York. p. 1-13.
- Karp, A., Kresovich, S., Bhat, K., Ayad, W. y T. Hodgkin. 1997. *Molecular tools in plant genetic resources conservation: a guide to the technologies*. IPGRI. Rome, Italy. 47 p.
- Keb-Lllanes, M., González, G., Chi-Manzanero, B. y D. Infante. 2012. A Rapid and Simple Method for Small-Scale DNA Extraction in *Agavaceae* and Other Tropical Plant. *Plant Molecular Biology Reporter* 20:299a-299e.
- Lascuráin, M., List, R., Barraza, L., Díaz, E., Gual, S., Maunder, M., Dorantes, J. y V. Luna. 2009. Conservación de especies *ex situ*, en *Capital natural de México: Estado de conservación y tendencias de cambio*. CONABIO, México, pp. 517-544.
- Levitus, G., Echenique, V., Rubinstein, C., Hopp, E. y L. Mroginski. 2010. *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II*. Argenbio. Argentina. 652 p.
- Macías, M. A. y Z. A. Valenzuela. 2009. El tequila en tiempos de la mundialización. *Comercio exterior*. 59: 459-452.
- Maki, S. Hirai, Y. Niino, T. y T. Matsumoto. 2015. Assessment of molecular genetic stability between long-term cryopreserved and tissue cultured wasabi (*Wasabia japonica*) plants. *Cryo Letters*. 36:318-24.
- Martínez-Gándara, A. 2008. Tequila, mezcal y cerveza: de México para el mundo. *Agricultura, Sociedad y Desarrollo*. 5:143-150.

- Martínez-Montero, M, Martínez J y F. Engelmann. 2008. Cryopreservation of sugarcane somatic embryos. *Cryo Letters*. 29:229-42.
- Martínez-Montero, M. González-Arno, M, Borroto-Nordelo, C. Puentes-Díaz, C. y F. Engelmann. 1998. Cryopreservation of sugarcane embryogenic callus using a simplified freezing process. *CryoLetters*. 19:171-176.
- Martínez-Palacios, A., Ortega-Larrocea, M. P., Chávez, V. M., y R. Bye. 2003. Somatic embryogenesis and organogenesis of *Agave victoria-reginae*: considerations for its conservation. *Plant Cell Tissue Organ Culture*. 74:135-142.
- Matsumoto, T. Akihiro, T. Maki, S. Mochida, K. Kitagawa, M. Tanaka, D. Yamamoto, S. y T. Niino. 2013. Genetic stability assesment of Wasabi plants regenerated from long-term cryopreserved shoot tips using morphological, biochemical and molecular analysis. *Cryo Lettters*. 34: 299-304.
- Medina, C. García, I. Carol, M. y F.A. Aristizábal. 2007. Análisis AFLP de variación somaclonal en embriones somáticos de *Hevea brasiliensis*. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*. 36: 70-80.
- Merkle, S. Parrott, W. y B. Flinn. 1995. Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. En: Thorpe, TA (Ed) *In vitro Embryogenesis in Plant*. . Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Netherlands pp. 155-203.
- Meryman, H. T. y R. J. Williams. 1985. Basic principles of freezing injury to plant cells: natural tolerance and approaches to cryopreservation. En: *Cryopreservation of plant cells and organs*. Katha, KK. (Ed). CRC Press. Boca Raton, US. pp. 13-14.
- Minocha, R. Minocha S. C. y S. Long. 2004. Polyamines and their biosynthetic enzymes during somatic embryo development in red spruce (*Picea rubens* Sarg.). *In Vitro Cell Developmental Biology Plant*. 40: 572–580.
- Monja-Mio, K. M. y M. L. Robert. 2013. Direct somatic embryogenesis of *Agave fourcroydes* Lem. through thin cell layer culture. *In Vitro Cell Developmental Biology Plant*. 49:541-549.
- Mullins, M. G. Nair, Y. y P. Sampet. 1979. Rejuvenation in vitro: Induction of Juvenile Characters in an Adult Clone of *Vitis vinifera* L. *Annals of Botany*. 44: 623-627.

- Murashige T. y F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plantarum*. 15: 473-479.
- Nava-Cruz, N., Medina-Morales, M., Martínez, J., Rodríguez, R. y C. Aguilar. 2014. *Agave* biotechnology: an overview. *Critical Reviews in Biotechnology*. 35:546-559.
- Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 70: 3321-3323.
- Niino, T. Valle, M. 2015. Cryopreservation for preservation of potato genetic resources. *Breeding Science*. 65: 41-52.
- Niino, T., Kazuo, W., Nohara, N., Rafique, T., Yamamoto, Shin-ichi., Fukui, K., Valle, M., Castillo, C., Matsumoto, T. y F. Engelmann. 2014. Cryopreservation of mat rush lateral buds by air dehydration using aluminum cryo-plate. *Plant Biotechnology*. 31:281-287.
- Niino, T., Yamamoto, S., Fukui, K., Castillo Martínez, C.R., Valle, M., Matsumoto, T. y F. Engelmann. 2013. Dehydration improves cryopreservation of mat rush (*Juncus decipiens* Nakai) basal stem buds on cryo-plates. *Cryo Letters* 34:549-560.
- Nikam, T. D., G. M. Bansude y K. C. Aneesh-Kumar. 2003. Somatic embryogenesis in sisal (*Agave sisalana* Perr. ex. Engelm). *Plant Cell Reports*. 22:188-194.
- Nobel, P. S. 1990. Environmental influences on CO₂ uptake by agaves, CAM plants with high productivities. *Economic Botany*. 44:488-502.
- Normah, M. Chin, H. y B. Reed. 2012. Conservation of tropical plant species. Springer Science and Business Media. 538 p.
- Norma Oficial Mexicana. 2010. Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. NOM-059-SEMARNAT-2010. (Consultado 16 octubre 2016).
- Panis, B. y B. P. Swennen. 2005. Droplet vitrification of apical meristems: a cryopreservation protocol applicable to all *Musaceae*. *Plant Science* 168:45-55.

- Panis, B., Strosse, H., Van Den Hende, S. y R. Swennen. 2002. Sucrose preculture to simplify cryopreservation of banana meristem cultures. *CryoLetters*. 23:375-384.
- Panta, A., Panis, B., Ynouye, C., Swennen, R., y W. Roca. 2014. Development of a PVS2 droplet vitrification method for potato cryopreservation. *CryoLetters* 35: 255-266.
- Parrott, W., Dryden, G., Vogt, S., Hildebrand, D., Collins, G. y E. Williams. 1988. Optimization of somatic embryogenesis and embryo germination in soybean. *In vitro Cellular Developmental Biology Plant*. 24:817-820.
- Pence, V. 2014. Tissue cryopreservation for plant conservation: potential and challenges. *International Journal Plant Science*. 175:40-45.
- Phillips, G. C. y G. B. Collins. 1979. In vitro tissue culture of selected legumes and plant regeneration from callus cultures of red clover. *Crop Science*. 19:59-64.
- Pinos-Rodríguez, J. M., Zamudio, M. y S.S. González. 2008. The effect of planta age on the chemical composition of fresh and ensiled *Agave salmiana* leaves. *Souht African Journal of Animal Science*. 38:43-50.
- Pintos, B. Manzanera, J. A. y M. A. Bueno. 2010. Oak somatic and gametic embryos maturation is affected by charcoal and specific aminoacids mixture. *Annals of Forest Science*. 67: 205.
- Portillo, L. 1997. Embriogénesis somática indirecta en *Agave tequilana* Weber: Efecto de auxinas. Tesis de Maestría en procesos biotecnológicos. Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías, Universidad de Guadalajara. 65 p.
- Portillo, L. Santacruz-Ruvalcaba, F. Gutiérrez-Mora, A. y B. Rodríguez-Garay. 2007. Somatic embryogenesis in *Agave tequilana* Weber cultivar azul. *In Vitro Cell Developmental Biology Plant* (2007) 43:569-575.
- Portillo, L. y F. Santacruz-Ruvalcaba. 2006. Factibilidad de uso de un nuevo sistema de inmersión temporal (Orbitabion[®]) para embriogénesis somática de *Agave tequilana* Weber cultivar azul. *Boletín Nakari*. 17:43-48.

- Portillo, L., Olmedilla, A. y F. Santacruz-Ruvalcaba. 2012. Cellular and molecular changes associated with somatic embryogenesis induction in *Agave tequilana*. *Protoplasma*. 249: 1101-1107.
- Portillo, L. 2007. Morfogénesis y variación somaclonal de embrioides de *Agave tequilana* Weber cultivar azul en biorreactores de inmersión temporal. Tesis de doctorado en ciencias en procesos biotecnológicos. Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías, Universidad de Guadalajara. Jalisco, México. 114 p.
- Powers, D. E. y R. A. Backhaus. 1989. In vitro propagation of *Agave arizonica* Gentry and Weber. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 16:57-60.
- Quiroz-Figueroa, F. R., Rojas-Herrera, R., Galaz-Avalos, R. y V. M. Loyola-Vargas. 2006. Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. *Plant Cell Tissues Organ Culture*. 86: 285-301.
- Rahman, M. y O. Rajora. 2001. Microsatellite DNA somaclonal variation in micropropagated trembling aspen (*Populus tremuloides*). *Plant Cell Reports*. 20:531-536.
- Rai, R. 2007. Genetics and plant breeding: Introduction to Plant Biotechnology. Scientist National Research Centre on Plant Biotechnology. 42 p.
- Rafique T, Yamamoto S, Fukui K, Mahmood Z y T. Niino. 2015. Cryopreservation of sugarcane using the V cryo-plate technique. *Cryo Letters* 36: 51-9.
- Ramírez-Malagón, R., Borodanenko, A., Pérez-Moreno, L., Salas-Araiza, M. D., Nuñez-Palenius, H. G. y N. Ochoa-Alejo. 2008. *In vitro* propagation of three *Agave* species used for liquor distillation and three for landscape. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 94:201-207.
- Rani, V., Parida, A. y S. Raina. 1995. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for genetic analysis in micropropagated plants of *Populus deltoides* Marsh. *Plant Cell Report* 14: 459-462.
- Reed, B. M. 2008. *Plant cryopreservation: a practical guide*. Springer Science. 513 p.

- Reed, B. M., Paynter, C. L., DeNoma, J. y. Chang. 1998. Techniques for medium- and long-term storage of pear (*Pyrus* spp. L.) genetic resources. Plant Genetic Resources Newsletter. 115:1-5.
- Reinert, J. 1958. Untersuchungen über die morphogenese in gewebeulturen. Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft. 71:15-24.
- Robert, M. L., Herrera, J. L. y M. Arce-Montoya. 2007. La biotecnología aplicada al mejoramiento genético de los agaves. In: En lo ancestral hay futuro: del tequila, los mezcales y otros agaves. Centro de Investigación científica de Yucatán. Primera edición 369-384 pp.
- Rodríguez-Garay, B., Gutiérrez-Mora, A. y B. Acosta-Dueñas. 1996. Somatic embryogenesis of *Agave victoria-reginae* Moore. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 46:85-87.
- Rodríguez-Garay, B., Santacruz-Ruvalcaba, F. y L. Portillo. 2003. Regeneration of *Agave tequilana* Weber var. azul plants using indirect somatic embryogenesis. Patente número de publicación internacional: WO 03/039244 A1, 15 de mayo de 2003. Registro IMPI JL/a/2001/000023 (prioridad: 08.11.2001), Solicitud internacional PCT/MX02/00104 (08.11.2002, expedida: 03.01.2003).
- Rodríguez-Sahagún, A., Acevedo-Hernández, G., Rodríguez-Domínguez, J., Rodríguez-Garay, B., Cervantes-Martínez, J. y O. Castellanos-Hernández. 2011. Effect of light quality and culture medium on somatic embryogenesis of *Agave tequilana* Weber var. Azul. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 104: 271-275.
- Rubio, C. R. 2007. Enfermedades del cultivo de agave. Conocimiento y prácticas agronómicas para la producción de *Agave tequilana* Weber en la zona de Denominación de Origen del Tequila. In: Pérez- Domínguez, J. F. y del Real Laborde, J. I. (Eds.). Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional Pacífico Centro. Libro técnico. 4: 169-195 pp.
- Saghai-Marooof, M. Soliman, K. Jorgensen y R. Allard. 1984. Ribosomal DNA spacer-length polymorphism in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location

- and population dynamics. Proceedings of the National Academy of Sciences USA. 81: 8014-8019.
- Saher, S. Piqueras, A. Hellin, E y E. Olmos. 2004. Hyperhydricity in micropropagated carnation shoots: the role of oxidative stress. *Physiologia Plantarum*. 120: 152–161.
- Sakai, A. 1995. Cryopresevation for germplasm collection in woody plants. In Jain, S; Gupta, P; Newton, R. eds. *Somatic embryogenesis in woody plants vol. 1*. Dordrecht, NL, Kluwer. Academic Publishers. p. 293-315.
- Sakai, A. 2000. Development of Cryopreservation techniques. *Cryopreservation of tropical plant germplasm* 1-7 pp.
- Sakai, A. y F. Engelmann. 2007. Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet-vitrification: a review. *CryoLetters* 28:151-172.
- Salma, M. Fki, L. Engerlamann-Sylvestre, I. Niino, T. y F. Engelmann. 2014. Comparison of doplet-vitrification and D-cryoplate for cryopreservation of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) polyembryonic masses. *Scientia Horticulturae*. 179: 91-97.9
- San José, M. Correidora, E. Oliveira, H. y C. Santos, 2015. Cryopreservation of somatic embryos of *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. and confirmation of ploidy stability by flow cytometry. *Plant Cell Tissue Organ Culture*. 123:489-499.
- Santacruz-Ruvalcaba, F. y L. Portillo. 2009. Thin cell suspension layer as a new methodology for somatic embryogenesis in *Agave tequilana* Weber cultivar azul. *Industrial Crops and Products*. 29:609-614.
- Santacruz-Ruvalcaba, F., Gutierrez-Pulido, H. y B. Rodríguez-Garay. 1999. Efficient *in vitro* propagation of *Agave parrasana* Berger. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 56:163-167.
- Semedo, M. H. 2015. La diversidad genética: una herramienta secreta para luchar contra el cambio climático. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura. <http://www.fao.org/news/story/es/item/275178/icode/>. (Consultado 03 febrero 2017).

- Steward, F., Mapes, M. y K. Mears. 1958. Growth and organized development of cultured cells. *American Journal of Botany*. 45:705-708.
- SIAP-SAGARPA. 2015. Estadísticas de producción. <http://www.siap.gob.mx/resumen-nacionalpor-estado/> (consultado 09 febrero 2017).
- Tabares, E., Pachón, J. y W. M. Roca. 1991. Variación somaclonal y su aplicación al mejoramiento de cultivos. En: *Cultivo de tejidos en la agricultura*. Centro Internacional de Agricultura Tropical CIAT. Cali, Colombia. 340-356 pp.
- Takamori, L. M. Barbosa, M. N. Esteves, V. L. y R. A. Ferreira. 2015. Optimization of somatic embryogenesis and in vitro plant regeneration of *Urochloa* species using picloram. *In Vitro Cellular Development Biology Plant*. 51:554-563.
- Tejavathi, D., Rajanna, M., Sowmya, R. y K. Gayathamma. 2007. Induction of somatic embryos from cultures of *Agave vera-cruz* Mill. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant*. 43:423-428.
- Thorpe. T. 2007. History of plant tissue culture. *Molecular Biotechnology*. 37:169-180.
- Thorpe, T. A., y E. C. Yeung. 2011. *Plant Embryo Culture: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*. Springer. vol. 710. 371 p.
- Torres, I., Casas, A., Vega, E., Martínez-Ramos, M., y A. Delgado-Lemus. 2015. Population dynamics and sustainable management of mescal Agaves in central Mexico: *Agave potatorum* in the Tehuacán Cuicatlán valley. *Economic Botany*. 20:1-16.
- Torres-Morán, M. I., Velasco-Ramírez, A. P., Hurtado-de la Peña, S. A., Rodríguez-García, A. y S. Mena-Munguía. 2013. Variability and genetic structure in a commercial field of tequila plants, *Agave tequilana* Weber (*Agavaceae*). *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*. 8:44-53.
- Torres-Morán, M. I., Infante, D. Sánchez-González, J. J. Morales-Rivera, M. M. y A. Santerre. 2005. Diversidad genética en *Agave tequilana* Weber var. azul proveniente de micropropagación. *Boletín Nakari*. 16: 3
- Valenzuela Z. A. G. 1994. *El agave tequilero: Su cultivo e industrialización*. Monsanto, México. 119 p.

- Valenzuela Z., A. G. 1995. La agroindustria del agave tequilero *Agave tequilana* Weber. Boletín de la Sociedad Botánica de México. 55:15-25.
- Valenzuela-Sánchez, K. K., Juárez-Hernández, R. E., Cruz-Hernández, A., Olalde-Portugal, V., Valverde, M. E. y O. Paredes-López. 2006. Plant regeneration of *Agave tequilana* by indirect organogenesis. In Vitro Cellular Developmental Biology Plant. 42:336-340.
- Vázquez, E y S. Torres. 2001. Fisiología Vegetal. Editorial Pueblo y Educación. La Habana, Cuba. 451p.
- Vikran y A. Rashid. 2002. Somatic embryogenesis from immature and mature embryos of a minor millet *Paspalum scrobiculatum* L. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 69: 71-77.
- Villalobos, V. M., y F. Engelmann. 1995. *Ex situ* conservation of plant germplasm using biotechnology. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 11:375-382.
- Viñas, M. y V. Jiménez. 2011. Factores que influyen en la embriogénesis somática *in vitro* de palmas (*Arecaceae*). Revista Colombiana de Biotecnología 8:229-242.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J. y Kuiper, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Research. 23: 4407–1444.
- Wen, B. y R. Wang. 2010. Pretreatment incubation for culture and cryopreservation of *Sabal* embryos. Plant Cellular Tissue Organ Culture. 102:237-243.
- Wilkinson, T., Wetten, A., Prychid, C. y M. F. Fay. 2003. Sustainability of cryopreservation for the long-term storage of rare and endangered plant species: a case history for *Cosmos atrosanguineus*. Annals of Botany. 91:65-74.
- Williams, E. y M. Maheswaran. 1986. Somatic embryogenesis: Factors influencing coordinated behaviour of cell as an embryogenic group. Annals of Botany. 57:443-462.
- Williams, J. G., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A. y Tingey, S. V. 1990. DNA Polymorphism Amplified by Arbitrary Primers are Useful as Genetic Markers. Nucleic Acid Research. 18: 6531-6535.

- Yamamoto S., Rafique T., Fukui K., Sekizawa, K., y T. Niino. 2012. V-Cryo-plate procedure as an effective protocol for cryobanks: Case study of mint cryopreservation. *Cryo-Letters*. 33: 12–23.
- Yamamoto, S., Wunna, R., Arizaga, M., Fukui, K., Gutiérrez, E. y T. Niino. 2015. The Aluminum Cryo-plate Increases Efficiency of Cryopreservation Protocols for Potato Shoot Tips. *American Journal of Potato Research*. 92:250-257.
- Zietkiewickz, E., Rafalski, E., y L. Labuda. 1994. Genome Fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*. 20: 176-183.
- Zizumbo, V. Partida, M. 2012. Los mezcales del sur de Jalisco: tradición milenaria y diversidad en riesgo. Suplemento informativo de La Jornada número 53. <http://www.jornada.unam.mx/2012/02/18/cam-oro.html>. (Consultado 09 febrero 2017).
- Zizumbo-Villarreal, D., Vargas-Ponce, O., Rosales-Adame, J. y P. Colunga-GarcíaMarín. 2013. Sustainability of the traditional management of *Agave* genetic resources in the elaboration of mescal and tequila spirits in western Mexico. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 60: 33–47.

ANEXOS

Anexo 1

Análisis de varianza para número de embriones somáticos ES4 con adición de aminoácidos.

Análisis de Varianza para NO EMBRIONES

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:TRAT INDUCCION	3820.75	1	3820.75	6.22	0.0162
B:TRAT EXPRESION	4561.99	3	1520.66	2.47	0.0731
C:TIPO EXPLANTE	16507.2	1	16507.2	26.85	0.0000
INTERACCIONES					
AB	5433.83	3	1811.28	2.95	0.0424
AC	4681.22	1	4681.22	7.62	0.0082
BC	2778.59	3	926.197	1.51	0.2250
ABC	4426.03	3	1475.34	2.40	0.0796
RESIDUOS	28891.1	47	614.705		
TOTAL (CORREGIDO)	69229.9	62			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Anexo 2

Inducción de ESI con diferentes concentraciones de picloram en hoja y raíz de ES4

Análisis de Varianza para No. de embriones - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:picloram	7439.27	3	2479.76	4.20	0.0072
B:BA	9742.72	3	3247.57	5.50	0.0014
C:Explante	87.025	1	87.025	0.15	0.7017
INTERACCIONES					
AB	8419.57	9	935.508	1.58	0.1266
AC	1660.27	3	553.425	0.94	0.4248
BC	1181.93	3	393.975	0.67	0.5737
ABC	6706.17	9	745.131	1.26	0.2640
RESIDUOS	75588.0	128	590.531		
TOTAL (CORREGIDO)	110825.	159			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Anexo 3

Inducción de ESI con diferentes concentraciones de 2,4-D en hoja y raíz en ES4

Análisis de Varianza para No. de embriones - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:2,4-D	19243.5	3	6414.5	2.40	0.0708
B:BA	19018.7	3	6339.57	2.37	0.0734
C:Explante	27978.4	1	27978.4	10.47	0.0015

INTERACCIONES					
AB	22352.9	9	2483.65	0.93	0.5018
AC	17104.1	3	5701.35	2.13	0.0992
BC	9379.76	3	3126.59	1.17	0.3237
ABC	17468.3	9	1940.92	0.73	0.6838
RESIDUOS	336561.	126	2671.12		
TOTAL (CORREGIDO)	468327.	157			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Anexo 4

Inducción de ESI en raíz con 2,4-D y BA en genotipos G0 (Agave maximiliana, A3H1 (hijuelo de A. tequilana) y ES4 (A. tequilana cv. azul) en raíz.

Análisis de Varianza para NO. EMBRIONES - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:2,4-D	7387.22	1	7387.22	41.43	0.0000
B:Genotipo	30438.4	2	15219.2	85.35	0.0000
C:PVP	84.0176	1	84.0176	0.47	0.4955
INTERACCIONES					
AB	14389.7	2	7194.84	40.35	0.0000
AC	1453.57	1	1453.57	8.15	0.0062
BC	163.659	2	81.8297	0.46	0.6345
ABC	2831.43	2	1415.72	7.94	0.0010
RESIDUOS	9272.0	52	178.308		
TOTAL (CORREGIDO)	64997.4	63			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Pruebas de Múltiple Rangos para NO. EMBRIONES por 2,4-D

Método: 95.0 porcentaje LSD

2,4-D	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
3	32	4.9	2.36926	X
2	32	26.4667	2.36926	X

Anexo 5

Inducción de embriogénesis somática en A. tequilana) cv. chato con picloram

Análisis de Varianza para NO. EMBRIONES - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:PICLORAM	64.8615	2	32.4308	2.15	0.1395
B:BA	39.2	1	39.2	2.60	0.1207
INTERACCIONES					
AB	42.2154	2	21.1077	1.40	0.2672
RESIDUOS	347.2	23	15.0957		
TOTAL (CORREGIDO)	494.759	28			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Anexo 6

Inducción de embriogénesis somática en cultivar Chato (A. tequilana) con 2,4-D

Análisis de Varianza para NO. EMBRIONES - Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:2,4-D	528.835	2	264.417	1.02	0.3779
B:BA	180.0	1	180.0	0.69	0.4143
INTERACCIONES					
AB	65.1115	2	32.5558	0.13	0.8831
RESIDUOS	5989.2	23	260.4		
TOTAL (CORREGIDO)	6783.45	28			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Anexo 7

Preparación de solución amortiguadora para extracción, protocolo Shagai Maroof, (1984)

	Concentración final	1rxn (1mL)
ddH ₂ O	N/A	630 µL
1M Tris HCl-7.5	100 mM	100 µL
5M NaCl	700 mM	140 µL
0.5 M EDTA-8.0	50 mM	100 µL
CTAB	3%	0.03 µL
14 M BME	420 mM	30 µL
PVP	3%	0.03 g

Anexo 8

Preparación TE- 8.0 (10 mM Tris-8.0, 1 mM EDTA-8.0)

Solución Concentrada	100 mL
1M Tris-8.0	1.0
0.5 M EDTA-8.0	0.2
ddH ₂ O	98.8

Anexo 9*Preparación de la reacción de restricción-ligación*

μL	1RxN Vol 11
ddH ₂ O	1.71
10X Cutsmart buffer	1.1
50 U/μL <i>MseI</i>	0.02
20 U/μL <i>EcoRI</i>	0.27
10X <i>EcoRI</i> Reaction Buffer	0.55
10X Ligase buffer	1.1
5 μM Adaptador <i>EcoRI</i>	1.1
50 μM Adaptador <i>MseI</i>	1.1
400 U/ μl T4 DNA Ligase	0.05
ADN	4

Anexo 10*Preparación para la reacción de PCR pre-amplificación*

μL	Concentración final	1RxN Vol 25
ddH ₂ O		8.5
2X RedTaq	1X	12.5
10 μM <i>EcoRI</i> +a	0.44	1.1
10 μM <i>MseI</i> +c	0.44	1.1
1:1 producto de restricción-ligación (R-L)		3

Anexo 11*Preparación para la reacción PCR selectiva*

μL	Concentración final	1RxN Vol 11
ddH ₂ O		1
2X RedTaq	0.8	4
10 μM EcoRI+a	0.5	0.5
10 μM MseI+c	0.5	0.5
1:4 producto de pre-amplificación		4