



**EDUCACIÓN**  
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO  
NACIONAL DE MÉXICO®

Instituto Tecnológico de Acapulco



---

---

TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO  
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE ACAPULCO  
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y BIOQUÍMICA

EFFECTO DEL GENOTIPO Y LA EDAD EN EL  
ESTABLECIMIENTO DE LÍNEAS CLONALES DE  
*Agave cupreata*.

TITULACIÓN INTEGRAL:  
TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
INGENIERO BIOQUÍMICO

PRESENTA:  
JAQUELINE BENÍTEZ ZÁRATE

DIRECTOR DE TESIS:  
DRA. KELLY MARIBEL MONJA MIO

CO DIRECTOR DE TESIS:  
DR. ANTONIO RESCALVO MORALES

ACAPULCO, GRO. 2023

El presente trabajo de investigación: **“Efecto del genotipo y la edad en el establecimiento de líneas clonales de *Agave cupreata*”** está dentro del marco del Proyecto: “Estrategias multidisciplinares para incrementar el valor de las cadenas productivas de Café, Frijol, Mango, Agave mezcalero y Productos Acuícolas (tilapia) en la región pacifico sur a través de la ciencia, la tecnología y la innovación” (No. de proyecto 296329) el cual está a cargo del Centro de Investigación Científica de Yucatán, realizado en las instalaciones del consorcio agroalimentario CONACYT ADESUR (Alianza para el Desarrollo de la Región Pacífico Sur) bajo la dirección de la Dra. Kelly Maribel Monja Mio y el Dr. Antonio Rescalvo Morales.

## **Agradecimientos**

A la Dra. Kelly Maribel Monja Mio, director de tesis por la oportunidad, apoyo, consejos y gran paciencia durante la realización del presente trabajo de investigación.

Al Dr. Antonio Rescalvo Morales, co – director de tesis, por su apoyo, correcciones y consejos en el desarrollo del presente trabajo de investigación.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán y al Consorcio Agroalimentario Alianza para el Desarrollo de la Región Pacífico Sur (ADESUR), por proporcionar las instalaciones y equipos necesarios para el desarrollo de este trabajo.

A mi mamá Gaby y mi papá Pedro, por su amor, cuidados, consejos, protección y apoyo constante en todos los proyectos de mi vida.

A mis hermanos Brenda y Pedro y mascotas por ser los mejores amigos y compañeros de vida.

Aquellas personas que falte de mencionar, pero que han dejado una huella en mí.

Y a Dios, por ser mi principal guía y su perfecta voluntad.

# Índice

<b>Agradecimientos</b> .....	ii
<b>Índice</b> .....	iii
<b>Índice de figuras</b> .....	v
<b>Índice de cuadros</b> .....	vi
<b>Abreviaturas</b> .....	vii
<b>Resumen</b> .....	viii
<b>Capítulo I. Introducción</b> .....	1
1.1 Antecedentes .....	3
1.2 Planteamiento del problema .....	5
1.3 Objetivos .....	6
1.3.1 Objetivo General.....	6
1.3.2 Objetivos Específicos .....	6
1.4 Justificación .....	7
<b>Capítulo II. Marco teórico</b> .....	8
2.1 El género <i>Agave</i> .....	8
2.1.1 Biología del género <i>Agave</i> .....	9
2.1.2 <i>Agave cupreata</i> .....	11
2.1.2.1 Biología y Distribución .....	11
2.1.2.2 Usos e importancia .....	13
2.1.1.1 Problemática del cultivo .....	15
2.2 Alternativa Biotecnológica .....	16
2.2.1 Cultivo de tejidos vegetales .....	16
2.2.2 Micropropagación.....	17
2.3 Morfogénesis.....	19
2.3.1 Organogénesis adventicia .....	21
2.3.2 Factores que afectan la Morfogénesis .....	22
2.3.3 Factores del material parental que influyen la morfogénesis .....	24
2.3.3.1 Influencia del lugar y época de colecta.....	24
2.3.3.2 Influencia de la edad .....	26
2.3.3.3 Influencia del genotipo y factores genético – moleculares .....	29

<b>Capítulo III. Metodología</b> .....	34
3.1 Diagrama experimental .....	34
3.2 Material Vegetal .....	35
3.2.1 Caracterización morfológica del Material Vegetal .....	35
3.2.2 Obtención y desinfección del cogollo de plantas .....	35
3.3 Inducción Organogénica.....	38
3.3.1 Inducción de los explantes .....	38
3.3.2 Evaluación de la inducción organogénica.....	38
3.4 Multiplicación de brotes .....	39
3.5 Análisis estadístico .....	39
<b>Capítulo IV. Resultados</b> .....	40
4.1 Caracterización morfológica del material vegetal.....	40
4.2 Influencia de la edad y el genotipo en la fase de inducción organogénica de <i>A. cupreata</i> .....	45
4.3 Influencia de la edad y el genotipo en la fase de multiplicación de <i>A. cupreata</i> .....	51
<b>Capítulo V. Discusión</b> .....	56
<b>Capítulo VI. Conclusión</b> .....	63
<b>Capítulo VII. Recomendaciones.</b> .....	65
<b>Capítulo VIII. Bibliografía</b> .....	66
<b>Capítulo VIII. Anexos</b> .....	72

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Anatomía del <i>Agave</i> .....	10
<b>Figura 2.</b> Morfología de <i>Agave cupreata</i> .....	12
<b>Figura 3.</b> Jimado o labrado de piñas de agave silvestre y obtención del mezcal..	14
<b>Figura 4.</b> Principales métodos de micropropagación .....	20
<b>Figura 5.</b> Factores que desencadenan la morfogénesis in vitro vegetal .....	23
<b>Figura 6.</b> Diagrama Experimental .....	34
<b>Figura 7.</b> Preparación del material <i>ex vitro</i> .....	37
<b>Figura 8.</b> Proceso de obtención e inducción del tejido meristemático .....	37
<b>Figura 9.</b> Caracterización morfológica de plantas juveniles de 4 edades diferentes de <i>Agave cupreata</i> .....	43
<b>Figura 10.</b> Carcterización morfológica de plantas juveniles de <i>Agave cupreata</i> .....	44
<b>Figura 11.</b> Porcentajes de respuesta en la clasificación de la capacidad morfogénica de genotipos de diferentes edades de plantas de <i>Agave cupreata</i> ...	49
<b>Figura 12.</b> Genotipos responsivos y no responsivos a las 6 semanas de inducción organogénica .....	50
<b>Figura 13.</b> Genotipos responsivos y no responsivos a las 6 semanas de inducción organogénica .....	50
<b>Figura 14.</b> Número de brotes por subcultivos de explantes provenientes de plantas de 4 edades diferentes de <i>A. cupreata</i> .....	53
<b>Figura 15.</b> Genotipos responsivos y no responsivos al primer mes de multiplicación (subcultivo 1) .....	54
<b>Figura 16.</b> Genotipos responsivos y no responsivos al segundo mes de multiplicación (subcultivo 2) .....	55
<b>Figura 17.</b> Genotipos responsivos y no responsivos al tercer mes de multiplicación (subcultivo 3) .....	55

## Índice de cuadros

<b>Cuadro 1.</b> Trabajos de regeneración <i>in vitro</i> enfocados en la influencia de la edad, el genotipo y factores genético–moleculares.....	32
<b>Cuadro 2.</b> Tiempo de inmersión en NaClO comercial al 40% (v/v) de los diferentes cogollos utilizados para la obtención del tejido meristemático.....	37
<b>Cuadro 3.</b> Resultado de la inducción organogénica directa de 4 diferentes edades de <i>Agave cupreata</i> .....	47
<b>Cuadro 4.</b> Resultado de la multiplicación de brotes en clonas provenientes de plantas de 4 diferentes edades de <i>Agave cupreata</i> .....	53

## Abreviaturas

2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético.
2iP	6- $\gamma$ , $\gamma$ -dimetilalilaminopurina.
ANA	Ácido naftalenacético.
AIA	Ácido-3-indol acético.
AIB	Ácido indol butírico.
BA	Benciladenina.
BAP	6-bencilaminopurina.
CTV	Cultivo de Tejidos Vegetales.
ES	Embriogénesis somática.
GA <sub>3</sub>	Ácido giberélico.
MS	Medio de Murashige y Skoog.
MSB	Medio MS con reducción de nitratos.
NOA	Ácido naftoxiacético.
OD	Organogénesis Directa.
OI	Organogénesis Indirecta.
ZE	Embriogénesis cigótica.

## Resumen.

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del factor genotipo–edad en la capacidad organogénica durante el establecimiento de líneas clonales de *A. cupreata*. Las edades de las plantas consideradas para este estudio fueron de 6, 12, 18 y 24 meses aproximadamente, estas plantas provinieron de un semillero ubicado en Zitlala, Gro. Previo a la inducción se realizó una caracterización morfológica de todas las plantas, en donde se evaluaron parámetros como: la altura, número de hojas, largo y ancho de las hojas y diámetro del cogollo. La fase de inducción organogénica se llevó a cabo utilizando tejido meristemático del cogollo, cultivado en condiciones adecuadas por 12 semanas. Los brotes obtenidos fueron multiplicados hasta el tercer subcultivo durante 3 meses para el establecimiento de las clonas. En la fase de inducción, los resultados estadísticos, mostraron que la mayor producción de brotes fue obtenida en los explantes de las plantas de 12 meses, con un promedio de  $86.50 \pm 0.90$  brotes por planta madre. Se realizó un análisis por genotipo para cada edad estudiada, y se observó que, aún en la edad con mayor respuesta, existen genotipos que presentan baja o nula respuesta a la inducción organogénica. En la fase de multiplicación, la mayor producción de brotes al final del 3 subcultivo la obtuvieron las edades de 24 meses y 12 meses con un promedio de  $576.60 \pm 1.01$  y  $525.56 \pm 0.97$  brotes por planta madre respectivamente. Con base en los análisis, se consideró a las plantas de 12 meses de edad como las óptimas para la micropropagación mediante organogénesis adventicia. Estos resultados sugieren que, existe una gran influencia de la relación edad – genotipo en el establecimiento de las líneas clonales de *A. cupreata*, por medio de la organogénesis.

## Capítulo I. Introducción

*Agave cupreata* es una planta silvestre, endémica del estado de Guerrero y Michoacán, de gran importancia económica y cultural, ya que es aprovechada como materia prima para la producción de mezcal artesanal en diferentes regiones (Meneses, 2004, Illsley et al., 2007; Gottdiener, 2008; Martin et al., 2011; Martínez-Palacios et al., 2011). A diferencia de otras especies de agaves que se pueden reproducir de forma asexual (mediante hijuelos), *A. cupreata* solo se reproduce exclusivamente mediante la producción de semillas (Illsley et al., 2007; Meneses, 2004). Debido a la sobreexplotación y la cosecha de individuos en etapa de reproducción, las poblaciones naturales están siendo afectadas, lo que a su vez ha provocado que algunos maestros mezcaleros del estado de Guerrero, estén alarmados ante la disminución del tamaño de las poblaciones de *A. cupreata* (Martin et al., 2011).

Una solución biotecnológica a esta problemática, es el uso de Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV) a través de la micropropagación de individuos seleccionados (Tamayo Torres y Monja Mio, 2021). Entre uno de los métodos de la micropropagación, se encuentra la organogénesis adventicia, que es un proceso morfogénico que permite la obtención de brotes a partir de tejidos somáticos, donde no había yemas pre-existentes (Goerge et al. 2008). Esto es posible gracias a la propiedad que tienen las células vegetales de regenerar una parte o una planta completa cuando están sujetas a los estímulos adecuados (Bidabadi & Mohan Jain, 2020; Ikeuchi et al., 2016; Kareem et al., 2016).

Existen diversos factores que afectan la respuesta del explante al proceso morfogénico como: las condiciones físicas y químicas del medio, el explante

seleccionado, la edad y el genotipo (Miri & Roughani, 2018; Pinto et al., 2017, Tamayo Torres y Monja Mio, 2021). La edad de la planta madre es uno de los factores principales que afecta la respuesta morfogénica de los explantes (Becerra et al., 2004; Levitus et al., 2010). Varios estudios mencionan que existe una mejor respuesta para los explantes provenientes de plantas juveniles (George et al., 2008; Hoque y Mansfield, 2004; Prakash y Gurumurthi, 2010). El genotipo es otro factor que puede ser determinante en la regeneración de plantas en todos los procesos morfogénicos, ya que involucra la capacidad del explante para establecerse y llevar a cabo el proceso de transdiferenciación de las células para formar nuevos órganos bajo ciertas condiciones (Kareem et al., 2016).

Debido a lo anterior, no es posible generalizar metodologías o protocolos de trabajo, por lo que los medios de cultivo, así como las condiciones de cultivo seleccionados, deben ser específicos para cada especie en particular. El presente estudio tiene como objetivo evaluar el efecto del genotipo y la edad en la capacidad organogénica durante el establecimiento de líneas clonales de *A. cupreata*.

## 1.1 Antecedentes

Se han realizado algunos estudios acerca de diferentes factores del material parental y su influencia en la capacidad morfogénica en el cultivo *in vitro* de algunas especies del género *Agave*.

Gómez Pérez (2014), estudió las características de materiales parentales de *Agave fourcroydes* Lem y su influencia en la respuesta organogénica *in vitro* durante la inducción. Utilizó plantas de 6 diferentes tallas (<10 cm; 11-19 cm; 20-29 cm; 30-39 cm; 40-49 cm y 39-50 cm) cultivadas en campo y colectadas en diferentes meses del año (agosto y noviembre del año 2012, febrero y agosto del año 2013), así como plantas cultivadas *in vitro* de diferentes tallas (15-20 cm, 25-30 cm, 30-35 cm, 35-40 cm y 45-50 cm) aclimatadas en vivero e invernadero. Encontró que el material parental proveniente de campo presentaba variabilidad fenológica en cuanto al número de hojas, diámetro y longitud del cogollo. Además, observaron que el promedio de brotes generados fue mayor en todas las plantas colectados en el mes de febrero, con un promedio de  $14.29 \pm 1.83$  de brotes por explante. Para el caso de las plantas aclimatadas en invernadero, todas las tallas produjeron un mayor número de brotes por explante, siendo las plantas con una talla de 30-35 cm, las que presentaron mayor número de brotes por explante, en comparación de las aclimatadas en vivero.

Rescalvo-Morales et al., (2016) observaron los cambios en la longitud de los telómeros durante el proceso de inducción organogénica de *A. fourcroydes* y *A. tequilana* durante 8 semanas, utilizaron plantas cultivadas *in vitro* con 3 años de adaptación *ex vitro*. Previo a la inducción, evaluaron la longitud telomérica en los

tejidos del tallo, raíz y hojas (en este tejido a su vez tomaron hoja central, media y basal) del material donante de las dos especies estudiadas. Encontraron que la longitud telomérica fue mayor en el tallo, lo cual se puede deber a la presencia de regiones meristemáticas; un comportamiento similar fue observado en la hoja central, que es el tejido foliar más joven y de reciente formación; esto en comparación con los tejidos de la hoja media, basal y raíces, ya que estos son tejidos ya diferenciados y, en algunos casos senescentes. Estos autores sugieren que, la longitud de los telómeros es tejido específico y depende en gran medida de la edad del mismo. En la inducción realizaron una comparación de la longitud de los telómeros al inicio y después de 8 semanas de inducción entre ambas especies (*A. fourcroydes* y *A. tequilana*); y encontraron un aumento de la longitud de los telómeros de manera gradual durante el proceso de organogénesis en ambas especies, además observaron que esta variación en la longitud se relacionan con los cambios morfológicos observados del explante (escarchado, la formación de los primeros brotes y el desarrollo de múltiples brotes). Reportaron una mayor diferencia significativa de la longitud de los telómeros en la cuarta semana, la cual coincidió con la aparición de múltiples brotes.

Monja-Mio et al., (2018), evaluaron y caracterizaron las diferencias genéticas y epigenéticas de dos líneas clonales durante el proceso de inducción de la embriogénesis somática (ES) de *A. fourcroydes*, una altamente embriogénica y otra no embriogénica. En la línea clonal altamente embriogénica se encontraron cambios más dinámicos en los eventos de metilación-desmetilación, lo cual puede tener influencia sobre la regulación de varios genes implicados en la ES. Por otra parte, la línea clonal no embriogénica presentó un alto número de eventos de

hiperventilación a lo largo del proceso y de manera constante, pudiendo ser una de las posibles causas de la inhibición de la expresión génica durante la ES. Esta dinámica de metilación, puede ser el origen de que solo algunos materiales respondan durante la inducción de la ES.

## **1.2 Planteamiento del problema**

Actualmente las poblaciones silvestres del Maguey papalote, así como los cultivos de manejados por campesinos se han visto afectados por la sobredemanda de materia prima derivada de la gran popularidad que ha tenido el mezcal artesanal en los últimos años. Por este motivo, se han buscado diferentes alternativas para satisfacer tal demanda. El uso del CTV podría ser una solución para la producción de plantas de *Agave cupreata* a través del proceso de micropropagación, utilizando las diferentes técnicas que este proceso nos ofrece, siendo así una de las propuestas que puede satisfacer la demanda existente sin afectar su reproducción natural y las poblaciones silvestres.

Sin embargo, la información acerca de las características del material vegetal y factores del medio de cultivo adecuados para llevar a cabo la propagación clonal de esta especie aún son poco conocidas, factores como la edad y el genotipo de la planta influyen de manera importante en el establecimiento del cultivo durante las etapas de inducción y multiplicación, lo que indica la gran necesidad de investigación de estos factores durante este proceso.

## **1.3 Objetivos**

### **1.3.1 Objetivo General**

Evaluar el efecto del factor edad-genotipo en la capacidad organogénica, durante el establecimiento de líneas clonales de *A. cupreata*.

### **1.3.2 Objetivos Específicos**

1. Evaluar las características morfológicas en relación con la edad en plantas juveniles de *Agave cupreata* con 6, 12, 18 y 24 meses de edad aproximadamente.
2. Evaluar el efecto del factor edad-genotipo en la fase de inducción organogénica adventicia de *A. cupreata*, mediante diferentes parámetros como el porcentaje de respuesta, número de brotes y el tamaño de los brotes.
3. Evaluar el efecto del factor edad-genotipo en la fase de multiplicación de *A. cupreata*, mediante diferentes parámetros como la producción total de brotes por planta y el factor de multiplicación por subcultivo.

## 1.4 Justificación

Hasta el momento no existe un protocolo de micropropagación de *Agave cupreata* que nos brinde información de las condiciones óptimas del medio y el material parental.

Conocer la influencia del genotipo y la edad en la capacidad organogénica durante la inducción de plantas de *A. cupreata*, puede ser de gran importancia para futuras investigaciones enfocadas en el desarrollo de protocolos de micropropagación en esta especie de *Agave*, lo que permitiría a su vez potenciar la producción de este recurso vegetal de importancia económica

En este trabajo se pretende estudiar el efecto del genotipo y la edad en el establecimiento de líneas clonales de *A. cupreata* en la organogénesis adventicia, evaluando las características morfológicas de las plantas a micropropagar, la respuesta y producción de brotes durante el proceso de inducción organogénica de las clonas y la multiplicación de los brotes.

## Capítulo II. Marco teórico

### 2.1 El género *Agave*

El género *Agave* pertenece a la familia Agavaceae, la cual cuenta con una gran diversidad de especies. Fue en el año 1753 cuando el naturalista Carlos Linneo le dio nombre a este género para reconocer aquellas plantas americanas con hojas suculentas, arregladas en espiral alrededor de un tallo corto, en cuyos bordes se encuentran espinas marginales y una terminal en el ápice (García-Mendoza, 2012).

García Mendoza (2012) reporta que se conocen un total 210 especies, de las cuales 159 crecen en territorio mexicano y 119 son endémicas del país. Su distribución en México es muy asimétrica, abarcando alrededor del 75% del territorio nacional, en altitudes que van desde el nivel del mar hasta por encima de los 3400 m.s.n.m. (García-Mendoza, 2012).

El género *Agave* es de gran importancia ecológica, económica y cultural para México (Gottdiener, 2008). Esto radica en los diversos usos que tienen estas plantas en los diferentes estados del país (Parson, 2018). Entre los usos tradicionales de este género se encuentra la elaboración de bebidas alcohólicas, como el pulque, mezcal y tequila; también se extraen fibras como el henequén para la elaboración de ropa u otros productos (Parson, 2018). Actualmente todavía se siguen encontrando nuevos usos en la industria alimentaria y farmacéutica, lo que pone de manifiesto la gran importancia de este género para la agricultura e industria en México (Parson, 2018).

### 2.1.1 Biología del género *Agave*

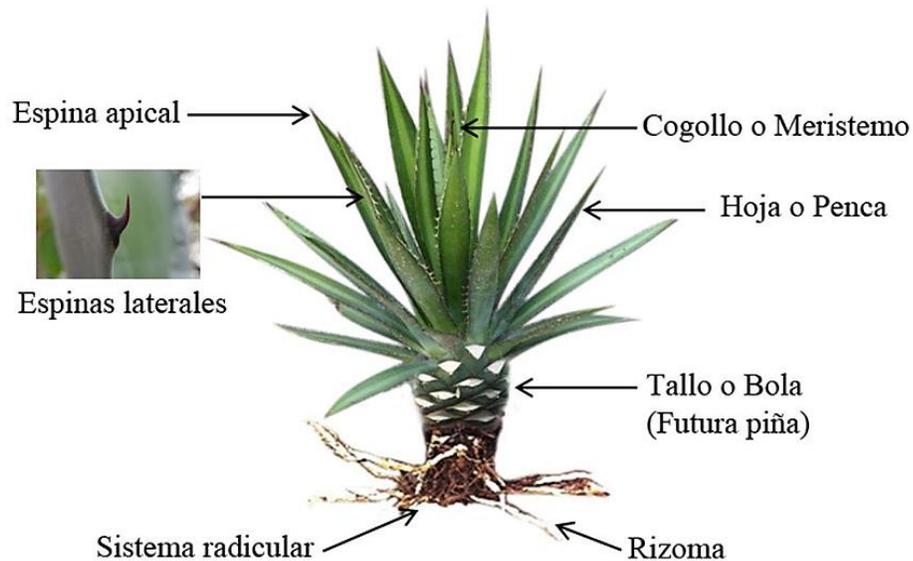
Las plantas del género *Agave* son semélparas, perennes, xerófitas y se clasifican en dos subgéneros *Agave* y *Littaea*, esto de acuerdo a el tipo de inflorescencia que presentan (Gottdiener, 2008). Gentry (1982) menciona que el subgénero *Littaea* presenta inflorescencia espigada y flores en pares, mientras que el subgénero *Agave* tiene las inflorescencias paniculadas y las flores se presentan en grandes agregados umbelados sobre pedúnculos laterales. La inflorescencia que surge del meristemo apical del maguey suele ser desproporcionada en relación con el tamaño de la planta (Gottdiener, 2008).

Las hojas se disponen en espiral y arregladas en rosetas, casi siempre tiene una espina al final del ápice; el número de hojas varía de 5 hasta 200 dependiendo de la especie; por lo general son suculentas, fibrosas, con la base dilatada y carnosa, su forma varía de linear a lanceolada u ovada (Figura 1) (García Mendoza, 2007). Las flores tienen diferentes grados de suculencia, son bisexuales, tubulares, con ovario ínfero, son protándricas, es decir, los estambres se desarrollan y maduran antes que los carpelos (García Mendoza, 2007). El fruto es una cápsula seca, trilocular, con semillas dispuestas en dos hileras por lóculo, negras, aplanadas y rodeadas por un ala corta en su parte distal redondeada (García Mendoza, 2007).

Su reproducción puede ser de manera sexual y asexual. En el primer caso, la reproducción se logra mediante la polinización que efectúan algunos animales, principalmente murciélagos nectarívoros y, en menor grado, insectos diurnos y nocturnos (palomillas, abejas, abejorros) y aves (colibríes, aves percheras) (García Mendoza, 2007). La mayoría de los agaves se propaga de forma asexual, produciendo clones en diferentes partes de la roseta o la inflorescencia. Los hijuelos se desarrollan en la base de la planta o pueden generar estolones, los cuales emergen a cierta distancia de la planta madre, posteriormente producen raíces y, con el tiempo, crecen de manera independiente. (García Mendoza, 2007).

### Figura 1

*Anatomía general de una planta de Agave.*



Tomado de Esparza-Ibarra et al. (2015)

### **2.1.2 *Agave cupreata***

*A. cupreata* es una de las plantas perteneciente al género *Agave* y de acuerdo con Gentry (1982) se clasifica dentro del subgénero *Agave* (por sus inflorescencias paniculadas)

Entre los nombres comunes con los que se le conoce se encuentra papalometl (maguey mariposa), yaabenisi (mixteco), maguey de mezcal, ancho, maguey papalote, maguey bravo, tuchi y el epíteto de la especie *cupreata* hace referencia al color cobre de sus espinas. (Gottdiener, 2008; Sierra, 2009).

#### **2.1.2.1 Biología y Distribución**

*A. cupreata* es una planta tipo roseta, su tamaño puede variar según el sitio en el que crezca, por lo regular llegan a crecer hasta 1 metro de alto y 80 centímetros de ancho y su escapo floral puede medir hasta 6 metros de alto (Figura 2) (Martin et al., 2011). Su floración se da en las épocas de secas de enero a marzo, dos meses antes de que inicien las lluvias entre mayo y noviembre (Gottdiener, 2008). Esta especie no produce vástagos vegetativos (reproducción asexual), por lo que su reproducción es únicamente mediante semillas (reproducción sexual) que puedan dispersarse y establecerse en un sitio dado, y depende totalmente de la polinización de murciélagos nocturnos, abejas, mariposas nocturnas, etc (Martin et al., 2011). García Meneses (2004) encontró que las semillas, dispersadas por viento, aunque tienen una tasa de germinación potencial del 90%, la depredación de éstas puede acabar hasta con más del 90% de las semillas (Meneses, 2004; Illsley et al., 2007).

## Figura 2

Morfología de una planta adulta de *Agave Cupreata*.



A. Roseta B. Hojas C. Espina terminal D. Flores E. Fruto F. Escapo Floral

Tomado de: Tohue, (2020), Torres-García (2016), Conabio

*A. cupreata* crece generalmente en pendientes montañosas de bosques de pino-encino, pastizales, palmares o selvas bajas y se distribuye en su mayoría en la cuenca del Río Balsas en los estados de Guerrero y noreste de Michoacán, en altitudes de 1200 a 1850 m.s.n.m., con precipitaciones anuales de 73 a 86 mm (CONABIO, 2006).

### 2.1.2.2 Usos e importancia

El uso principal de *Agave cupreata* es como materia prima para la producción de mezcal en varias comunidades de los estados de Guerrero y Michoacán ( Illsley et al., 2007); para la elaboración del mezcal las “fábricas” familiares siguen la tradición de sus antecesores, este proceso de elaboración ha adquirido Denominación de Origen Mezcal (DOM), la cual reconoce la identidad y calidad de dicho producto frente al mercado nacional e internacional (Barrientos-Rivera et al., 2020).

En el estado de Guerrero, según reportes de la Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (SADER) en el año 2020 se contabilizaron 500 fábricas de mezcal (100 certificadas) y 7 envasadoras (5 certificadas) con capacidad de envasado de 2,800,000 litros anuales. La producción de esta bebida alcohólica en el estado de Guerrero alcanza 1.5 millones de litros al año, lo que a su vez es equivalentes a 180 millones de pesos. Existiendo en el mercado 20 marcas a la venta y exportando más de 100 mil litros a países como Nueva Zelanda, Australia, España, Italia, Madagascar, Republica Checa, Alemania y Estados Unidos (SADER, 2020).

Actualmente se está investigando en darle otros usos a esta especie de agave, dos claros ejemplos son: Uc León, en 2017 reporto el uso del bagazo que se obtiene de la elaboración del mezcal, el cual puede ser utilizado como fuente de biomasa lignocelulósica para la producción de bioaceite, carbón y gas obtenidos mediante el proceso de pirolisis.

Salazar Pineda, 2017 reportó la evaluación de extractos de hexano y diclorometano en hojas de *A. cupreata*, los cuales mostraron una respuesta antibacteriana tanto para cepas de *Staphylococcus*, así como una posible fuente importante de compuestos con acción antiinflamatoria.

Además *A. cupreata* tiene una gran importancia ecológica, ya que constituye una especie clave al proveer alimento y morada a múltiples organismos como insectos y aves, esto durante su etapa de floración en donde produce una gran cantidad de néctar durante los meses de enero a marzo. Por tal motivo, la disminución de sus poblaciones tiene un efecto negativo en el ecosistema (Eguiarte et al., 2003).

### Figura 3

*Jimado o labrado de piñas de Agave silvestre (izquierda) y obtención del mezcal (derecha).*



Foto: Eduardo Sánchez Jiménez

### 2.1.1.1 Problemática del cultivo

La falta de conocimiento en su manejo y la colecta exhaustiva de plantas silvestres justo antes de la floración, ha traído como consecuencia que las poblaciones estén siendo reducidas y las poblaciones silvestres se estén extinguiendo (Martin et al., 2011).

Illsley et al. (2007) reportó que las poblaciones de *A. cupreata* disminuyen a una tasa del 2% anual en la región de Chilapa, con base a un muestreo que realizaron en tres sitios entre los años 2001 y 2003. Martin et al. (2011) menciona que sus poblaciones no son consistentes en densidad y estructura en toda la región, por lo que, el crecimiento de algunas poblaciones puede estar disminuyendo, mientras que otras se están regenerando eficazmente, sin embargo, la regeneración de una población de *A. cupreata* depende en gran medida de los sistemas de manejo y cosecha empleados.

Barrientos-Rivera et al. (2020) menciona que hace aproximadamente dos décadas, en Guerrero se dieron cambios en la producción agavera, lo que generó una mayor demanda de materia prima, sugiere que, en cinco u ocho años, esta práctica ocasionará una sobreproducción y una baja en los precios; por lo que, en un futuro, los costos de mano de obra serán más altos, lo cual generará escasez por la reducción en las poblaciones del Maguey papalote.

Ante la problemática que presenta esta especie de agave, pueden existir alternativas agrobiotecnológicas que puedan dar lugar a encontrar una solución viable sin afectaciones a las poblaciones naturales.

## **2.2 Alternativa Biotecnológica**

La biotecnología vegetal nos ofrece técnicas como el cultivo de células y tejidos *in vitro* de plantas, que pueden implementarse en aspectos como la micropropagación de plantas de importancia agronómica, la preservación de germoplasma silvestre, el mejoramiento genético de especies y en la industria para la producción de metabolitos (Roca y Ramírez, 2000).

### **2.2.1 Cultivo de tejidos vegetales**

El cultivo de tejidos vegetales es un conjunto de técnicas que consiste en aislar una porción de una planta (tejido, órgano o célula), comúnmente llamado explante, para cultivarlo en un medio nutritivo en condiciones físicas y químicas controladas asépticamente (George et al., 2008; Prieto & Jordan, 2005a; Roca, 2000).

EL CTV es una gran herramienta en la preservación de la calidad vegetal y es de suma importancia en la producción agrícola (Roca, 2000). Uno de sus usos principales es la reproducción de plantas, gracias a la capacidad de las células que permiten el crecimiento y el desarrollo de un nuevo individuo completo, sin necesidad de un tipo de fusión de células sexuales (Rosales et al., 2008).

Al proceso de la obtención de plantas clonadas mediante el uso de CTV se denomina: micropropagación o propagación clonal.

### **2.2.2 Micropropagación**

La micropropagación o propagación clonal se define como el proceso de multiplicación vegetativa (asexual) *in vitro*, que tiene como principal objetivo la multiplicación masiva de plantas genéticamente idénticas (líneas clonales) en espacio y tiempo reducidos (Roca, 2000; Thorpe, 2007).

El proceso de micropropagación puede dividirse en cinco estadios:

Etapa 0: Selección de la planta madre y preparación del explante. Esta primera etapa se elige y prepara de manera correcta el explante, ya que esto incide directamente sobre la calidad del mismo y su respuesta frente a los principales problemas que afectan al establecimiento del cultivo (Levitus et al., 2010).

Etapa 1: Establecimiento del cultivo e inducción, en esta etapa principalmente se espera que los cultivos sean viables y axénicos, además de que se induce el desarrollo de órganos o embriones con la estimulación de reguladores de crecimiento (Valencia, 2004).

Etapa 2: Multiplicación, lo que se busca es mantener y aumentar la cantidad de brotes para los nuevos ciclos de multiplicación sucesivos (subcultivos) y poder destinar parte de ellos a la siguiente etapa (Levitus et al., 2010).

Etapa 3: Enraizamiento, las formas obtenidas en las etapas anteriores son ahora tratados para inducir la formación de raíces y producir plántulas completas (Valencia, 2004).

Etapa 4: Aclimatización, las plántulas salen del ambiente estéril y rico en nutrientes del tubo de ensaye para iniciar su desarrollo en tierra (Valencia, 2004).

La micropropagación tiene una amplia aplicación en cultivos comerciales como plantas ornamentales, frutales, forestales y especies hortícolas comestibles, es recomendable para la multiplicación rápida de materiales en vía de extinción y materiales valiosos o de alto valor agregado para el comercio (Roca & Ramírez, 2000)

Los métodos que están teóricamente disponibles para la propagación de plantas *in vitro*, son principalmente dos (George et al. 2008):

1. Multiplicación de meristemas apicales y axilares del tallo que ocurre como una continuación del crecimiento y desarrollo de estructuras organizadas.

2. Por la formación de brotes o embriones adventicios que resultan de un proceso de formación de *novo*, a partir de células donde no existía organización alguna. Este último método de propagación de plantas se denomina morfogénesis (George et al., 2008).

### 2.3 Morfogénesis

La Morfogénesis puede definirse como el proceso de generación de nuevas formas y estructuras, como órganos (organogénesis) o embriones (embriogénesis) en tejidos vegetales que carecen de meristemas preexistentes (George et al., 2008; Prieto & Jordan, 2005).

Los procesos morfogénicos (organogénesis o embriogénesis somática) puede darse de forma directa o indirecta, el desarrollo de estas vías puede observarse en la figura 4. De manera directa, los órganos u embriones se desarrollan directamente a partir de las células del explante, mientras que, de la forma indirecta se da mediante formación de una masa de células no diferenciadas denominada callo que precede a la formación de estas nuevas estructuras (George et al. 2008, Tamayo y Monja 2021).

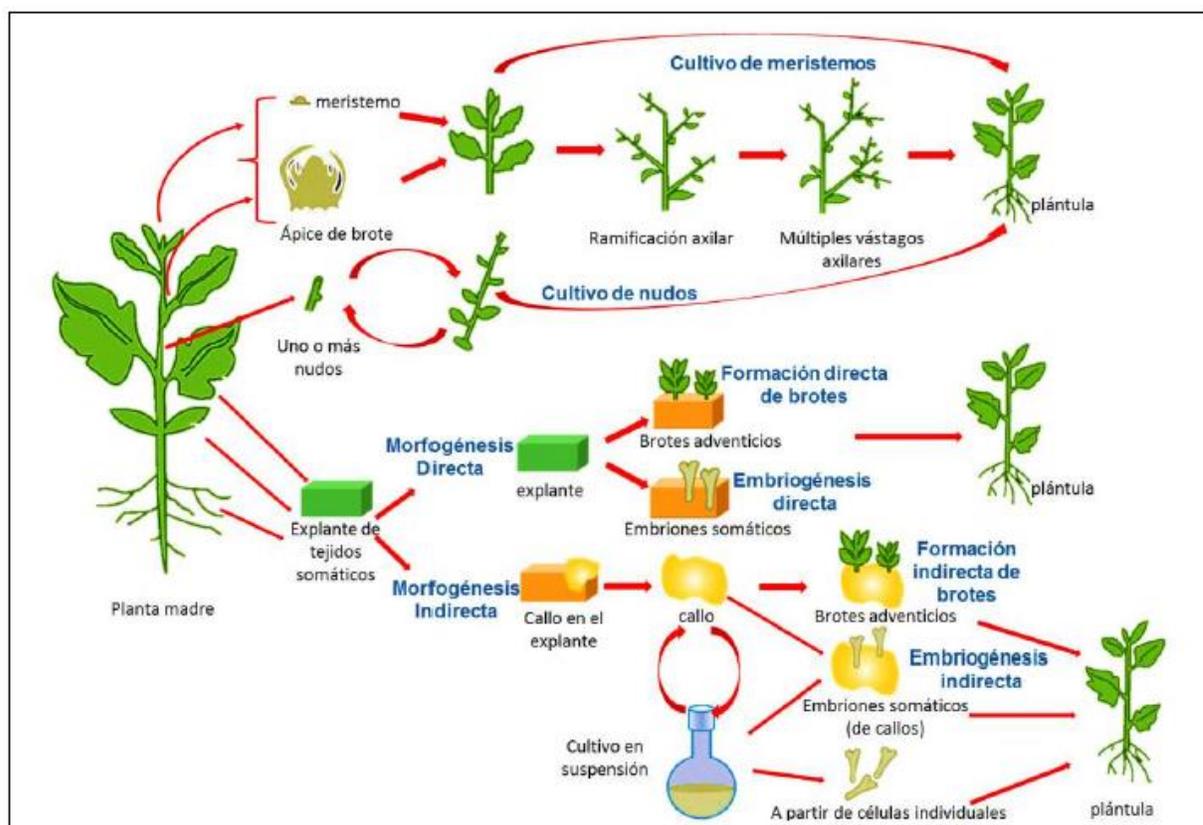
La formación de estructuras de *novo*, es el resultado de la capacidad de regeneración que tiene las células de los tejidos vegetales (George et al., 2008). En este proceso las células diferenciadas revierten o convierten su destino de desarrollo y se reconstruyen a una nueva forma celular, permitiendo que las células adquieran competencia para formar un nuevo tejido de acuerdo con el estrés y las nuevas señales endógenas y exógenas a las que se expone el explante (Sugimoto et al., 2019)

En la primera fase, el explante adquiere competencia durante una etapa transitoria de desdiferenciación (Fehér, 2019). En la segunda fase o fase de inducción, las células son receptivas al estímulo morfogénico y hay una relación directa con el tipo, concentración y combinación de reguladores del crecimiento agregados al medio de cultivo y el órgano a desarrollar (Levitus et al., 2010).

En la tercera fase o fase de realización, la célula sufre las sucesivas divisiones para formar el órgano determinado (Levitus et al., 2010).

#### Figura 4

*Principales métodos de micropropagación.*



George et al., 2008. Citado y modificado por modificado por Monja Mio 2013.

### 2.3.1 Organogénesis adventicia

La organogénesis es la capacidad que tienen las células vegetales del explante, para reprogramar su desarrollo hacia la formación de tejidos y órganos de *novo* que constituyen una planta (George et al., 2008). Esta formación es de carácter adventicio cuando la creación del nuevo órgano da un tejido donde antes no existía (George et al., 2008), en la figura 4 se visualiza la formación de brotes de manera directa.

En la organogénesis adventicia, el material de partida es tejido diferenciado (segmentos de tallo, hoja, raíz, o meristemas preexistentes), los cuales son inducidos a una etapa de reprogramación, provocando la reversibilidad de las diferenciación de las células (Levitus et al., 2010; Sugimoto et al., 2019). El principal estímulo en la organogénesis de *novo*, podría atribuírsele a la herida, donde al hacer el corte del explante se provoca un aumento de la biosíntesis de citoquininas, que provoca la proliferación celular (Ikeuchi et al., 2016).

Durante este evento se lleva a cabo la interacción auxina-citoquinina que juega un papel fundamental, despertando la expresión de genes reguladores de células madre en células competentes, siendo así que una alta proporción de auxina/citoquinina conduce a la regeneración de la raíz, pero una menor proporción de auxina/citoquinina desencadena la regeneración de brotes (Ikeuchi et al., 2019; Sang et al., 2018).

### **2.3.2 Factores que afectan la Morfogénesis**

La formación de estructuras organogénicas y embriogénicas se ven influenciadas por diversos factores como los que se menciona en la figura 5, entre ellas el explante, donde influyen aspectos como la fuente de este, la edad, el tamaño, la orientación, la época de colecta y el genotipo (Miri & Roughani, 2018; Valencia, 2004).

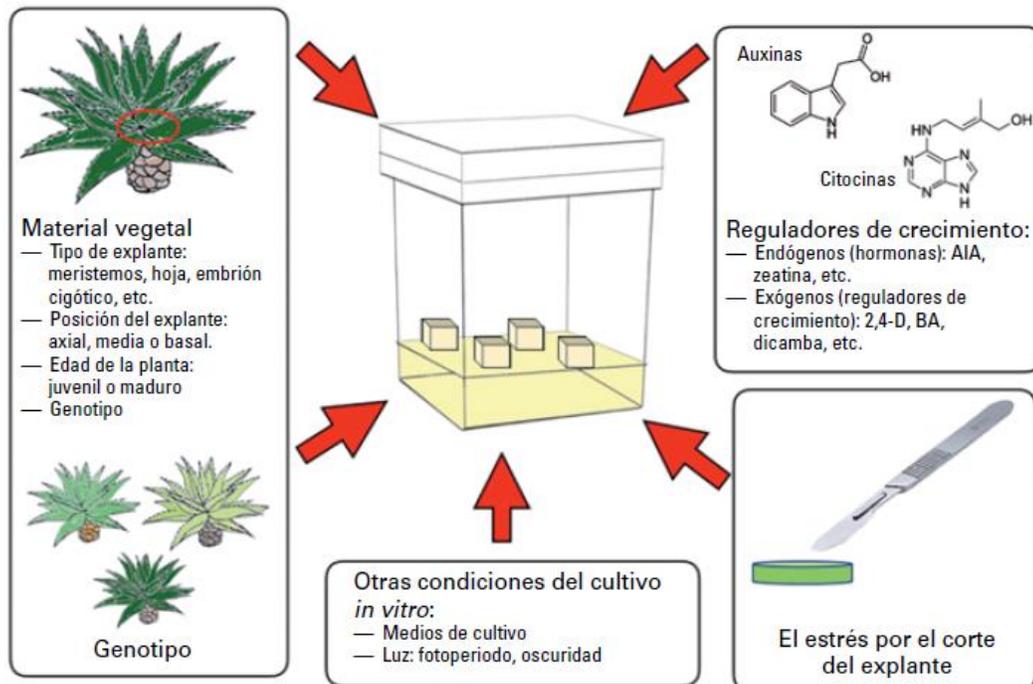
Otros factores que se deben considerar son los componentes químicos y aspectos fisicoquímicos del medio de cultivo. Un medio de cultivo es la formulación de sales inorgánicas y compuestos orgánicos de composición conocida requeridos para la nutrición y manipulación de los explantes; estos pueden utilizarse en forma sólida si se le añade un gelificante o líquida si se omite el gelificante (Cisne Contreras, 1988; Levitus et al., 2010). Generalmente la composición de un medio contiene compuestos como: una fuente de carbono (sacarosa, en concentraciones de 2 al 5%), nutrientes minerales (macro y micronutrientes) que son esenciales para el crecimiento de las plantas enteras, sustancias vitamínicas, sustancias reguladoras del crecimiento (auxinas: ANA, 2,4-D, AIA, AIB, NOA, Dicamba, Picloram y/o citocininas: BA, 2iP, Thidiazurón y las giberelinas, especialmente GA3), agente gelificante en el caso de medios sólidos (agar entre 0.6 y 1%), entre otras sustancias (carbón activados o suplementos) (Valencia, 2004). Otro aspecto a considerar en el medio de cultivo es el pH, el valor adecuado de pH es aquel que no dañe la función de la membrana celular o el citoplasma, un valor efectivo en el medio puede variar entre 4.5 y 6.5 (Cisne Contreras, 1988).

La preparación de los medios de cultivo puede llevarse a cabo de diferentes maneras, y puedes existir un medio estandarizado según la especie o género que se desee propagar (Levitus et al., 2010).

Las condiciones de incubación como la temperatura, calidad e intensidad de luz, fotoperíodo, humedad atmosférica son otros factores para considerar. En general, los cultivos son incubados para micropropagación a temperaturas entre los 25-28 °C, con ciclo de luz/oscuridad de 16/8 horas; en el caso de la luz suele ser provista por lámparas fluorescentes del tipo «luz día» con una irradiancia de preferencia de entre 50 y 200  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  y la humedad atmosférica debe ser elevada (80- 90%) procurando que se esté en las condiciones más asépticas posibles (Levitus et al., 2010).

### Figura 5

*Factores que desencadenan la morfogénesis in vitro vegetal.*



Fuente: Tamayo Torres & Monja Mio, 2021

### **2.3.3 Factores del material parental que influyen la morfogénesis**

#### **2.3.3.1 Influencia del lugar y época de colecta**

Las variaciones de temperatura, humedad y precipitaciones a las que se ven expuestas las plantas madre, juegan un papel importante en la respuesta morfogénica del cultivo *in vitro* (Gómez Pérez, 2014; Mazorra et al., 2005).

Al considerar estos factores desde las etapas tempranas del proceso de micropropagación, se contribuye a garantizar una mayor eficiencia en la multiplicación (Gonzalez et al., 2005).

Gonzalez et al., en 2005, evaluaron la influencia de la época del año en la *respuesta in vitro* de 3 diferentes genotipos de *Coffea canephora* Pierre ex Froehner variedad Robusta. Utilizaron como explante las hojas de plantas establecidas en campo de 2 años de edad. Las variables climáticas a las que estuvieron sujetas las plantas madre previo a la toma del explante fueron la Precipitación (mm), Temperatura máxima y media (°C), Humedad relativa y media (%). La mejor respuesta de los genotipos se presentó durante los meses de mayo – junio con porcentajes de entre el 79 al 97% de formación de callo, en donde se observó un considerable aumento de la temperatura en comparación con otros meses. Para los meses de abril, julio y agosto, la formación de callos resultó inferior al 43%, esto se presentó en la época con altas precipitaciones y humedad.

En comparación con este estudio, Posada-Pérez et al., (2009) estudiaron la formación de embriones somáticos a partir de frutos inmaduros y embriones cigóticos en papaya var. Maradol, los cuales fueron colectados en la época de lluvia (marzo a junio) y en la época de seca (octubre-diciembre). A diferencia de los reportado en *Coffea canephora*, en papaya no se encontraron ninguna influencia de la época del año en la formación de embriones. Sin embargo, los autores mencionan que esto puede deberse al tratamiento de riego y fertilización a la que estuvo sujeta el material vegetal antes de la colecta, lo cual es independiente de la época y de las condiciones del clima.

Gómez Pérez, (2014) también reporto que existe una influencia del mes de colecta en la producción de brotes adventicios en *Agave fourcroydes* Lem, encontrando que la mayor producción de brotes por explante fue de  $14.29 \pm 1.83$  en plantas recolectadas en el mes de febrero 2013, en donde la precipitación total del mes fue de 1.4 mm y la temperatura media de  $24^{\circ}\text{C}$ , en comparación con una menor producción ( $3.71 \pm 0.41$  brotes por explante) en el mes de agosto 2012, en donde la precipitación total del mes fue de 87.6 mm y la temperatura media de  $27.2^{\circ}\text{C}$ , observándose una marcada influencia de la precipitación en la producción, ya que esta última disminuyó conforme aumento la precipitación.

### 2.3.3.2 Influencia de la edad

Otro aspecto que puede afectar la respuesta de la morfogénesis es la edad del explante, estudios previos han mostrado que existe una menor capacidad morfogénica *in vitro* con respecto al incremento de la edad del material vegetal, siendo más difícil, en muchos casos, mantener el material adulto durante un número de subcultivos elevado, mientras que aquellos cultivos que se obtuvieron a partir de material que se encontraba en fase juvenil presentan mayor tasas de supervivencia, proliferación y enraizamiento (George et al., 2008; Prieto y Jordan, 2005).

La importancia de conocer cómo influye la edad del material vegetal en la morfogénesis, recae en que la mayoría de las ocasiones se busca que el material a propagar tenga las características de mejor valor, por ello puede llegar ser frustrante el hecho de que el material vegetal maduro tenga menos posibilidades de establecerse y multiplicarse (George et al., 2008; Levitus et al., 2010).

George et al., (2008) mencionan que existen 5 formas de clasificar la edad del tejido u órgano, considerando la influencia en la capacidad morfogenica al momento de tomarlo como explante:

1. La edad del órgano o de toda la planta madre. Son las horas, días o meses que ha transcurrido desde el crecimiento de una planta a partir de una yema o embrión, o de la iniciación de un órgano o tejido en particular.
2. Edad fisiológica. Es el tiempo necesario para llegar a una etapa en particular, como la madurez de ciertos tejidos y está influenciado por factores ambientales, como por ejemplo la temperatura.

3. Edad de crecimiento ontogenética. En este sentido un trozo de tejido se clasifica como "joven" o "anciano", según se derive de una parte de una planta en una fase juvenil o adulta en crecimiento.
4. El grado de diferenciación. Las partes más jóvenes de una planta son indiferenciadas como las células meristemáticas, mientras que las células diferenciadas como los órganos pueden considerarse tejido adulto o maduro.
5. Período del cultivo. Es el lapso de tiempo desde que el cultivo se inició por primera vez, es decir, cuando el material explantado se ha puesto en el medio de crecimiento.

La edad ontogenética y la edad de la planta madre, parecen ser los factores más importantes al momento de iniciar un CTV, aunque es primordial tomar en cuenta la parte de la planta de donde se tomará el explante y conocer el grado de diferenciación del tejido, ya que también este influirá de manera importante al momento de establecer el cultivo (George et al., 2008; Gómez Pérez, 2014).

Un ejemplo de la influencia de la edad del tejido durante la morfogenesis ha sido estudiada en plantas de *Pelargonium* durante la formación de callo en un medio modificado Linsmaier y Skoog (1965), en esta especie se observó que los explantes de 2 semanas de edad, presentaba una respuesta favorable a una concentración de 5 mg/L de ácido naftalenacético y 5 mg/L de kinetina, esto en comparación con los explantes tomados de plantas con 2 años crecidas bajo las mismas condiciones, en donde se observó la inhibición de callo (Hammerschlag y Bottino, 1981 citado en George y et al., 2008).

Para estudiar la influencia de la edad en *Perilla frutescens*, se tomaron discos foliares del segundo par desplegado de hojas con edades 9,14, 18 y 24 semanas de edad. Se observó una mayor producción de brotes en callos de explantes de hojas más jóvenes, mientras que en el caso de los callos producidos por las plantas de 24 meses de edad el crecimiento de brotes se vio inhibido (Tanimoto y Harada 1980 citado en George et al., 2008).

En *Eucalyptus camaldulensis* se observó también la influencia de la edad en la embriogénesis somática indirecta. En este estudio, el callo se indujo en explantes de cotiledones obtenidos de plántulas cultivadas *in vitro* de 10, 15, 25 y 30 días de edad con diferentes concentraciones de ANA. Los resultados mostraron que los explantes con 10 días de edad obtuvieron el mayor porcentaje de producción de embriones (Prakash & Gurumurthi, 2010).

### 2.3.3.3 Influencia del genotipo y factores genético – moleculares

El genotipo se define de manera general como la constitución genética de un individuo u organismo (Pierce, 2006). Principalmente refiriéndose a los genes que suelen presentarse en diferentes versiones, denominadas alelos (recesivo o dominante), los cuales están localizados en un locus particular de un cromosoma (Valencia, 2004).

El genotipo está relacionado con el fenotipo, este último se refiere a una característica de cualquier tipo: física, fisiológica, bioquímica o conductual del organismo (Pierce, 2006). Además, es el genotipo el que determina el potencial para el desarrollo y establece ciertos límites o fronteras del desarrollo del fenotipo, por consecuencia cada fenotipo es el resultado de la expresión de su genotipo en un ambiente específico (Pierce, 2006).

Si la respuesta morfogénica del explante dependiera únicamente de interacción con el medio ambiente, sería posible cultivar todas las plantas de un tipo similar con el mismo éxito, conociendo las condiciones específicas del medio. Desafortunadamente, los procesos a los que están sujetos los tejidos vegetales cultivados *in vitro* parecen estar bajo un control genético primordial, en comparación de otros factores, que ejercen solo un efecto menor (George et al., 2008).

Los genes que codifican o regulan las citoquininas y las auxinas pueden influir claramente en la regeneración, ya que estas hormonas actúan de manera sinérgica para promover la división celular y de manera antagónica para promover la iniciación

de brotes y raíces (Trujillo-Moya et al., 2011). Estudios en *Arabidopsis*, ha mostrado que un gen de la histidina (AHK) codifica un receptor de citoquinina (CRE1 /AHK4), el cual está involucrado en la división y regulación celular (Trujillo-Moya et al., 2011). Otros genes, como WUS (WUSCHEL) intervienen en la identidad de órganos y juegan un papel fundamental en la organogénesis (Sultana y Gangopadhyay, 2018).

El genotipo es un factor involucrado en todos los procesos morfogénicos, desde la adquisición de competencia del explante para su establecimiento en condiciones *in vitro*, permitiendo la reversibilidad de la diferenciación celular y crecimiento de nuevos órganos. (George et al., 2008; Moya, 2013).

Los genotipos a diferentes niveles: género, especie e incluso variedades de la misma especie requieren sustratos y condiciones diferentes para llevar a cabo cualquier vía morfogénica (Levitus et al., 2010). La mayoría de las investigaciones que se realizan para evaluar el efecto del genotipo en la morfogénesis, van enfocadas en la respuesta que tienen las variedades en una especie ante las mismas condiciones del cultivo.

En dos líneas puras de tomate ("Apedice" y "Porphyre"), se evaluó la capacidad de formación de brotes de manera directa e indirecta, utilizando diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento y tomando como explante el hipocótilo. Se encontró que Porphyre siempre producía una mayor cantidad de brotes en comparación con la línea Apedice. En este mismo trabajo, generaron un híbrido de las dos variedades y se observó que este producía significativamente más brotes que los padres cuando fueron colocados en la combinación adecuada de auxinas y citoquininas (Bigot et al., 1977 citado en George et al., 2008).

Andrade Rodríguez et al., (2005), evaluaron la capacidad organogénica durante la inducción de 10 variedades de tomate de cascara (*Physalis ixocarpa* Brot), de las cuales dos eran silvestres. Ellos observaron que la proporción de explantes con brotes varió de 0 a 70 %, con un número de brotes por explante que iba de 0 a 21.3, siendo las variedades cultivadas, las que tuvieron mayor número de regeneración de brotes.

Las investigaciones que se tienen hasta el momento han permitido entender los procesos genético – moleculares de la organogénesis, sin embargo, aún no hay suficiente información sobre que genes o factores pueden ser claves en la capacidad de regeneración baja o alta (Trujillo-Moya et al., 2011). En el cuadro 1, se pueden revisar algunos trabajos referentes a aspectos como la edad, el genotipo y genético – moleculares que influyen durante el proceso de la morfogénesis

## Cuadro 1

Trabajos enfocados en el estudio de regeneración *in vitro* analizando la influencia de la edad, el genotipo y factores genético – moleculares.

Especie reportada	Vía de propagación	Factor evaluado	Referencia
<b>Agave fourcroydes Lem</b>	OD	Genotipo, talla y factores ambientales a las que se vio expuesta la planta madre	Gómez, 2013
<b>Agave fourcroydes</b>	ES	Patrones genéticos y epigenéticos diferentes antes de iniciar el proceso de inducción de dos líneas clonales de <i>A. fourcroydes</i> (embriogénica y no embriogénica).	Monja-Mio et al, 2018
<b>A. fourcroydes Lem y A. tequilana Weber</b>	OD	Dinámica de la longitud de los telómeros durante la inducción de brotes adventicios de explantes provenientes de plantas adaptadas a condiciones <i>ex vitro</i> durante 3 años	Rescalvo-Morales et al, 2016
<b>Solanum lycopersicum CV. Micro-Tom</b>	OD	Variaciones alélicas en un loci dado y expresión de genes durante la adquisición de la competencia e inducción	Pinto et al., 2017
<b>Passiflora edulis f. flavicarpa</b>	OD	La fuente del explante y edad de la planta madre.	Becerra et al., 2004
<b>Rosa x hybrida</b>	OI	Variación en la formación de callo en 96 diferentes genotipos (variedades) de rosas. Se encontró un Locus de rasgo cuantitativo (QTL) importante asociado al tamaño del callo se localizó en el cromosoma 3.	Nguyen et al., 2020

<b><i>Pinus pinea</i></b>	OD	Contenido endógeno de diferentes reguladores del crecimiento vegetal y la expresión de genes supuestamente involucrados en la caulogénesis adventicia	Alvarez et al., 2020
<b><i>Eucalyptus camaldulensis</i></b>	ES	Fuente de explante (embriones cigóticos maduros y cotiledones recolectados de plántulas de 10, 15, 25 y 30 días), la edad, los reguladores del crecimiento de las plantas y la fuerza media del medio.	Prakash y Gurumurthi, 2010
<b><i>Arabidopsis thaliana</i></b>	OI	Marcas epigenéticas de metilación del ADN y modificaciones de histonas, a través de la modulación WUS en la expresión y señalización de auxinas.	Li et al., 2011
<b><i>Nicotiana tabacum</i> L. var. <i>Jayasri</i> y <i>Beta palonga</i> R.K. Basu &amp; K.K. Mukh</b>	OD	Expresión relativa del gen WUS (WUSCHEL) de una manera dependiente del tiempo y el papel de los reguladores del crecimiento.	Sultana y Gangopadhyay, 2018
<b><i>Helianthus annuus</i></b>	OD	Alta variabilidad genética para los parámetros de organogénesis entre trece genotipos, efecto citoplásmico e interacción nucleocitoplasmática para algunos de los parámetros de regeneración	Deglène et al., 1997
<b><i>Physalis ixocarpa</i> Brot</b>	OD	Evaluación de la capacidad organogénica durante la inducción de 10 variedades (2 variedades silvestres y 8 domesticadas).	Andrade Rodríguez et al., 2005

OD: Organogénesis directa    OI: Organogénesis Indirecta    ES: Embriogénesis somática.

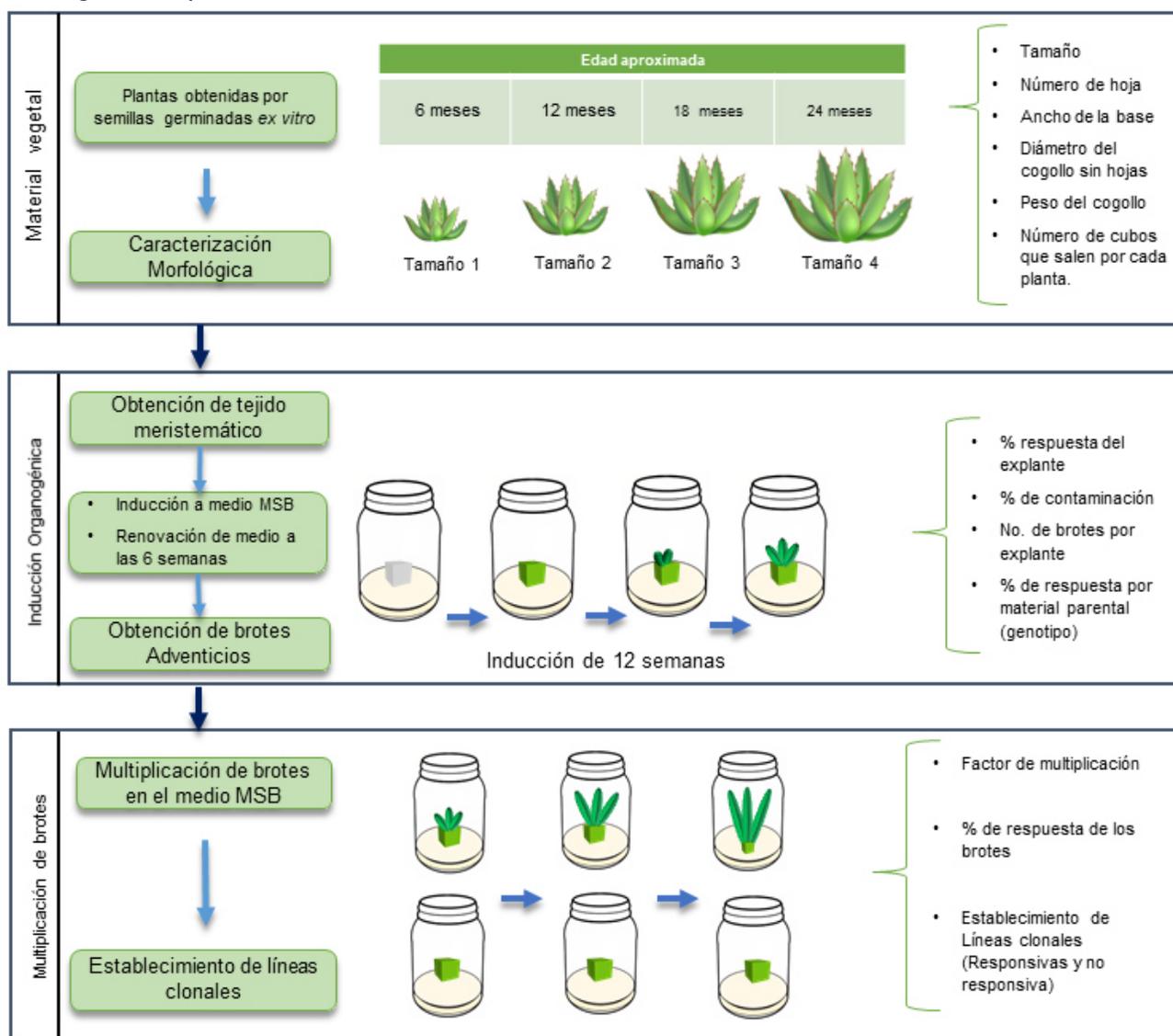
## Capítulo III. Metodología

### 3.1 Diagrama experimental

El proceso experimental consistió de tres etapas como se resume en la figura 6. En la primera etapa se realizó una caracterización morfológica de 4 edades juveniles de *A. cupreata*, seguido en la segunda etapa donde se realizó la obtención del tejido meristemático el cual se colocó en un medio de cultivo para la obtención de los brotes adventicios durante 12 semanas, en la tercera etapa los brotes obtenidos se multiplicaron hasta el 3er subcultivo.

**Figura 6**

*Diagrama experimental.*



## **3.2 Material Vegetal**

### **3.2.1 Caracterización morfológica del Material Vegetal**

Se utilizaron plantas de *A. cupreata* provenientes de un semillero ubicado en el municipio de Zitlala, Guerrero a 1675 m.s.n.m., entre las coordenadas 17° 38' 25" y 17° 54' 08" de latitud norte, y los 99° 05' 25" y 99° 16' 57" de longitud oeste. Las plantas fueron clasificadas de acuerdo con su edad aproximada (6, 12, 18 y 24 meses). Para cada edad, se tomaron un total de 25 plantas, procurando que estuvieran libres de daño mecánico o de algún microorganismo.

En la caracterización morfológica, para cada planta se realizaron las siguientes medidas: altura de la planta, número de hojas, ancho y largo de las cuatro hojas más jóvenes (cercanas a la hoja espada de la planta, la cual está localizada hacia la parte central), diámetro del cogollo (sin raíz) y peso del cogollo, adicionalmente se consideró el número de cubos obtenidos a partir del tejido meristemático por cada planta.

### **3.2.2 Obtención y desinfección del cogollo de plantas**

El proceso se llevó a cabo como lo describió Robert et al. 2006, con algunas modificaciones. Previo a la obtención del cogollo, las plantas fueron mantenidas en lugar fresco y libre de insectos. Para llevar a cabo el proceso, primero las plantas fueron separadas por edades como se observa en la figura 7-A, posteriormente se midió la altura de todas las plantas, y a continuación se procedió a retirar todas las hojas una por una desde la zona externa de la roseta de forma cuidadosa (evitando dañar la zona central), a las hojas cercanas a la hoja espada o central se les midió

el largo y ancho como referencia. Posteriormente se cortó la base de la planta, junto con las raíces y la punta de la hoja espada hasta obtener el cogollo, finalmente se pesó y midió el diámetro de este.

Una vez obtenido el cogollo, se procedió a lavarlo para eliminar el exceso de tierra y disminuir la carga microbiana. A continuación, se realizó un primer lavado con agua potable y un cepillo, este último fue utilizado para tallar de forma cuidadosa hasta eliminar toda la suciedad visible. Posteriormente se realizó una segunda lavada, para lo cual los cogollos fueron sumergieron en una solución de Extrán al 2% por tres veces (una vez durante 10 minutos y dos más por 5 minutos cómo se observa en la figura 7-B). Posteriormente se hicieron tres lavados con agua destilada y por último los cogollos fueron mantenidos en agua destilada hasta pasar a la campana de flujo laminar.

Dentro de la campana de flujo laminar como se puede observar en la figura 7-A, los cogollos se sacaron del agua destilada y fueron colocados en frascos estériles. A continuación, se les agregó una solución de hipoclorito de sodio al 40% y mantenidos allí por diferentes tiempos (15, 20 y 35 min) considerando su edad y talla, como se observa en el cuadro 2. Transcurrido el tiempo de inmersión en el cloro, se les retiró y se procedió a realizar tres enjuagues con agua destilada estéril, agitando manualmente durante aproximadamente un minuto en cada enjuague.

Posteriormente, el cogollo desinfectado se colocó en un nuevo frasco estéril conteniendo agua destilada estéril, en donde fue mantenidos hasta su posterior corte y obtención del tejido meristemático (Figura 8-A).

## Cuadro 2

*Tiempo de inmersión de los diferentes cogollos utilizados en NaClO comercial al 40% (v/v) para la obtención del tejido meristemático.*

Edad de la planta (meses)	Diámetro del cogollo (cm)	Peso del cogollo (g)	Tiempo de inmersión en min
6	0.6 - 1	0.5 - 2.3	15
12	1.5 - 1	3.2 - 7	20
18	1.5 - 2	5.9 - 12.5	20
24	2.5 - 4	21.1- 61.1	35

## Figura 7

*Preparación de material vegetal ex vitro.*



A. Caracterización morfológica B. Lavado y desinfección de los cogollos

## Figura 8

*Proceso de obtención e inducción del tejido meristemático.*



A. Lavado y desinfección de los cogollos en la cámara de flujo laminar B. Corte de hojas y tejido foliar para obtención del tejido meristemático.

### **3.3 Inducción Organogénica**

La inducción de la organogénesis se llevó a cabo mediante el protocolo reportado por Robert et al., 2006 con ligeras modificaciones, el cual se describe a continuación

#### **3.3.1 Inducción de los explantes**

Una vez desinfectado el cogollo y de manera aséptica, se procedió a realizar cortes con el bisturí para eliminar las hojas restantes, el tejido foliar y tejidos afectados por el cloro, así hasta obtener cubos de aproximadamente 1 cm<sup>3</sup>, procurando dejar solo el tejido meristemático del tallo (Fig. 8-B).

Posteriormente, los cubos se colocaron en frascos de vidrio (phytotechlab C1770) que contenían 20 mL de medio MSB, sales del medio MS (Murashige y Skoog, 1962) con nitrógeno reducido (10 mM KNO<sub>3</sub> y 5 mM NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>), adicionado con 0.113 µM de 2,4-D y 44µM de BA y 1.1% de agar (Sigma-Aldrich G1910), posteriormente el pH ajustado a 5.78, y finalmente los cubos fueron cultivados durante 12 semanas en condiciones de luz continua.

En la sexta semana de cultivo, el medio fue renovado y se cortaron partes del explante en donde había crecimiento de hoja, procurando solamente tener el tejido meristemático y los nuevos brotes.

#### **3.3.2 Evaluación de la inducción organogénica**

Durante las 12 semanas de inducción, se realizó semanalmente una evaluación visual de todos los explantes. Dentro de las evaluaciones se determinaron aspectos

como: explantes contaminados, explantes responsivos a la fase de inducción, número de brotes en crecimiento en los explantes y longitud de los brotes.

La contaminación es tomada en cuenta tanto de bacterias o de hongos. Se considera que un explante responde cuando en él se observa al menos un brote en crecimiento. El número de brotes es considerado de acuerdo al total de brotes producidos por meristemo cortado en cubos de cada planta madre. La longitud de los brotes se considera al tamaño de los brotes a partir de la base.

### **3.4 Multiplicación de brotes**

Finalizada la inducción, los brotes se colocaron en cajas Magenta (PTL-100™) con medio MSB, adicionado con 0.112  $\mu\text{M}$  de 2,4-D y 44  $\mu\text{M}$  de BA, 0.4 % de agar (Sigma-Aldrich G1910) y 0.4 % de Gelrite, con un pH ajustado a 5.78, y cultivado durante 12 semanas en condiciones de fotoperiodo. Cada 4 semanas se evaluó la cantidad de brotes multiplicados y después se renovó el medio, proceso que fue repetido hasta el tercer subcultivo.

### **3.5 Análisis estadístico**

Todos los datos obtenidos fueron analizados usando el software estadístico Minitab® 19. Los resultados son expresados como la media  $\pm$  desviación estándar (DE). La variable número de brotes se transformó a  $\log_{10}(x)$  para cumplir con los supuestos de normalidad de varianza y homogeneidad. El análisis de varianza (ANOVA) fue usado para determinar la significancia estadística y la comparación de medias fue de acuerdo a la prueba de Tukey a  $p \leq 0.05$ . Las gráficas fueron creadas usando el software de GraphPad Prism.

## Capítulo IV. Resultados

### 4.1 Caracterización morfológica del material vegetal

Previo a la inducción, se evaluaron diferentes parámetros (altura, número de hojas, largo y ancho de las hojas y el diámetro y peso del cogollo) para determinar la relación de las características morfológicas con respecto a la edad de las plantas madre consideradas en este estudio (6, 12, 18 y 24 meses). Los resultados mostraron de manera general un comportamiento proporcional muy marcado con el incremento de la edad en casi todos los parámetros analizados.

En este sentido, los análisis estadísticos mostraron diferencias significativas en cuanto a la altura, en donde las plantas de 6 meses fueron las que presentaron menor tamaño, con una altura promedio de  $9.77 \pm 1.04$  cm; seguidas de las plantas de 12 y 18 meses con una altura promedio de  $11.31 \pm 0.96$  y  $13.82 \pm 0.89$  cm respectivamente, mientras que las plantas de mayor edad (24 meses) fueron las que presentaron la mayor altura, con un promedio de  $24.84 \pm 3.26$  cm (Fig. 9-A y Fig. 10 A-D).

En el parámetro de número de hojas, los resultados mostraron un comportamiento muy similar a la altura, ya que el menor número las obtuvieron las plantas de 6 meses de edad, las cuales presentaron un promedio de  $5.15 \pm 0.83$  hojas por planta, y el mayor número se presentó en las plantas de 24 meses, con un promedio de  $19.04 \pm 3.4$  de hojas por planta (Fig. 9-B y Fig. 10-A, D). En el caso de las plantas de 12 y 18 meses los análisis estadísticos también mostraron diferencias significativas a pesar de tener promedios muy cercanos de  $12.15 \pm 1.38$  y  $13.88 \pm 1.81$  respectivamente (Fig. 9-B y Fig. 10-B, C).

Para los parámetros morfológicos del largo y ancho de las hojas, los resultados mostraron que solo las plantas de 24 meses presentaron diferencias significativas en cuanto a largo ( $21.44 \pm 4.65$  cm), mientras que las plantas de 6, 12, y 18 meses fueron muy similares, con promedios de  $7.72 \pm 1.66$ ,  $10.72 \pm 1.27$  y  $9.11 \pm 1.32$  cm respectivamente (Fig. 9-C), sin observar diferencias significativas entre ellas. Sin embargo, en cuanto al ancho de la hoja los análisis estadísticos si revelaron diferencias significativas en todas las edades analizadas, con una tendencia muy similar a la observada en la altura y número de hojas, las cuales incrementaron con respecto de la edad, siendo las plantas de 24 meses las que presentaron el mayor ancho de la hoja ( $8.56 \pm 0.58$  cm en promedio), mientras que las hojas con menor anchura las presentaron las plantas de 6 meses de edad ( $2.68 \pm 0.57$  cm en promedio), para las hojas de las plantas de 18 y 12 meses de edad, se observó un ancho de  $5.72 \pm 0.62$  y  $4.80 \pm 0.38$  cm respectivamente (Fig. 9-D y Fig. 10-E-F).

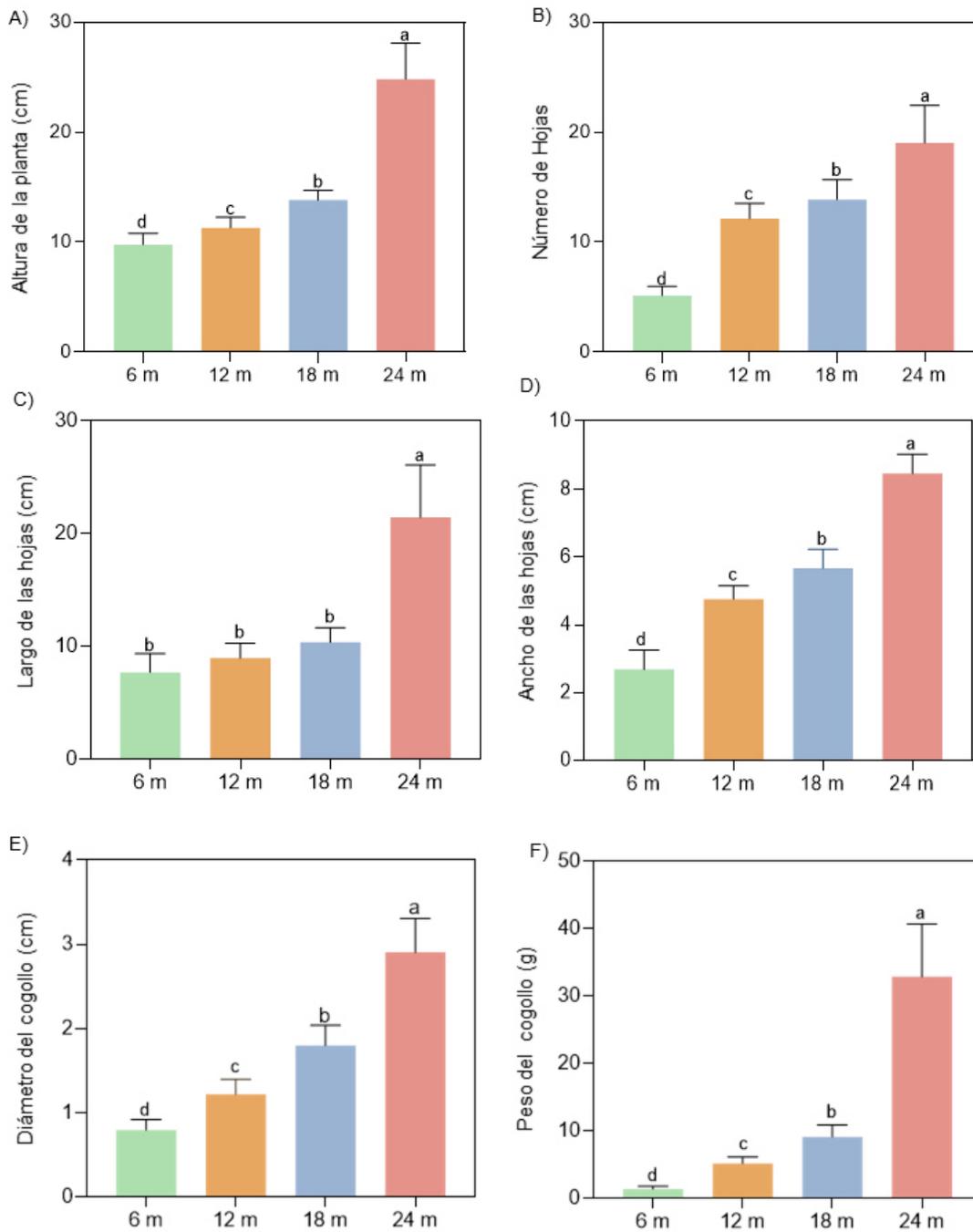
En el caso del diámetro del cogollo, los análisis de los datos demostraron que el menor diámetro correspondió a la edad de 6 meses con una medida promedio de  $0.80 \pm 0.12$  cm ( $p=0.05$ ), seguida de las plantas de 12 meses con un diámetro promedio de  $1.22 \pm 0.18$  cm ( $p=0.05$ ), en el caso de las plantas con la edad de 18 meses obtuvieron un diámetro promedio de  $1.80 \pm 0.24$  cm, mientras que para las plantas de 24 meses se obtuvo un promedio de  $2.90 \pm 0.40$  cm ( $p=0.05$ ) (Fig. 10-C).

En cuanto al peso del cogollo, se observaron también diferencias significativas en todas las edades analizadas ( $p=0.005$ ), encontrando que el peso más bajo correspondió a las plantas de 6 meses, con un promedio del peso de  $1.40 \pm 0.41$  g, a diferencia del peso de las plantas de 24 meses, en las cuales se obtuvo un

promedio de  $32.87 \pm 7.86$  g. El peso del cogollo de las edades de 12 y 18 meses resultó con un promedio de  $6.18 \pm 1$  g y  $9.13 \pm 1.75$  g respectivamente (Fig. 10-E).

**Figura 9**

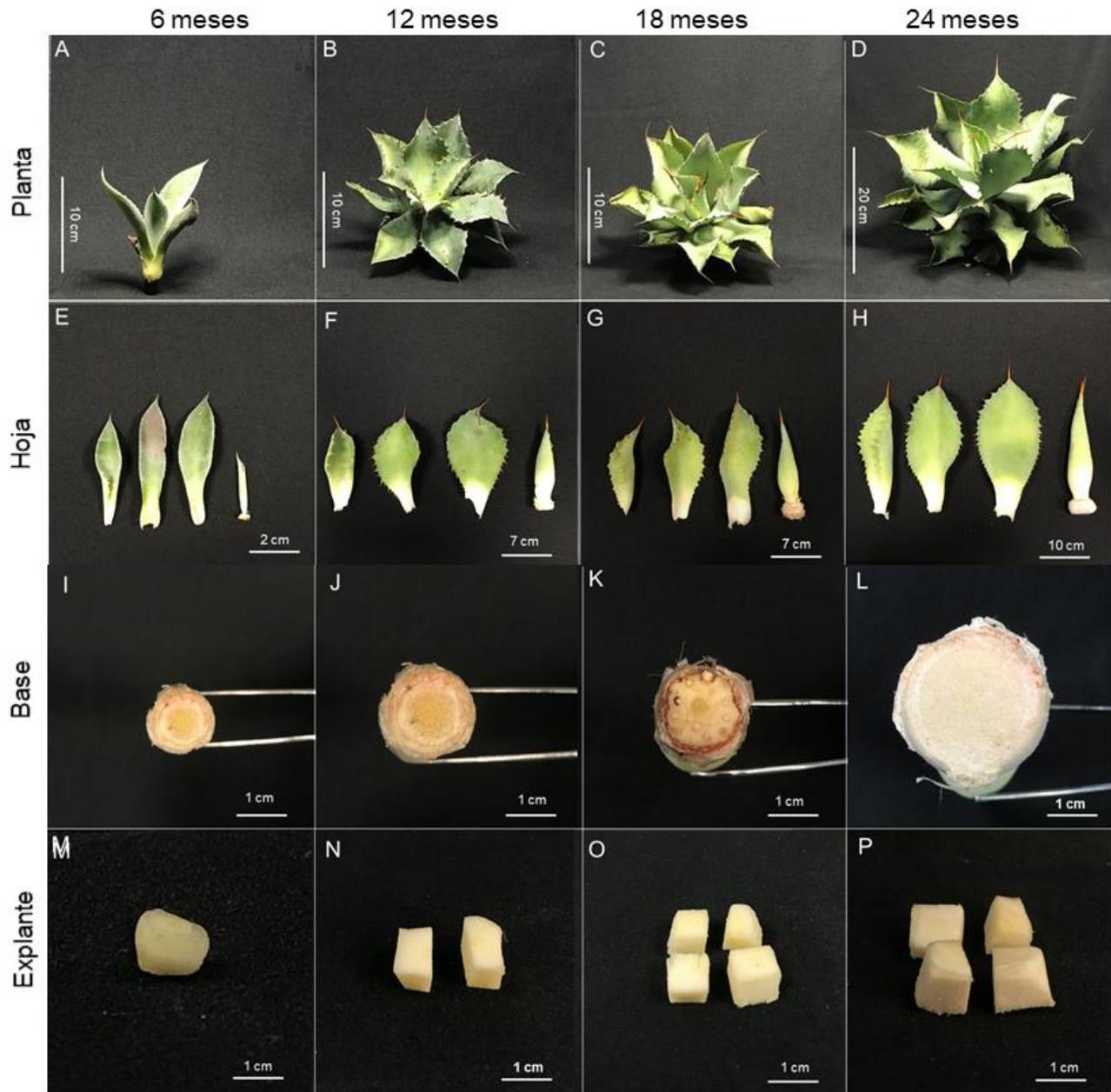
*Caracterización morfológica de plantas juveniles de 4 edades diferentes de Agave cupreata.*



A) Altura de la planta; B) Número de hojas; C) Largo de las hojas; D) Ancho de las hojas); E) Diámetro del cogollo; F) Peso del cogollo. Se presentan los promedios para cada parámetro evaluado con desviación estándar de cada edad analizada. Las letras arriba de las barras indican diferencias significativas  $p=0.05$  según la prueba de Tukey, las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

## Figura 10

Caracterización morfológica de plantas juveniles de *Agave cupreata*.



A-D) Fotografías representativas mostrando el tamaño de las plantas seleccionadas para cada edad. E-H) Hoja espada y hojas de la roseta. I-L) Base de la planta (cogollo) sin raíz. M-P) Cubos de tejido meristemático (explante) obtenidos por cada edad de la planta

## **4.2 Influencia de la edad y el genotipo en la fase de inducción organogénica de *A. cupreata***

Para analizar el efecto de la relación edad – genotipo en la capacidad organogénica se evaluó el porcentaje de contaminación, el porcentaje de respuesta, el número de brotes producidos y la longitud de los mismos, en los explantes de plantas juveniles de diferentes edades (6, 12, 18 y 24 meses). Además, se realizó una clasificación de 5 categorías en relación a la capacidad organogénica con respecto a la cantidad de brotes generados por cada planta madre agrupadas por edades. Los resultados obtenidos en la respuesta de la inducción de los explantes con respecto a la edad mostraron diferencias significativas al realizar los análisis estadísticos.

En cuanto a la contaminación se observó que los explantes obtenidos a partir de plantas de 24 meses presentaron el mayor porcentaje de contaminación de los cultivos (60%), en donde solamente el 40% sobrevivió a la contaminación microbiana (Cuadro 3). Los explantes con menor contaminación fueron aquellos provenientes de plantas de 6 meses de edad con un 20% (Cuadro 3). En general, observamos que la contaminación de los explantes está relacionada con el tamaño y la edad de la planta madre, siendo los explantes obtenidos de plantas de menor tamaño y edad, las que presentaron menos contaminación en comparación con los explantes obtenidos de las plantas de mayor edad (Cuadro 3), las cuales al tener un mayor tamaño y número de hojas resguardaban más cantidad de tierra entre el tallo y las hojas, por lo que posiblemente a pesar de lavar y tallar de manera cuidadosa los tejidos, no fue posible eliminar por completo la carga microbiana

presente. Cabe recalcar que la mayor parte de la contaminación observada fue de tipo bacteriana.

En cuanto al porcentaje de respuesta del explante a la inducción organogénica, se observó que las cuatro edades evaluadas presentaron porcentajes altos de respuesta, en un rango del 80 al 93%, siendo los explantes provenientes de las plantas de mayor edad (24 meses) los que presentaron el porcentaje más bajo de respuesta (80%), mientras que el porcentaje más alto (93.33%) se presentó en los explantes de planta de 18 meses de edad (Cuadro 3), muy cercano al encontrado en los explantes provenientes de plantas de 6 meses (90%). Finalmente, en los explantes de plantas de 12 meses se encontró un porcentaje de respuesta del 88.24% (Cuadro 3).

Por otra parte, en cuanto a la producción de brotes, los análisis estadísticos mostraron que las edades con mayor producción se presentaron en los explantes de 12 y 24 meses, con un promedio de  $86.50 \pm 0.90$  y  $85.75 \pm 0.98$  respectivamente, muy similar entre ambas, sin observar diferencias significativas (Cuadro 3); , seguido de la edad de 18 meses ( $63 \pm 0.92$ ) ( $p=0.05$ ). En el caso de las plantas de 6 meses de edad, estas fueron las que presentaron la producción más baja con un promedio de  $33.27 \pm 1.05$  ( $p=0.05$ ) brotes por planta madre (Cuadro 3).

En los resultados de la evaluación del parámetro de longitud de brotes a las 12 semanas de inducción, encontramos que las plantas con las edades de 12 y 18 meses obtuvieron una longitud promedio similar entre ellas de  $0.74 \pm 1.05$  y  $0.73 \pm 1.30$  respectivamente, en este caso los análisis estadísticos no mostraron diferencias significativas entre ellas (cuadro 3), este mismo comportamiento fue observado en la longitud de los brotes de las plantas de 6 y 24 meses de edad, las

cuales también fueron muy semejantes entre ellas, en las cuales encontramos una longitud de brotes de  $0.33\pm 1.11$  ( $p=0.05$ ) en los explantes de plantas de 6 meses de edad y  $0.38\pm 0.99$  ( $p=0.05$ ) en los explantes de plantas de 24 meses de edad.

Para analizar más detalladamente la relación edad – genotipo, se consideró cada planta madre como un genotipo, todas las plantas se agruparon por edades y se clasificaron según su capacidad morfogénica, como se puede observar en la figura 13. La clasificación se planteó de la siguiente manera: una nula producción para los genotipos que contenían 0 brotes por planta madre, una baja producción para aquellos que contenían de 1 – 33 brotes, una producción media si producían de 34 – 66 brotes, una producción alta si generaban de 67 – 100 brotes y una super alta producción de brotes para aquellos genotipos con una producción mayor a 100 brotes por planta madre (Figura 11).

En este sentido, se observó que el 60% de los genotipos de plantas de 6 meses de edad obtuvieron en su mayoría una baja producción de brotes (Fig.11-A y Fig. 12-A) y solamente el 5% de los genotipos produjeron más 101 brotes por planta madre, es decir, una producción super alta (Fig. 11-A). En cuanto a los genotipos de 12 meses, estos obtuvieron la mejor respuesta de todas las edades analizadas (Fig.11-B y Fig. 12. B), en donde el 29.41% y 23.52% de los genotipos fueron alta y super altamente productivos en brotes, sin embargo, un porcentaje considerable del 17.65% obtuvieron una nula producción de brotes. El 26.66% de los genotipos de 18 meses de edad presentaron una baja producción de brotes, siendo este el porcentaje más alto dentro de esta edad (Fig.11-C y Fig. 12-C. C), seguido de un 26.66% de los genotipos con una producción media de brotes y solo un 13.37% de los genotipos con una producción super alta (Fig. 11-C y Fig. 12-C. Los genotipos

de 24 meses, que fueron los de mayor edad (Fig.11-D y Fig. 12-D), tuvieron un 30% de alta producción de brotes, 30% de una baja producción, 20% una nula producción y el 20% restante presentó una producción media de brotes.

### Cuadro 3

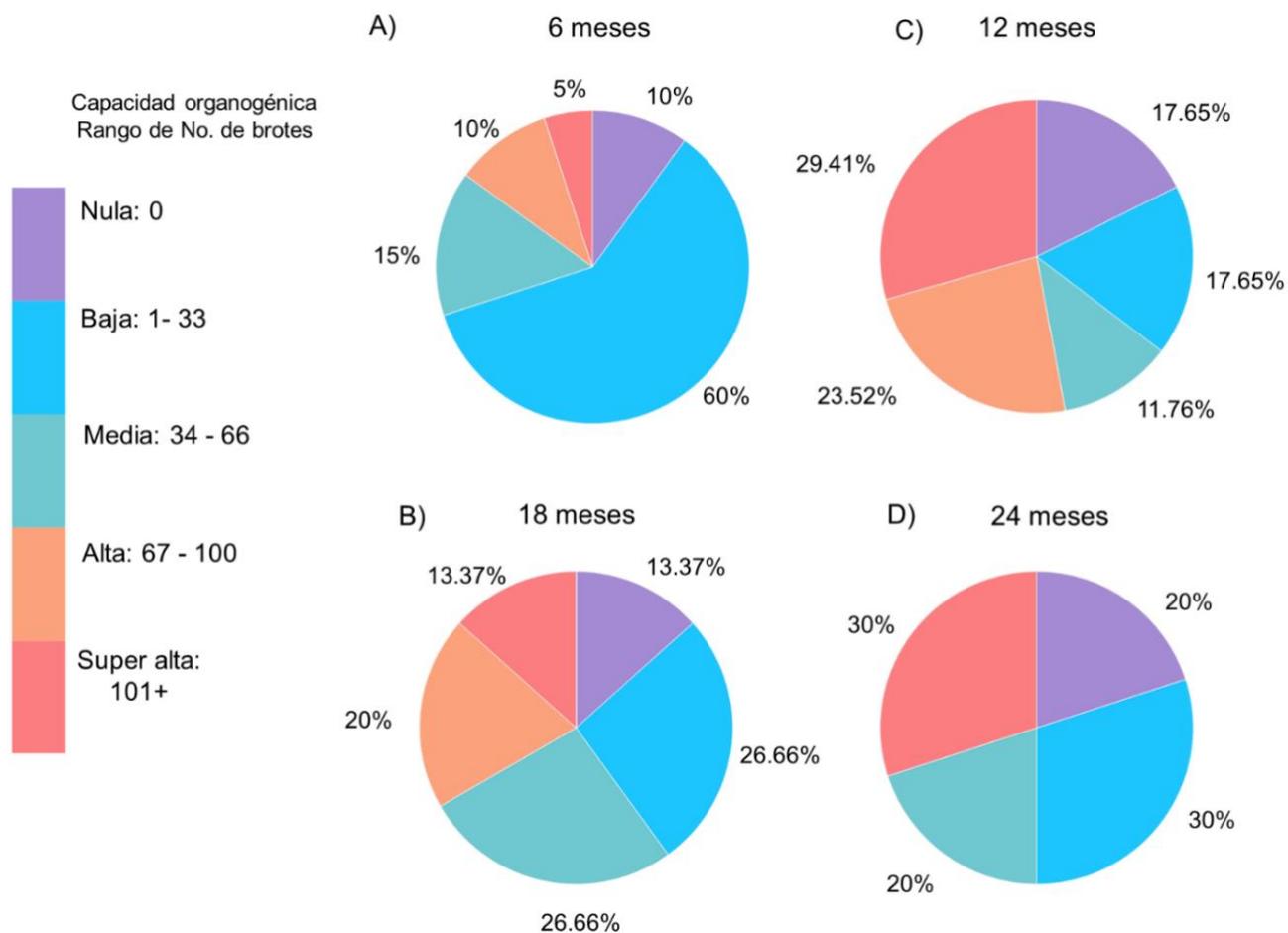
*Resultado de la inducción organogénica directa de 4 diferentes edades de Agave cupreata a las 12 semanas*

Tamaño	Edad del material vegetal (meses)	% contaminación	% respuesta	No. de brotes por planta madre $\pm$ DE (dato transformado)	Longitud de los brotes en (cm)
				Media $\pm$ SD	Media $\pm$ SD
T1	6	20	90%	33.27 $\pm$ 1.05b (3.05)	0.33 $\pm$ 1.11b
T2	12	36	88.24%	86.50 $\pm$ 0.90a (4.18)	0.74 $\pm$ 1.05a
T3	18	40	93.33%	63 $\pm$ 0.92ab (3.85)	0.73 $\pm$ 1.30a
T4	24	60	80%	85.75 $\pm$ 0.98ab (4.03)	0.38 $\pm$ 0.99b

Las medias en cada columna seguidas de las mismas letras no son significativamente diferentes según la prueba de Tukey ( $p = 0.05$ ).

**Figura 11**

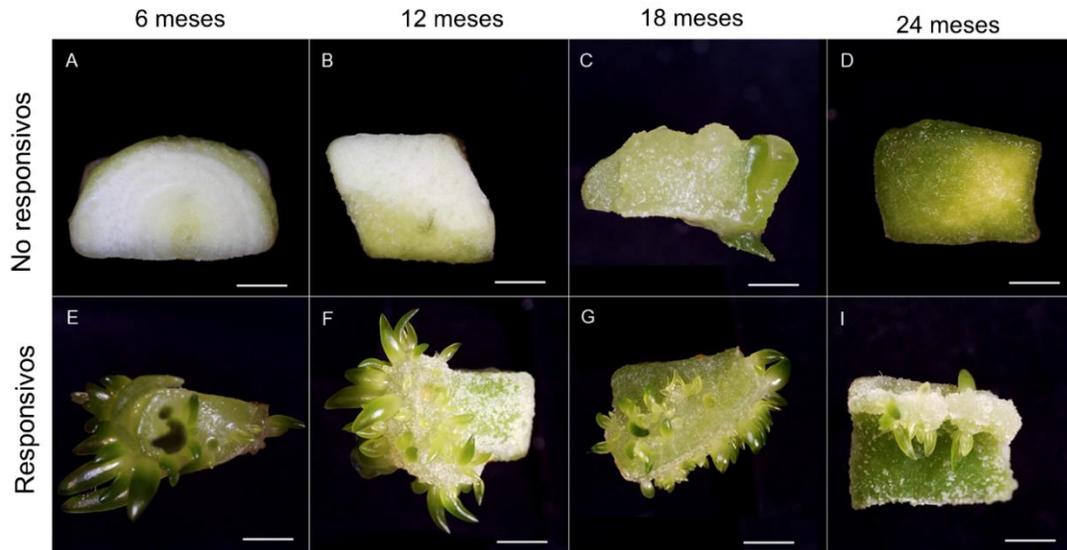
Porcentajes de respuesta de acuerdo a la clasificación de la capacidad morfogénica de los genotipos generados a partir de plantas de diferentes edades de *Agave cupreata*.



A) Genotipos de 6 meses de edad, B) Genotipos de 12 meses de edad, C) Genotipos de 18 meses de edad, D) Genotipos de 24 meses de edad.

### Figura 12

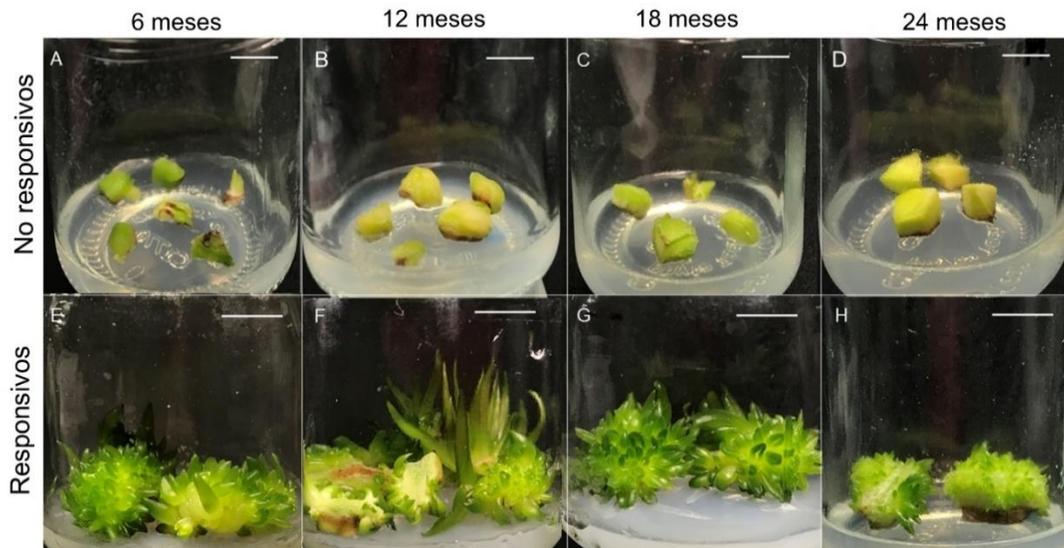
*Genotipos responsivos y no responsivo a las 6 semanas de inducción organogénica.*



A y E) Explantes provenientes de plantas diferentes de 6 meses, B y C) Explantes provenientes de plantas diferentes de 12 meses, C y G) Explantes provenientes de plantas diferentes de 18 meses, D e I) Explantes provenientes de plantas diferentes de 24 meses. La línea blanca indica una escala 0.25 cm.

### Figura 13

*Genotipos responsivos y no responsivo a las 12 semanas de inducción organogénica.*



A y E) Explantes provenientes de plantas diferentes de 6 meses, B y C) Explantes provenientes de plantas diferentes de 12 meses, C y G) Explantes provenientes de plantas diferentes de 18 meses, D e I) Explantes provenientes de plantas diferentes de 24 meses. La línea blanca indica una escala de 1 cm.

### **4.3 Influencia de la edad y el genotipo en la fase de multiplicación de *A. cupreata***

Para evaluar el efecto de la relación de la edad y el genotipo en la fase de multiplicación se analizó la producción de brotes totales por planta y el factor de multiplicación durante tres subcultivos. El comportamiento de la resiembra de los brotes es visible en la gráfica de la figura 14.

En el subcultivo 1, el número de brotes fue significativamente diferente entre los explantes de 6 y 12 meses de edad con  $76.75 \pm 3.8$  y  $231.8 \pm 5.03$  respectivamente, para los explantes de 18 meses de edad el promedio brotes por planta madre fue de  $146.33 \pm 4.30$  y en los de 24 meses de edad fue de  $173.3 \pm 4.91$  (Fig. 14).

Para el segundo subcultivo, el número de brotes por planta madre siguió siendo significativamente diferente entre los explantes de 6 y 12 meses de edad con  $133.3 \pm 4.48$  y  $344.8 \pm 5.51$  respectivamente, mientras que en los explantes de 18 y 24 meses de edad fueron similares con  $183.3 \pm 4.84$  y  $295.6 \pm 5.41$  respectivamente (Fig. 14).

Los resultados estadísticos mostraron que la mayor producción de brotes al final de la multiplicación (Subcultivo 3) se obtuvo para los subcultivos de plantas provenientes de 24 meses y 12 meses de edad con un promedio de  $576.60 \pm 1.01$  y  $525.56 \pm 0.97$  brotes por planta madre respectivamente (Fig. 14). En el caso de las plantas de 18 meses, el número final de brotes fue de  $443.13 \pm 0.96$ , mientras que el número de brotes de explantes provenientes de plantas de 6 meses de edad fue de  $234.89 \pm 1.01$ , siendo esta la cantidad promedio más baja (Fig. 14).

En la longitud de los brotes se encontró que los explantes provenientes de las plantas con las edades de 12 y 18 meses obtuvieron una longitud promedio similar entre ellas de  $0.74 \pm 0.5$  y  $0.73 \pm 1.30$  al inicio de la multiplicación, y de  $2.75 \pm 0.25$  y  $2.77 \pm 0.25$  al final de multiplicación, respectivamente (Cuadro 4), de manera similar se encontró que la longitud de los brotes de explantes de plantas de 6 y 24 meses de edad también obtuvieron longitudes similares entre ellas al inicio de  $0.33 \pm 1.1$  (6 meses) y  $0.38 \pm 0.99$  (24 meses) y al final de la multiplicación  $1.93 \pm 0.37$  (6 meses) y  $2.03 \pm 0.57$  (24 meses) (Cuadro 4).

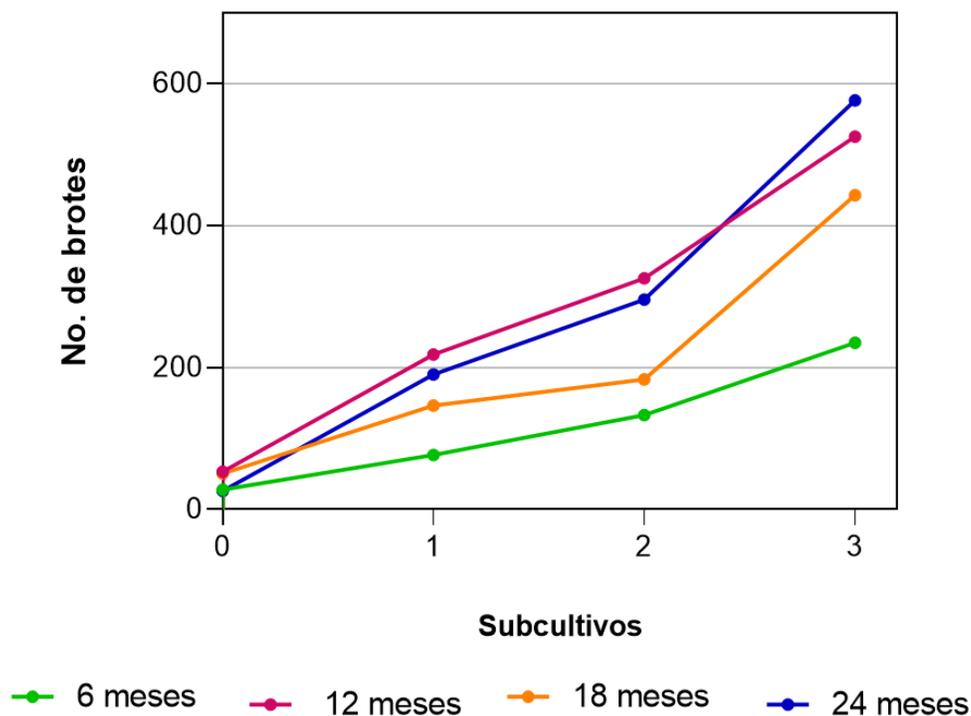
El factor de multiplicación por cada edad durante los 3 subcultivos tuvo un comportamiento similar en los primeros dos subcultivos, sin observar diferencias significativas entre ellas de acuerdo con los análisis estadísticos (Cuadro 4). En el primer subcultivo (Figura 15), el factor de multiplicación en los explantes de plantas 6 meses de edad fue  $2.33 \pm 1.44$ , seguido de la edad 12 meses con un factor de  $2.76 \pm 2.03$ , mientras que en la edad de 24 meses se encontró el factor de  $3.05 \pm 2.86$  y de los explantes de 18 meses un factor de  $3.18 \pm 3.73$  (Cuadro 4).

En el segundo subcultivo (Figura 16), los factores de multiplicación se encontraron en un rango de 1.54 a 2.33, siendo similares entre ellos (sin diferencias significativas), pero observándose un decrecimiento de los valores, si comparamos el primer subcultivo con respecto al segundo subcultivo. El factor que se observó en los explantes de plantas con 18 meses fue de  $1.54 \pm 1.22$ , mientras que los explantes provenientes de plantas de 6 meses de edad se encontró un factor más alto de  $2.33 \pm 1.74$ , el cual se mantuvo con respecto del primer subcultivo. Para las edades de 12 y 18 meses los factores tuvieron valores de  $1.84 \pm 0.84$  y  $1.54 \pm 1.22$  respectivamente. Para el tercer subcultivo (Figura 17), los valores del factor de

multiplicación se mantuvieron cercanos a los encontrados en el segundo subcultivo, con un rango de 1.54 a 2.65, exceptuando que el factor de multiplicación para los explantes de 6 meses de edad fue significativamente diferente en comparación a las demás edades analizadas, teniendo un factor de  $1.77 \pm 0.72$ . El factor de multiplicación aumento para explantes de plantas con 18 meses de edad del segundo al tercer subcultivo, teniendo un valor de  $2.65 \pm 1.27$ . Para las edades de 12 y 24 meses se encontraron factores de multiplicación de  $1.54 \pm 0.47$  y  $1.92 \pm 0.63$  respectivamente.

#### Figura 14

*Número de brotes por subcultivos obtenidos a partir de explantes provenientes de plantas de 4 edades diferentes en A. cupreata.*



#### Cuadro 4

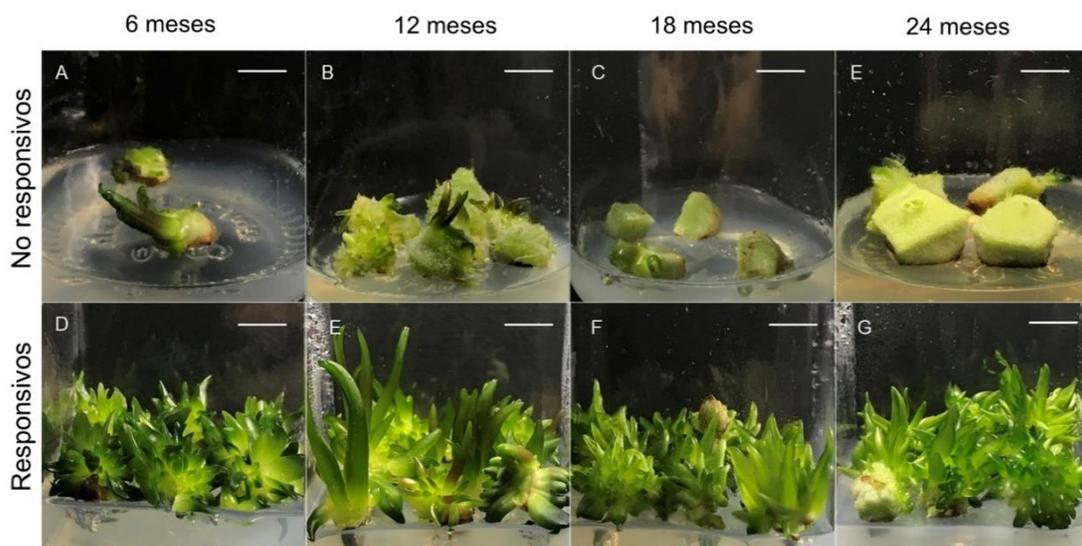
*Efecto de la multiplicación de brotes en clonas provenientes de plantas de 4 diferentes edades en Agave cupreata.*

Tamaño	Edad del material vegetal (meses)	Factor de multiplicación Subcultivo 1	Factor de multiplicación Subcultivo 2	Factor de multiplicación Subcultivo 3	Longitud inicial de los brotes (cm) en la multiplicación	Longitud final de los brotes(cm) en la multiplicación
		Media±SD	Media±SD	Media±SD	Media±SD	Media±SD
T1	6	2.33±1.44a	2.33±1.74a	1.77±0.72b	0.33±1.11b	1.93±0.37b
T2	12	2.76±2.03a	1.84±0.84a	1.54±0.47b	0.74±1.05a	2.75±0.25a
T3	18	3.18±3.73a	1.54±1.22a	2.65±1.27a	0.73±1.30a	2.77±0.25a
T4	24	3.05±2.86a	1.90±0.59a	1.92±0.63ab	0.38±0.99b	2.03±0.57b

Las medias en cada columna seguidas de las mismas letras no son significativamente diferentes según la prueba de Tukey en ( $p = 0.05$ ).

#### Figura 15

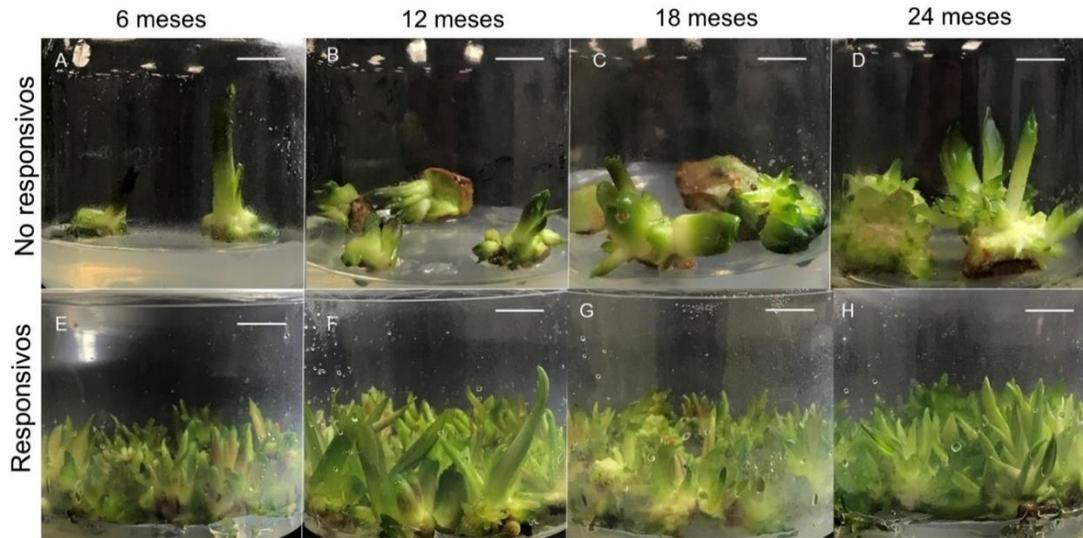
*Genotipos responsivos y no responsivo durante el primer mes de multiplicación (subcultivo 1).*



A y E) Explantes provenientes de plantas diferentes de 6 meses, B y C) Explantes provenientes de plantas diferentes de 12 meses, C y G) Explantes provenientes de plantas diferentes de 18 meses, D e I) Explantes provenientes de plantas diferentes de 24 meses. La línea blanca indica una escala de 1 cm.

## Figura 16

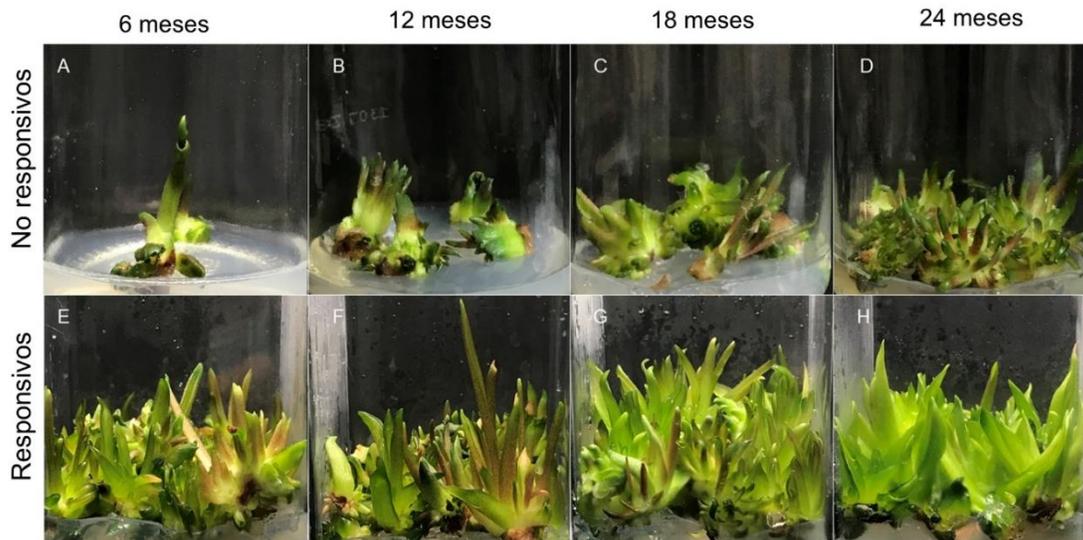
*Genotipos responsivos y no responsivo al segundo mes de multiplicación (subcultivo 2).*



A y E) Explantes provenientes de plantas diferentes de 6 meses, B y C) Explantes provenientes de plantas diferentes de 12 meses, C y G) Explantes provenientes de plantas diferentes de 18 meses, D e I) Explantes provenientes de plantas diferentes de 24 meses. La línea blanca indica una escala de 1 cm.

## Figura 17

*Genotipos responsivos y no responsivo al tercer mes de multiplicación (subcultivo 3).*



A y E) Explantes provenientes de plantas diferentes de 6 meses, B y C) Explantes provenientes de plantas diferentes de 12 meses, C y G) Explantes provenientes de plantas diferentes de 18 meses, D e I) Explantes provenientes de plantas diferentes de 24 meses. La línea blanca indica una escala de 1 cm.

## Capítulo V. Discusión

La organogénesis es la capacidad que tienen las células vegetales del explante, para reprogramar su desarrollo hacia la formación de tejidos y órganos *novo* que constituyen una planta (George et al., 2008). Cuando un tejido recibe diferentes estímulos estos pueden llegar a provocar la reversibilidad de las células, lo que implica la activación de respuestas de un subconjunto de células que posiblemente puedan poseer cierto potencial organogénico (Bidabadi y Mohan Jain, 2020; Ikeuchi et al., 2016, 2019).

Este proceso suele dividirse en tres fases: adquisición de competencia, inducción y determinación. Es durante la adquisición de competencia, donde el tejido desarrolla características para responder a la fase de inducción y posteriormente se dé la formación de los brotes (Pinto et al., 2017).

En el presente trabajo analizamos la influencia de la edad y el genotipo en la inducción organogénica directa, tomando como explantes tejido meristemático proveniente de plantas de *Agave cupreata* con 6, 12, 18 y 24 meses de edad.

Previamente, antes de realizar la inducción se llevó a cabo una caracterización morfológica de las plantas, para determinar si estas características variaban con respecto a la edad. En este sentido se observó que todos los parámetros evaluados (altura, número de hojas, etc.) se comportaron de forma proporcional con la edad de la planta.

Nuestros resultados concuerdan con lo reportado por Muñoz Flores et al., (2014) en esta misma especie; estos autores seleccionaron plantas adultas de *Agave cupreata* con diferentes edades (8, 9 y 10 años), y evaluaron características fenotípicas como vigor, altura de planta y diámetro de área foliar. Ellos encontraron que la altura de las plantas se comportó de manera proporcional con respecto a las edades evaluadas, en donde las plantas de menor edad (8 años) presentaron el menor rango de altura de 1.21 - 1.41 m, seguido de las plantas de 9 años con un rango de 1.29 - 1.41 m, y finalmente las plantas de 10 años, las cuales presentaron el mayor rango de altura que iba de 1.39 - 1.4 m, un comportamiento muy similar al observado en este trabajo.

En *Agave fourcroydes* Lem se realizó una evaluación morfológica de sus hijuelos, observando que el número de hojas aumentó conforme aumentaba la altura (talla) de las plantas, sin embargo, parámetros como el ancho de la base y el diámetro del cogollo presentaron variaciones entre las tallas evaluadas (Gómez Pérez, 2014), contrario a lo observado en este trabajo, en donde todos los parámetros evaluados se incrementaban conforme aumentaba la edad de las plantas analizadas.

El desarrollo de la organogénesis se puede ver afectada por aspectos intrínsecos del material vegetal. La edad y el genotipo de la planta madre son dos de los factores principales que afecta la respuesta morfogénica de los explantes (Becerra et al., 2004; Levitus et al., 2010). Varios estudios mencionan que existe una mejor respuesta para los explantes provenientes de plantas juveniles (George et al., 2008; Hoque y Mansfield, 2004; Prakash y Gurumurthi, 2010).

En la inducción organogénica de *Agave cupreata* encontramos una muy marcada respuesta genotipo-dependiente en las edades evaluadas (6, 12, 18 y 24 meses), ya que a pesar de que fueron cultivadas en el mismo medio de cultivo (con 0.113  $\mu\text{M}$  de 2,4-D y 44 $\mu\text{M}$  de BA) y bajo las mismas condiciones, cada genotipo respondió de manera diferentes en cuanto a la producción de brotes. Se presentó un marcado efecto del genotipo en las plantas con edad de 24 meses pues se observaron porcentajes considerables de baja y super alta producción de brotes dentro de la misma edad.

En este sentido, se ha reportado un efecto del genotipo en dos líneas celulares de *Pinus thunbergii*, encontrando que una línea celular presentaba una mayor producción de embriones somáticos a pesar de ser cultivadas bajo las mismas condiciones, confirmando cada genotipo responde diferencialmente y que no todos presentan el mismo potencial para producir embriones somáticos de alto rendimiento, por lo que es necesario realizar este tipo de estudios para garantizar el desarrollo de protocolos efectivos en la micropropagación de las especies (T. Sun et al., 2021).

El genotipo impone una de las mayores limitaciones al cultivo de tejidos y la micropropagación en la gran mayoría de plantas, ya que este influye directa o indirectamente en la capacidad de la respuesta hormonal de las células somáticas, la reversibilidad de las células diferenciadas para adquirir competencia organogénica, la división celular de las células y desarrollo de nuevos brotes a partir de las células recién divididas (Trujillo-Moya et al., 2011).

Varios estudios han mostrado que aspectos moleculares involucrados con el ADN y relacionados con la edad de las plantas, pueden explicar por qué existe una disminución del potencial morfogénico en tejidos de mayor edad (Monja-Mio et al., 2018; R. Z. Sun et al., 2020).

Concretamente, un aspecto de origen epigenético es la metilación de las bases de citosina en el ADN (Lee & Seo, 2018; Shemer et al., 2015), en donde se ha observado que el estado de metilación del ADN genómico puede variar entre las etapas de la planta juvenil y madura (Mira et al., 2020), influyendo de manera importante en el silenciamiento y regulación génica, afectando la orientación de la diferenciación y el control de la potencia del desarrollo en la regeneración del explante (Mira et al., 2020; Monja-Mio et al., 2018; Shemer et al., 2015). Es posible que, en este trabajo, el estado de metilación del ADN de alguna manera este regulando o silenciados genes que podrían estar relacionados con el potencial de desarrollo y la capacidad organogénica en *A. cupreata*. Sin embargo, hace falta realizar estudios a este nivel para poder entender a detalle este proceso en esta especie en particular.

Además, en este trabajo también observamos que la mayor producción de brotes adventicios se presentó en los explantes provenientes de plantas con 12 meses, con una super alta y alta producción, considerando a esta edad como la más óptima para la producción de brotes en la etapa de inducción. Mientras que, la menor producción de brotes se dio en los explantes de plantas de 6 meses.

Contrario a nuestro trabajo, ya que generalmente se espera una mayor producción mientras más baja sea la edad del tejido o la planta; Becerra et al.,

(2004) evaluaron la respuesta en la producción de brotes en *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*, utilizando tres diferentes fuentes de explante: cultivadas *in vitro*, plantas juveniles cultivadas *ex vitro* (1, 2, 3, 4, 5 y 6 meses edad) y plantas adultas revitalizadas. Ellos encontraron que, la mejor respuesta se presentó en las plantas juveniles cultivadas *ex vitro*, con una mayor producción de brotes. Además, observaron una menor capacidad morfogénica a medida que aumentaba la edad de la planta donante, siendo los primeros 2 meses de edad los más adecuados para la proliferación de brotes adventicios, en comparación con las demás edades.

En *Pinus glauca* la formación de brotes adventicios ocurrió con mayor facilidad a partir de explantes tomados de cotiledones de plántulas de 7-8 días de edad. Se observó una tasa más lenta de formación de brotes en cotiledones con edades menores y a los 8 días de edad la capacidad de los explantes para producir brotes disminuyó rápidamente (Toivonen y Kartha, 1988 citado en George et al., 2008).

Mohebodini et al., (2011) estudiaron la influencia de la relación edad – genotipo en la formación de brotes adventicios en explantes de cotiledón de lechuga (*Lactuca sativa* L.) de edades de 3 y 7 días de dos variedades (“Ahvaz” y “Yazd”), encontrando que la edad y el genotipo de los explantes no tuvo un efecto significativo en la regeneración directa de brotes en las dos variedades estudiadas, sugiriendo que las diferentes de respuestas de los genotipos pueda darse principalmente por la distribución espacial y temporal de las etapas fisiológicas y de desarrollo. En este trabajo, si encontramos efectos tanto del genotipo como la edad de los explantes seleccionados en *A. cupreata*, lo que pone nuevamente de manifiesto la relevancia de estos tipos de estudios para el desarrollo de protocolos

eficientes de micropropagación, ya que cada especie responde de manera diferente.

En las células de los explantes de tejidos jóvenes se puede presentar mayor sensibilidad debido a que aún se encuentran en proceso de división, existiendo una mayor probabilidad de que se pueda llevar a cabo la organogénesis, además de que grado de desarrollo de ciertos órganos dependen de la edad de la planta (George et al., 2008).

Aunque autores como Sun et al., (2021) consideran impreciso tomar únicamente la edad del tejido como factor influyente en la morfogénesis, ya que el grado de regeneración de los tejidos suele ser diferente entre los genotipos evaluados y no se considerada además la implicación genética del individuo.

Varios estudios sugieren que el potencial morfogénico de los explantes puede estar regulada por el estado de metilación del ADN, el cual a su vez es dependiente de la edad de la planta madre (Monja-Mio et al., 2018; Shemer et al., 2015; R.Z. Sun et al., 2020).

R. Z. Sun et.al., (2020), estudiaron la metilación del ADN dependiente de la edad en la regulación de la capacidad de regeneración en explantes de plántulas juveniles (1 mes de edad) y plantas maduras (2 meses de edad) de *Boea higrométrica* vía organogénesis directa. Se encontró que las plántulas juveniles se regeneraron mejor que las plantas maduras durante las primeras 2 semanas. Esto se relacionó con el estado de metilación del ADN de las hojas maduras, ya que el nivel y la frecuencia de metilación del ADN aumento notablemente durante el desarrollo de las hojas.

En este trabajo también reportamos que en la etapa de la multiplicación los factores de multiplicación en todas las edades tuvieron un comportamiento significativamente similar en los 3 subcultivos, los valores encontrados estuvieron en un rango de 1.54 a 3.05. Los explantes provenientes de plantas de 12 y 24 meses de edad obtuvieron los valores más altos de brotes al final de la multiplicación en comparación a los explantes provenientes de plantas 6 meses, similar a lo encontrado en la inducción.

Robert et al., (2006) considera que el factor de multiplicación depende principalmente de la concentración de reguladores de crecimiento y considera que los valores en las líneas clonales pueden ser tan bajo como 1.5× o tan alto como 8×. Hasta el momento no se tienen reportes de estudios sobre la influencia de la edad de la planta madre en la etapa de multiplicación de la micropropagación de agaves u otra planta.

Los resultados presentados aquí, muestran que el genotipo tiene una mayor influencia que la edad de las plantas en las etapas de inducción y multiplicación de los brotes, esto da lugar a buscar a formular nuevas preguntas, como por ejemplo "¿Qué aspectos moleculares hace que algunos genotipos se regeneran más fácilmente que otros dentro una misma especie?", "¿Qué se puede hacer para aumentar la capacidad de regeneración de los genotipos? ", y estas puedan ser respondidas en futuras investigaciones.

## Capítulo VI. Conclusiones

Los resultados obtenidos indican que el factor edad – genotipo influye en la capacidad organogénica de *A. cupreata*, concluyendo que:

- La caracterización morfológica en todos los parámetros evaluados presentó una tendencia a incrementar conforme aumentaba la edad de las plantas. Las plantas de mayor edad presentaron un mayor porcentaje de contaminación, en la etapa de inducción, esto debido a que tenían un mayor tamaño y número de hojas, por lo que resguardaban más cantidad de tierra entre el tallo y las hojas.
- En relación a la respuesta a la inducción todas las edades presentaron un porcentaje alto de respuesta (80-93 %) reflejando que en una edad juvenil del Maguey papalote los tejidos del meristemo tienen un alto grado de regeneración vía organogénesis directa.
- La edad con mayor producción de brotes se obtuvo en los explantes de 12 meses, así como la mayor longitud de los brotes al finalizar la inducción. Mientras que la menor producción de brotes se dio en los explantes de plantas de 6 meses. Aunque en ambas edades se encontraron genotipos con alta capacidad de regeneración del tejido, los explantes de plantas de 12 meses de edad su volumen era mayor comparado con las de 6 meses, siendo uno de los factores por lo que en esta edad los explantes respondieron mejor a la formación de brotes adventicios, a parte del genotipo.
- En la fase de multiplicación, la mayor producción de brotes hasta el tercer subcultivo se obtuvo para los subcultivos en las edades de 24 meses y 12 meses. El factor de multiplicación tuvo un comportamiento similar en los 3 subcultivos, pero los valores disminuyeron en el 2do y 3er subcultivo. Estos resultados son en parte dependientes de la concentración de reguladores de crecimiento.

- El genotipo puede influir directamente en la capacidad organogénica en *A. cupreata* imponiendo una de las mayores limitaciones al cultivo de tejidos y la micropropagación en consecuencia los procesos a los que están sujetos los tejidos vegetales cultivados *in vitro* están bajo un control genético primordial. Este efecto se vio marcado en las plantas con edad de 24 meses que fueron cultivadas en el mismo medio de cultivo (con 0.113  $\mu\text{M}$  de 2,4-D y 44 $\mu\text{M}$  de BA) y bajo las mismas condiciones, cada genotipo respondió de manera diferentes en cuanto a la producción de brotes.
- La selección de plantas madres con edades juveniles de *A. cupreata* puede ser viable para la micropropagación mediante organogénesis directa. En este estudio se considera que la mejor edad de las plantas madres es a los 12 meses, debido a que fue en esta edad en donde se encontraron los genotipos con más alta respuesta y en menor tiempo de crecimiento de la planta.

## Capítulo VII. Recomendaciones.

- Realizar la continuación del experimento a la fase de enraizamiento y adaptación *ex vitro* y evaluar la influencia de la edad y el genotipo en estas fases.
- Realizar estudios a nivel genético – moleculares que permitan encontrar una relación entre la variación de la respuesta a la inducción organogénica de los genotipos parentales estudiados.
- Estudiar el efecto de la expresión de genes en especies de *Agave* en los procesos de regeneración de plantas por medio de organogénesis directa y entre genotipos.

## Capítulo VIII. Bibliografía

- Abisaí Josué García-Mendoza. (2012). México, país de magueyes. *La jornada del campo*.
- Alvarez, J. M., Bueno, N., Cuesta, C., Feito, I., & Ordás, R. J. (2020). Hormonal and gene dynamics in de novo shoot meristem formation during adventitious caulogenesis in cotyledons of *Pinus pinea*. *Plant Cell Reports*, 39(4), 527–541. <https://doi.org/10.1007/s00299-020-02508-0>
- Andrade Rodríguez, M.; López Peralta, M. C.; González Hernández, V. A.; García Velázquez, A.; Peña Lomelí, A. (2005). Efecto del genotipo en la micropropagación de tomate de cáscara. *Revista de Chapingo Serie Horticultura*, 11, 31-37 Universidad.
- Barrientos-Rivera, G., Hernández-Castro, E., Sampedro-Rosas, M. L., & Segura-Pacheco, H. R. (2020). Conocimiento tradicional y academia: productores de maguey y mezcal de pequeña escala en las regiones Norte y Centro de Guerrero, México. *Sociedad y Ambiente*, 23, 1–28. <https://doi.org/10.31840/sya.vi23.2173>
- Becerra, D. C., Forero, A. P., & Góngora, G. A. (2004). Age and physiological condition of donor plants affect in vitro morphogenesis in leaf explants of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 79(1), 87–90. <https://doi.org/10.1023/B:TICU.0000049440.10767.29>
- Bidabadi, S. S., & Mohan Jain, S. (2020). Cellular, molecular, and physiological aspects of in vitro plant regeneration. *Plants*, 9(6), 10–13. <https://doi.org/10.3390/plants9060702>
- Cisne Contreras, J. D. (1988). *Introducción a la técnica de cultivo de tejidos vegetales*.
- CONABIO. (2006). Mezcales y diversidad. *Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad*.
- Deglène, L., Lesignes, P., Alibert, G., & Sarrafi, A. (1997). Genetic control of organogenesis in cotyledons of sunflower (*Helianthus annuus*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 48(2), 127–130. <https://doi.org/10.1023/A:1005803415142>
- Delegación SADER Guerrero. (2020). *Guerrero, y su tradicional bebida el Mezcal, Segundo Lugar en Producción*. <https://www.gob.mx/agricultura/guerrero/articulos/guerrero-y-su-tradicional-bebida-el-mezcal-segundo-lugar-en-produccion?idiom=es>

- Eguiarte, L. E., X. Aguirre, M. Rocha, C. Torres, A. S. A. V. (2003). Diversidad genética en dos especies mezcaleras. En *Informe final SNIB- CONABIO proyecto No. V038*. (Vol. 123, Número 1).
- Fehér, A. (2019). Callus, dedifferentiation, totipotency, somatic embryogenesis: What these terms mean in the era of molecular plant biology? *Frontiers in Plant Science*, 10(April), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00536>
- García Mendoza, A. J. (2007). Los agave de México. *Ciencias* 87, 14–23.
- George, E., Hall, M., & De Klerk, J. (2008). Plant Propagation by Tissue Culture. En *Plant Propagation by Tissue Culture*.
- Gómez Pérez, R. M. del C. (2014). Estudio de los materiales parentales empleados en el sistema de Micropropagación de *Agave fourcroydes* Lem. En *Centro de Investigación Científica de Yucatán*.
- Gonzalez, M. E., Hernández, M. M., & Mazorra, L. M. (2005). Influencia de la época del año en la respuesta in vitro del cafeto *Coffea canephora* P. Var. Robusta. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 7(1), 5–14.
- Gottdiener, E. S. (2008). *Génetica de Poblaciones silvestres y cultivadas de dos especies mezcaleras: Agave cupreata y Agave potatorum*.
- Hoque, M. E., & Mansfield, J. W. (2004). Effect of genotype and explant age on callus induction and subsequent plant regeneration from root-derived callus of Indica rice genotypes. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 78(3), 217–223. <https://doi.org/10.1023/B:TICU.0000025640.75168.2d>
- Ikeuchi, M., Favero, D. S., Sakamoto, Y., Iwase, A., Coleman, D., Rymen, B., & Sugimoto, K. (2019). Molecular Mechanisms of Plant Regeneration. *Annual Review of Plant Biology*, 70, 377–406. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050718-100434>
- Ikeuchi, M., Ogawa, Y., Iwase, A., & Sugimoto, K. (2016). Plant regeneration: Cellular origins and molecular mechanisms. *Development (Cambridge)*, 143(9), 1442–1451. <https://doi.org/10.1242/dev.134668>
- Illsley, C., Vega, E., Pisanty, I., Tlacotempa, A., García, P., Morales, P., Rivera, G., García, J., Jiménez, V., Castro, F., & Calzada, M. (2007). Maguey papalote: hacia el manejo campesino sustentable de un recurso colectivo en el trópico seco de Guerrero, México. *En lo ancestral hay futuro: del tequila, los mezcales y otros agaves*, 1(February 2021), 319–340.
- Lee, K., & Seo, P. J. (2018). Dynamic Epigenetic Changes during Plant Regeneration. *Trends in Plant Science*, 23(3), 235–247. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.11.009>

- Levitus, G., Echennique, V., Rubinstein, C., Hopp, E., & Mroginski. (2010). Biotecnología Y Mejoramiento Vegetal II. En *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II*.
- Li, W., Liu, H., Cheng, Z. J., Su, Y. H., Han, H. N., Zhang, Y., & Zhang, X. S. (2011). Dna methylation and histone modifications regulate de novo shoot regeneration in arabidopsis by modulating wuschel expression and auxin signaling. *PLoS Genetics*, 7(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002243>
- Martin, M. P., Peters, C. M., Palmer, M. I., & Illsley, C. (2011). Effect of habitat and grazing on the regeneration of wild *Agave cupreata* in Guerrero, Mexico. *Forest Ecology and Management*, 262(8), 1443–1451. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2011.06.045>
- Meneses, P. M. G. (2004). *Reproducción y germinación de Agave cupreata Trel. & Berger (Agavaceae) en la localidad de Ayahualco, Guerrero*.
- Mira, S., Pirredda, M., Martín-Sánchez, M., Marchessi, J. E., & Martín, C. (2020). DNA methylation and integrity in aged seeds and regenerated plants. *Seed Science Research*, 1, 1–9. <https://doi.org/10.1017/S0960258520000021>
- Miri, S. M., & Roughani, A. (2018). Factors Affecting Tissue Culture Success in Ornamental Crops: Genotype , Explant and Physical Environment. *2nd International & 3rd National Congress on Flower and Ornamental Plants, November, 18–22*.
- Mohebodini, M., Javaran, M. J., Mahboudi, F., & Alizadeh, H. (2011). Effects of genotype, explant age and growth regulators on callus induction and direct shoot regeneration of Lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Australian Journal of Crop Science*, 5(1), 92–95.
- Monja-Mio, K. M., Quiroz-Moreno, A., Herrera-Herrera, G., Montero-Muñoz, J. L., Sánchez-Teyer, F., & Robert, M. L. (2018). Analysis of Two Clonal Lines (Embryogenic and Non-Embryogenic) of *Agave fourcroydes* Using AFLP and MSAP. *American Journal of Plant Sciences*, 09(04), 745–762. <https://doi.org/10.4236/ajps.2018.94059>
- Moya, C. T. (2013). *Estudio de la capacidad organogénica en tomate y especies relacionadas: localización de QTLs implicados y estudio de la influencia del etileno*.
- Muñoz Flores, H. J., García Magaña, J., Coria Avalos, Víctor V. M.; Hernández Aguilar, H., Hernández Ramos, J. (2014). Mother plant selection of *Agave cupreata* Trel et Berg. in Axaxacualco, Guerrero, Mexico. *Foresta Veracruzana*, 16(1), 1–8.

- Nguyen, T. H. N., Winkelmann, T., & Debener, T. (2020). Genetic analysis of callus formation in a diversity panel of 96 rose genotypes. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 142(3), 505–517. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01875-6>
- Parson, J. R. (2018). Los agaves en la economía tradicional. En *La jornada del campo* (Vol. 53). <http://www.jornada.com.mx/2012/02/18/cam-economia.html>
- Pierce, B. A. (2006). *Genética, Un enfoque conceptual* (Editorial Médica Panamericana S.A (ed.); 2da ed.).
- Pinto, M. de S., Abeyratne, C. R., Benedito, V. A., & Peres, L. E. P. (2017). Genetic and physiological characterization of three natural allelic variations affecting the organogenic capacity in tomato (*Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 129(1), 89–103. <https://doi.org/10.1007/s11240-016-1159-2>
- Posada-pérez, L., Rodríguez, A., Kosky, R. G., Reyes, M., & Autor, T. (2009). Influencia de la época del año y el tipo de frasco en la embriogénesis somática en papaya var . Maradol rojo. *Bioteología Vegetal*, 9(1), 33–40.
- Prakash, M. G., & Gurumurthi, K. (2010). Effects of type of explant and age, plant growth regulators and medium strength on somatic embryogenesis and plant regeneration in *Eucalyptus camaldulensis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 100(1), 13–20. <https://doi.org/10.1007/s11240-009-9611-1>
- Prieto, H., & Jordan, M. (2005b). *Bioteología Vegetal ( texto básico bioteología en español )* (Número August 2014).
- Rescalvo-Morales, A., Monja-Mio, K. M., Herrera-Herrera, G., Robert, M. L., & Sánchez-Teyer, L. F. (2016). Analysis of telomere length during the organogenesis induction of *Agave fourcroydes* Lem and *Agave tequilana* Weber. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 127(1), 135–143. <https://doi.org/10.1007/s11240-016-1037-y>
- Robert, M. L., Herrera-Herrera, J. L., Castillo, E., Ojeda, G., & Herrera-Alamillo, M. A. (2006). An efficient method for the micropropagation of *Agave* species. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 318(1), 165–178. <https://doi.org/10.1385/1-59259-959-1:165>
- Roca, W. M. (2000). Introducción a la Bioteología Vegetal. *Actualización Profesional en Manejo de Recursos Naturales, Agricultura Sostenible y Pobreza Rural*. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(17\)33887-5](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)33887-5)

- Roca, W. M., & Ramírez, H. (2000). Introducción a la Biotecnología Vegetal. En *Centro para el Desarrollo Agropecuario y Forestal, Inc. (CEDAF)* (Vol. 18).
- Rosales, M. S. D., Jiménez, M. de la L. G., Gómez, C. R., Valles, C. Q., León, S. D. D. de, Ordaz, S. J. M., & Balch, E. P. M. (2008). El cultivo in vitro como herramienta para el aprovechamiento, mejoramiento y conservación de especies del género *Agave*. *Investigación y Ciencia*, 16(41), 53–62.
- Salazar Pineda, D. T. (2017). *Actividad antibacteriana y antiinflamatoria de extractos y fracciones de Agave cupreata*.
- Sang, Y. L., Cheng, Z. J., & Zhang, X. S. (2018). Plant stem cells and de novo organogenesis. *New Phytologist*, 218(4), 1334–1339. <https://doi.org/10.1111/nph.15106>
- Shemer, O., Landau, U., Candela, H., Zemach, A., & Eshed Williams, L. (2015). Competency for shoot regeneration from Arabidopsis root explants is regulated by DNA methylation. *Plant Science*, 238, 251–261. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.06.015>
- Sierra, J. M. G. (2009). *Análisis genético para la conservación de Agave cupreata Trel. & Berger (Agavaceae)*.
- Sugimoto, K., Temman, H., Kadokura, S., & Matsunaga, S. (2019). To regenerate or not to regenerate: factors that drive plant regeneration. *Current Opinion in Plant Biology*, 47, 138–150. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2018.12.002>
- Sultana, M., & Gangopadhyay, G. (2018). Early expression of WUSCHEL is a marker for in vitro shoot morphogenesis in tobacco and Beta palonga. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 134(2), 277–288. <https://doi.org/10.1007/s11240-018-1421-x>
- Sun, R. Z., Zuo, E. H., Qi, J. F., Liu, Y., Lin, C. T., & Deng, X. (2020). A role of age-dependent DNA methylation reprogramming in regulating the regeneration capacity of *Boea hygrometrica* leaves. *Functional and Integrative Genomics*, 20(1), 133–149. <https://doi.org/10.1007/s10142-019-00701-3>
- Sun, T., Wang, Y., Zhu, L., Liu, X., Wang, Q., & Ye, J. (2021). Evaluation of somatic embryo production during embryogenic tissue proliferation stage using morphology, maternal genotype, proliferation rate and tissue age of *Pinus thunbergii* Parl. *Journal of Forestry Research*, 0123456789. <https://doi.org/10.1007/s11676-021-01311-1>
- Thorpe, T. A. (2007). History of plant tissue culture. *Molecular Biotechnology*, 37(2), 169–180. <https://doi.org/10.1007/s12033-007-0031-3>

Trujillo-Moya, C., Gisbert, C., Vilanova, S., & Nuez, F. (2011). Localization of QTLs for in vitro plant regeneration in tomato. *BMC Plant Biology*, 11(October). <https://doi.org/10.1186/1471-2229-11-140>

Uc León, N. C. (2017). Caracterización de los productos obtenidos del proceso de pirólisis de residuos lignocelulósicos de agave y su uso como fuente de energía. En *Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.*

Valencia, M. G. (2004). *Análisis comparativo entre las diferentes metodologías de micropropagación de variedades de Clavel (Dianthus Caryophyllus L.)*.

## Capítulo VIII. Anexos

### ANOVA de un solo factor: Altura vs. Edad

#### Método

Hipótesis nula            Todas las medias son iguales  
Hipótesis alterna        No todas las medias son iguales  
Nivel de significancia    $\alpha = 0.05$

*Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.*

#### Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Edad	4	12 m; 18 m; 24 m; 6 m

#### Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC		Valor F	Valor p
		Ajuste.	MC Ajust.		
Edad	3	3616.0	1205.33	356.59	0.000
Error	99	334.6	3.38		
Total	102	3950.6			

#### Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
1.83851	91.53%	91.27%	90.84%

#### Medias

Edad	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
12 m	26	11.308	0.960	(10.592; 12.023)
18 m	25	13.820	0.888	(13.090; 14.550)
24 m	26	24.838	3.260	(24.123; 25.554)
6 m	26	9.773	1.039	(9.058; 10.489)

*Desv.Est. agrupada = 1.83851*

#### Comparaciones en parejas de Tukey

#### Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Edad	N	Media	Agrupación
24 m	26	24.838	A
18 m	25	13.820	B
12 m	26	11.308	C
6 m	26	9.773	D

*Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.*

## ANOVA de un solo factor: N° Hojas vs. Edad

### Método

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna	No todas las medias son iguales
Nivel de significancia	$\alpha = 0.05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

### Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Edad	4	12 m; 18 m; 24 m; 6 m

### Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Edad	3	24.323	8.10755	384.77	0.000
Error	99	2.086	0.02107		
Total	102	26.409			

### Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0.145159	92.10%	91.86%	91.45%

### Medias

Edad	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
12 m	26	2.4914	0.1157	(2.4349; 2.5479)
18 m	25	2.6223	0.1312	(2.5647; 2.6799)
24 m	26	2.9325	0.1678	(2.8760; 2.9889)
6 m	26	1.6272	0.1593	(1.5707; 1.6837)

Desv.Est. agrupada = 0.145159

### Comparaciones en parejas de Tukey

#### Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Edad	N	Media	Agrupación
24 m	26	2.9325	A
18 m	25	2.6223	B
12 m	26	2.4914	C
6 m	26	1.6272	D

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

## ANOVA de un solo factor: Ancho hoja vs. Edad

### Método

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna	No todas las medias son iguales
Nivel de significancia	$\alpha = 0.05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

### Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Edad	4	12 m; 18 m; 24 m; 6 m

### Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Edad	3	175.67	58.5561	216.33	0.000
Error	45	12.18	0.2707		
Total	48	187.85			

### Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0.520269	93.52%	93.08%	92.27%

### Medias

Edad	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
12 m	14	4.757	0.390	(4.477; 5.037)
18 m	15	5.667	0.556	(5.396; 5.937)
24 m	11	8.455	0.568	(8.139; 8.770)
6 m	9	2.681	0.575	(2.332; 3.030)

Desv.Est. agrupada = 0.520269

### Comparaciones en parejas de Tukey

#### Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Edad	N	Media	Agrupación
24 m	11	8.455	A
18 m	15	5.667	B
12 m	14	4.757	C
6 m	9	2.681	D

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

## ANOVA de un solo factor: Dia. cogollo vs. Edad

### Método

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna	No todas las medias son iguales
Nivel de significancia	$\alpha = 0.05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

### Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Edad	4	12 m; 18 m; 24 m; 6 m

### Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Edad	3	64.354	21.4513	319.51	0.000
Error	98	6.580	0.0671		
Total	101	70.933			

### Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0.259112	90.72%	90.44%	89.96%

### Medias

Edad	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
12 m	26	1.2192	0.1812	(1.1184; 1.3201)
18 m	25	1.8000	0.2398	(1.6972; 1.9028)
24 m	26	2.9038	0.4005	(2.8030; 3.0047)
6 m	25	0.7960	0.1241	(0.6932; 0.8988)

Desv.Est. agrupada = 0.259112

### Comparaciones en parejas de Tukey

#### Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Edad	N	Media	Agrupación
24 m	26	2.9038	A
18 m	25	1.8000	B
12 m	26	1.2192	C
6 m	25	0.7960	D

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.