



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE  
HIDALGO



Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales  
Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas

# Variación somaclonal en *Agave victoriae-reginae* T. Moore

TESIS

que como requisito parcial para obtener el título  
profesional de

Maestra en Ciencias Biológicas

presenta

Biól. Ilse Iliana Pérez Rangel

**Director tesis**

Dr. Alejandro Martínez Palacios

**Co-Director**

Dra. Selene Ramos Ortiz

Morelia, Michoacán

Febrero, 2024

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Alejandro por brindarme una vez más la oportunidad de trabajar en un tema que me apasiona por todo el tiempo y dedicación que invirtió en mi capacitación desde el servicio social y durante la tesis de licenciatura, por la paciencia y el apoyo brindado.

A la Dra. Selene por todo el apoyo desde el comienzo de la tesis, por las enseñanzas y por siempre apoyarme con todos los pormenores que surgieron durante la maestría, así como por guiarme a través de todos los cursos y talleres que han reforzado la importancia de divulgar la ciencia a nuestras próximas generaciones.

Al Dr. Llanderal por todo el conocimiento que me brindo en el área genética para hacer posible este trabajo, por todo su tiempo y dedicación, así como la paciencia para enseñarme un poco de esta área tan maravillosa.

A la Dra. Martha por siempre cuidar los pequeños detalles que no notamos y que fueron muy importantes para este trabajo.

Al Dr. Cuauhtémoc por revisar la congruencia de cada paso durante el desarrollo de los análisis.

Agradezco infinitamente al laboratorio de Ecología Molecular de la ENES Unidad Morelia por los recursos brindados durante este trabajo para poder hacerlo posible y por el uso del secuenciador.

## DEDICATORIA

*Para mis pequeños Leonardo y Ángel que siempre me acompañan, en las buenas y en las malas, creciendo y aprendiendo de la vida, queriendo descubrir que hay más allá de lo que no podemos ver.*

*A mis papás que siempre están apoyándome para poder lograr todas mis metas.*

*A mi puki que siempre me acompaño en cada desvelada y en cada madrugada durante toda la maestría.*

*A Ocelo por la amistad y el apoyo.*

*¡Los quiero!*

## CONTENIDO

RESUMEN .....	8
ABSTRACT .....	9
1. INTRODUCCIÓN .....	10
2. ANTECEDENTES .....	11
2.1 <i>Agave victoriae-reginae</i> .....	11
2.2 Propagación por semillas o por medios vegetativos .....	12
2.3 Uso de clones en la micropropagación .....	13
2.4 Micropropagación.....	13
2.5 Variación somaclonal .....	14
2.6 Reguladores del crecimiento en la variación somaclonal.....	14
2.7 Auxinas .....	15
2.7.1 Ácido 2, 4-diclorofenoxiacético (2,4-D).....	15
2.8 Citocininas.....	15
2.8.1 6-Bencilaminopurina (BA) .....	16
2.8.2 Kinetina.....	16
2.9 Ciclo celular.....	17
2.10 Número de subcultivos en la variación somaclonal .....	18
2.11 El efecto del genotipo en la variación somaclonal .....	18
2.12 Tipo de explante.....	19
2.13 Efecto de la luz en la variación somaclonal .....	20
2.14 Efecto de la temperatura en la variación somaclonal.....	20
2.15 Métodos de detección de variantes somaclonales.....	21
2.16 Marcadores moleculares .....	21
2.17 Tipos de marcadores.....	22
2.18 Marcadores usados en <i>Agave</i> .....	22
2.19 Secuencias de ADN .....	24
2.20 Marcadores neutrales a la selección .....	24
2.21 Marcadores funcionales .....	25
3. HIPÓTESIS .....	26
4. OBJETIVOS .....	26
5. MATERIALES Y MÉTODOS .....	27
5.1 Material biológico. ....	27
5.2 Tratamiento hormonal. ....	27
5.3 Incubación.....	27
5.4 Subcultivo.....	28

5.5 Evaluación de la respuesta morfogénica .....	28
5.6 Aislamiento de ADN y amplificación de secuencias.....	28
5.7 Marcadores neutrales a la selección (MN).....	30
5.7.1 Condiciones de la amplificación .....	31
5.7.2 Secuenciación .....	31
5.8 Marcadores Funcionales (MF).....	32
5.8.1 Condiciones de la amplificación .....	32
5.9 Recorte y limpieza de geles.....	32
5.10 Análisis estadístico .....	33
<b>6. RESULTADOS .....</b>	<b>35</b>
6.1 Respuestas morfogénicas y crecimiento del clon .....	35
6.2 Tratamientos sin reguladores del crecimiento .....	37
6.3 Efecto del BA en el crecimiento y la morfogénesis del clon .....	39
6.4 Efecto del 2,4-D en la morfogénesis.....	41
6.5 Efecto de la kinetina en la morfogénesis .....	43
6.6 Análisis de componentes principales.....	46
6.7 Coordenadas Principales .....	48
6.8 Extracción y análisis de ADN.....	51
6.9 Cuantificación y estandarización de ADN.....	52
6.10 Marcadores neutrales a la selección (MN).....	53
6.11 Marcadores funcionales (MF).....	54
<b>7 DISCUSIÓN .....</b>	<b>55</b>
7.1 Morfogénesis y crecimiento del clon sin reguladores del crecimiento .....	55
7.2 Efecto de las hormonas, temperatura e intensidad luminosa en el crecimiento del clon .....	55
7.3 Efecto del BA en la morfogénesis.....	56
7.4 Efecto del 2,4-D en la morfogénesis.....	56
7.5 Efecto de la kinetina en la morfogénesis .....	57
7.6 Efecto de la luz.....	58
7.7 Efecto de la temperatura .....	58
7.8 Efecto de la luz y temperatura .....	59
7.9 Secuenciación de marcadores neutrales a la selección (MN).....	59
7.10 Secuenciación de marcadores funcionales (MF).....	60
<b>8. CONCLUSIONES.....</b>	<b>61</b>
<b>9. LITERATURA CITADA.....</b>	<b>62</b>

## ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadro 1. Marcadores moleculares usados en <i>Agave</i> .....	23
Cuadro 2. Muestras de <i>A. victoriae-reginae</i> usadas para la extracción y análisis del ADN .....	30
Cuadro 3. Secuencias de los oligonucleótidos para amplificación de los marcadores neutrales. ....	31
Cuadro 4. Secuencias de los oligonucleótidos para amplificación de los genes específicos .....	32
Cuadro 5. Análisis de varianza del crecimiento en volumen del clon en todos los tratamientos con y sin reguladores del crecimiento, intensidad luminosa y temperatura .....	35
Cuadro 6. Análisis de varianza del crecimiento en volumen del clon sin reguladores del crecimiento en los tratamientos con intensidad luminosa y temperatura.....	37
Cuadro 7. Análisis de varianza del crecimiento en volumen del clon con BA en los tratamientos con intensidad luminosa y temperatura. ....	39
Cuadro 8. Análisis de varianza del crecimiento en volumen del clon con 2,4-D en los tratamientos con intensidad luminosa y temperatura. ....	41
Cuadro 9. Análisis de varianza del crecimiento en volumen del clon con kinetina en los tratamientos con intensidad luminosa y temperatura.....	43
Cuadro 10. Pruebas de normalidad multivariada. ....	46
Cuadro 11. Valores y variación explicada dentro de los primeros tres componentes. ....	47
Cuadro 12. Grado de aportación de cada variable en variación explicada dentro de los tres componentes.....	48
Cuadro 13. Valores y variación explicada dentro de los primeros tres componentes. ....	48
Cuadro 14. Respuestas morfogénicas del clon <i>A. victoriae-reginae</i> a los tratamientos sin reguladores del crecimiento, BA, 2,4-D, kinetina, intensidad luminosa y temperatura.....	50
Cuadro 15. Cuantificación y estandarización del ADN de los tratamientos de <i>A. victoriae-reginae</i> .....	52
Cuadro 16. Secuencias de los oligonucleótidos para amplificación de los marcadores neutrales. ....	53
Figura 1. Distribución de las poblaciones naturales de <i>Agave victoriae-reginae</i> subsp. <i>swobodae</i> . ....	11
Figura 2. Factores encontrados que afectan la variabilidad genética en cultivos de callo y plantas regeneradas.....	19
Figura 3. Diagrama de flujo de los tratamientos y subcultivo del clon de <i>A. victoriae-</i>	

<i>reginae</i> .....	34
Figura 4. Crecimiento en los explantes de <i>A. victoriae-reginae</i> cultivados <i>in vitro</i> .	36
Figura 5. Brotes de <i>A. victoriae-reginae</i> cultivados <i>in vitro</i> sin reguladores del crecimiento .....	37
Figura 6. Crecimiento en volumen de brotes de <i>A. victoriae-reginae</i> sin reguladores del crecimiento durante tres subcultivos. ....	38
Figura 7. Respuesta morfogénica en explantes de <i>A. victoriae-reginae</i> bajo cultivo <i>in vitro</i> con BA. ....	39
Figura 8. Crecimiento en volumen del explante de <i>A. victoriae-reginae</i> con el regulador del crecimiento BA durante tres subcultivos.....	40
Figura 9. Respuesta morfogénica en <i>A. victoriae-reginae</i> durante tres subcultivos con 2,4-D .....	41
Figura 10. Crecimiento en volumen de <i>A. victoriae-reginae</i> bajo cultivo <i>in vitro</i> con 2,4-D durante tres subcultivos.....	42
Figura 11. Respuesta morfogénica con kinetina en <i>A. victoriae-reginae</i> durante tres subcultivos .....	44
Figura 12. Crecimiento del clon de <i>A. victoriae-reginae</i> durante tres subcultivos con kinetina .....	45
Figura 13. Correlación del crecimiento contra los tratamientos sin reguladores del crecimiento, BA, 2,4-D, kinetina, intensidad luminosa y temperatura.....	46
Figura 14. Distribución de datos del crecimiento de <i>A. victoriae-reginae</i> contra los tratamientos sin reguladores del crecimiento, BA, 2,4-D, kinetina, intensidad luminosa y temperatura. ....	47
Figura 15. Gráfico de datos del análisis de coordenadas principales del crecimiento de <i>A. victoriae-reginae</i> contra los tratamientos sin reguladores del crecimiento, BA, 2,4-D, kinetina, intensidad luminosa y temperatura.....	49
Figura 16. Gel de agarosa para verificar presencia de ADN de calidad.. ....	51
Figura 17. Ejemplo de un electroferograma de una muestra de <i>A. victoriae-reginae</i> con el oligonucleótido trnK a 58°C .....	54

## RESUMEN



La variación somaclonal es un fenómeno que se presenta con frecuencia durante el cultivo *in vitro* y que resulta un fenómeno común en cultivos que permanecen en subcultivos constantes. El clon de *Agave victoriae-reginae* proviene de una semilla que se desdiferenció y formó callo que posteriormente dio origen a embriones somáticos sin el uso de reguladores del crecimiento y que desde entonces se ha mantenido en cultivo. El objetivo general de la tesis fue evaluar si existe variación somaclonal en un clon actualizado de *A. victoriae-reginae* sujeto al efecto de factores físico-químicos que generalmente se aplican en el cultivo *in vitro*. Se utilizó el clon órgano-embriogénico para evaluar el efecto de las hormonas 2,4-D, BA y kinetina a 1 mgL, intensidad luminosa de 30 y 60  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , temperatura de 25 y 32°C durante tres subcultivos continuos *in vitro*. Para evaluar posibles cambios genéticos, se probaron los marcadores neutrales a la selección (MN) psbA, trnK y trnL, y funcionales Longifolia, JazmonyI y AT2 (derivados de *Dendrobium sp*). Los resultados morfológicos muestran que la hormona 2,4-D promueve en los explantes una respuesta embriogénica con embriones bien definidos e inducción de callo, mientras que la BA y kinetina promueven una respuesta organogénica con abundantes brotes de color verde intenso. Con respecto a los MN, no mostraron variación en los tratamientos, probablemente debido a que no están sujetos a selección natural. Los marcadores funcionales lograron amplificarse, sin embargo, el tamaño de las bandas no fue el adecuado para secuenciar. Finalmente, este trabajo contribuye a evaluar la susceptibilidad de la especie a presentar variación somaclonal y ser valorada en los cultivos *in vitro* de agaves.

**Palabras clave:** variación morfológica, secuenciación, cultivo *in vitro*, somaclones.

## ABSTRACT

Somaclonal variation is a phenomenon that frequently occurs during *in vitro* cell cultures and is common in cultures that remain in constant subcultures. The *Agave victoriae-reginae* clone comes from a seed that dedifferentiated and formed a callus that subsequently gave rise to somatic embryos without the use of growth regulators and that has since been maintained in culture. The general objective of the thesis was to evaluate if there is somaclonal variation in an updated clone of *A. victoriae-reginae* subject to the effect of physical-chemical factors that are generally applied *in vitro* culture. The organo-embryogenic clone was used to evaluate the effect of the hormones 2,4-D, BA, and kinetin at 1 mgL, light intensity of 30 and 60  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , temperature of 25 and 32°C for three continuous subcultures *in vitro*. To evaluate possible genetic changes, selection-neutral (MN) markers psbA, trnK, and trnL, and functional markers Longifolia, JazmonyI, and AT2 (derived from *Dendrobium sp.*) were tested. The morphological results show that the 2,4-D hormone promotes an embryogenic response in explants with well-defined embryos and callus induction, while BA and kinetin promote an organogenic response with abundant intense green shoots. Regarding the MN, they did not show variation in the treatments, probably because they are not subject to natural selection. The functional markers were able to be amplified, however, the size of the bands was not adequate for sequencing. Finally, this work contributes to evaluating the susceptibility of the species to present somaclonal variation and to be assessed *in vitro* cultures of agaves.

**Keywords:** morphological variation, sequencing, *in vitro* culture, somaclons.

## 1. INTRODUCCIÓN

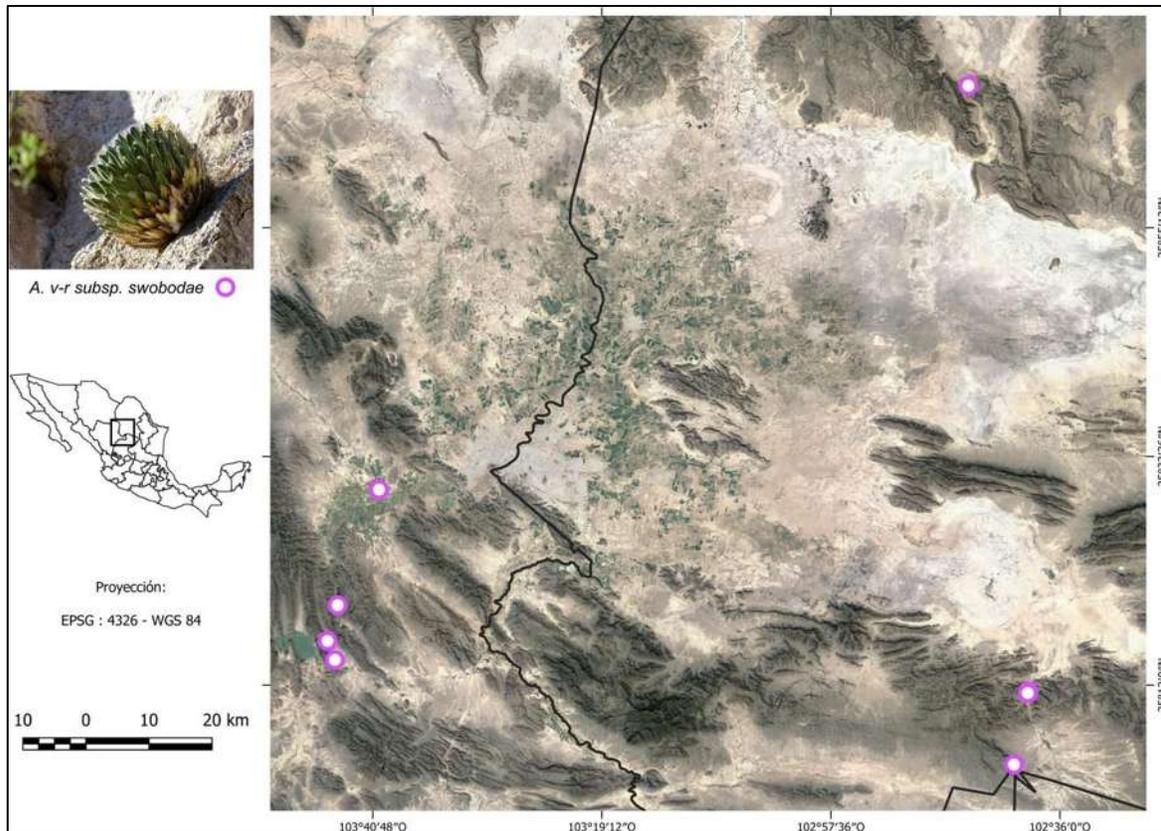
El cultivo de tejidos es una herramienta indispensable para la investigación en ciencias de las plantas y es empleado para la conservación, producción y mejoramiento de los recursos vegetales (Bairu *et al.*, 2011). La presencia de variación somaclonal en los cultivos representa un problema importante cuando se requiere uniformidad genética, por otra parte, también es una fuente de nuevas variantes de interés agronómico (Bairu *et al.*, 2006; 2011). En la actualidad, el estudio de la variación genética entre individuos, poblaciones y especies para explicar patrones y procesos ecológico-evolutivos se aborda en gran medida mediante marcadores moleculares, gracias al desarrollo y la utilización de los marcadores moleculares para la explotación e identificación de la diversidad fitogenética se ha obtenido uno de los avances más importantes en el campo de los estudios de genética molecular (Idrees e Irshad, 2014).

El clon órgano-embriogénico de *Agave victoriae-reginae* subsp. *swobodae* cultivado durante más de 30 años en el laboratorio de Biotecnología y genética forestal del IIAF ha despertado interés por presentar una respuesta órgano-embriogénica sin presencia de fitorreguladores, y, por tanto, puede servir de modelo para detectar variaciones somaclonales. El presente trabajo explorará los efectos fisicoquímicos de los reguladores del crecimiento 2,4-D, BA, kinetina, intensidad luminosa, temperatura y número de subcultivos para registrar respuestas de variaciones genéticas en explantes que regeneran brotes y embriones somáticos sin el uso de reguladores del crecimiento.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 *Agave victoriae-reginae*

*A. victoriae-reginae* (Moore) subsp. *swoboda* Halda se encuentra clasificada como en peligro de extinción por las normas mexicanas NOM 059 (SEMARNAT, 2010) y en el apéndice II de la CITES (CITES, 2017) debido a la extracción por su alto valor como ornamental (Martínez-Palacios *et al.*, 1999), se encuentra en poblaciones muy localizadas en Coahuila y Durango (Figura 1), solo en afloramientos de piedra caliza (Gentry, 1982; Martínez-Palacios *et al.*, 1999), la especie es diploide  $2n=60$  (Bhattacharyya, 1968) con bajos niveles de propagación vegetativa (Gentry, 1982).



**Figura 1.** Distribución de las poblaciones naturales de *Agave victoriae-reginae* subsp. *swoboda*.

## 2.2 Propagación por semillas o por medios vegetativos

Las plantas pueden ser reproducidas mediante dos tipos de propagación: la sexual y la asexual. En el ciclo sexual se forman nuevas plantas mediante la fusión de dos gametos parentales y crean embriones contenidos en semillas o frutos, las plántulas resultantes pueden presentar variación y cada una puede representar una nueva combinación de genes (meiosis).

Por otro lado, en el ciclo vegetativo o asexual únicamente las características de un solo individuo seleccionado para propagación son perpetuados, ya que, durante la división celular (mitosis), los genes son copiados exactamente en cada división, este grupo de plantas reproducidas asexualmente es definido como clon (George, 1993).

Para muchos propósitos agrícolas, hortícolas y de investigación es deseable el uso de clones (Bairu *et al.*, 2006). En casos de investigación el uso de clones *in vitro* es la mejor opción para evaluar los efectos de factores específicos como lo es el uso de reguladores del crecimiento, los clones son obtenidos mediante condiciones asépticas y controladas, los frascos que contienen las plantas se ubican en estanterías con luz artificial dentro de la cámara de crecimiento, la temperatura se fija en valores que oscilan entre los 21 y 25°C, además de controlar la cantidad de horas de luz, por lo general con un fotoperiodo de 16/8 horas luz.

El medio de cultivo se compone de una mezcla de macro y micronutrientes, vitaminas, reguladores de crecimiento, sacarosa, agua y agar. La composición del medio depende de la especie vegetal y de la etapa del proceso de micropropagación. Es posible clasificar los principales factores no biológicos que afectaran al desarrollo del cultivo *in vitro*, incluyendo:

### Ambiente químico

Composición del medio de cultivo  
pH

### Ambiente Físico

Temperatura  
Luz  
Fotoperiodo  
Humedad

(Castillo, 2004)

### **2.3 Uso de clones en la micropropagación**

La micropropagación o propagación clonal, es una de las aplicaciones más conocidas y usadas del cultivo *in vitro* (Bairu *et al.*, 2006), a través de la micropropagación, a partir de un fragmento (explante) de una planta madre, se obtiene una descendencia uniforme, con plantas genéticamente idénticas, denominadas clones (Castillo, 2004). La clonación de individuos puede tener varias aplicaciones. Desde la aplicación comercial, permitiendo tener plantaciones uniformes formadas por individuos que han demostrado ser superiores, lo que permite maximizar el aprovechamiento del genotipo clonado.

En el ámbito de la investigación y del mejoramiento genético, las posibilidades son más amplias. El clonar individuos hace posible estudiar el comportamiento de un genotipo en varias condiciones al mismo tiempo, movilizar genotipos a zonas de interés, instalar huertos semilleros formados solo por individuos selectos, conservar germoplasma por tiempo indefinido y aplicar técnicas de ingeniería genética (Trujillo, 1999).

### **2.4 Micropropagación**

Los métodos disponibles para la propagación de plantas *in vitro* proporcionan ventajas sobre los métodos tradicionales (Dixon, 1985), los cultivos son iniciados con pocos segmentos de plantas (explantes), y posteriormente pequeños brotes o embriones son generados y propagados, solo un espacio pequeño es requerido para mantener las plantas o para incrementarlas en número (Martínez-Palacios *et al.*, 2003). Las plantas producidas pueden ser libres de bacterias, hongos y otros microorganismos, además, factores como nutrientes, reguladores del crecimiento, luz, temperatura, pueden ser regulados; usualmente la micropropagación es mucho más rápida que otros métodos de multiplicación vegetativa y es posible en especies de difícil propagación por técnicas convencionales (Dixon, 1985; George, 1993). Los principales métodos de micropropagación son: a partir de meristemas, nodos y el cultivo de tejidos para producir de manera directa o indirecta embriones y/o órganos (George, 1993).

## 2.5 Variación somaclonal

La variación somaclonal se define como la variación que se origina en cultivos celulares y de tejidos como resultado de eventos aleatorios genéticos o epigenéticos que ocurren durante este proceso y que modifican el fenotipo de las plantas y/o tejidos regenerados (Larkin y Scowcroft, 1981; Torres, 2010; Bairu *et al.*, 2011). El término variante somaclonal se utiliza universalmente para todas las formas de variantes derivadas de cultivos de tejidos (Bajaj, 1990). La aparición espontánea de variación entre subclones de una línea celular parental es común, es posible distinguir dos tipos de causas: la variación epigenética transitoria debida al estrés generado durante el cultivo *in vitro* y las variaciones genéticas producidas por las mutaciones azarosas, ambos fenómenos se denominan variación somaclonal (Larkin y Scowcroft, 1981; Gould, 1986; Bairu *et al.*, 2006).

La variación somaclonal puede proporcionar un valioso recurso para la mejora de las plantas al proporcionar nuevas variantes de interés agronómico (Larkin y Scowcroft, 1981; Bairu *et al.*, 2011), pero también puede generar variantes indeseables en cultivos donde se requiere uniformidad genética en los clones (Bairu *et al.*, 2011). Las causas que inducen variación genética *in vitro* son diversas, entre ellas se encuentran la metilación de ADN, falta de precursores de ácidos nucleicos, efecto de la división continua y acelerada ocasionada por los reguladores del crecimiento, condiciones ambientales del cultivo, número de subcultivos, métodos de propagación, genotipo, tipo de explante usado como material inicial, entre otros (George, 1993; Bairu *et al.*, 2011).

## 2.6 Reguladores del crecimiento en la variación somaclonal

El crecimiento y morfogénesis *in vitro* son regulados por la interacción y el balance entre los fitorreguladores suministrados en el medio (exógenos), y las sustancias de crecimiento producidas por la planta endógenamente (George, 1993; Davies, 1995), aunque los fitorreguladores del crecimiento no son considerados mutagénicos, al inducir una división celular acelerada acarrear consigo divisiones anormales del

material genético durante la división celular (George, 1993; Karp, 1994), por tanto, la composición genética de las células puede verse influida por los niveles relativos tanto de auxinas como citocininas (d'Amato, 1975; George, 1993).

## **2.7 Auxinas**

Las auxinas son extensamente usadas en trabajos de micropropagación, su función principal es la elongación celular y se agregan casi invariablemente a un medio de cultivo para inducir la formación y mantener el crecimiento del callo desorganizado, la suspensión de células u órganos y para regular la morfogénesis (George, 1993; Gaspar *et al.*, 2003). Cambios genéticos son altamente probables de aparecer en este tipo de cultivos (George, 1993). Las auxinas sintéticas más comúnmente usadas en el cultivo de tejidos son el 2,4-D, IBA y NAA, ya que éstas no se desnaturalizan durante la esterilización y el desarrollo de los cultivos, son más económicas y registran mejores respuestas morfogénicas (George, 1993).

### **2.7 1 Ácido 2, 4-diclorofenoxiacético (2,4-D)**

La auxina sintética 2,4-D es usada con frecuencia en cultivos de callos y células, diversas investigaciones a menudo la asocian con anomalías genéticas como la poliploidía y la estimulación de la síntesis de ADN que puede resultar en endorreduplicación (George, 1993; Bouman y De Klerk, 2001; Ahmed *et al.*, 2004; Mohanty *et al.*, 2008). La inducción de callos con 2,4-D a alta concentración, se ha implicado como causa de variación somaclonal en *Fragaria* (Nehra *et al.*, 1992), *Glycine max* (Gesteira *et al.*, 2002) y *Gossypium* (Jin *et al.*, 2008).

## **2.8 Citocininas**

Las citocininas son hormonas que estimulan la citocinesis celular, cuando se adicionan a los cultivos *in vitro* en proporciones superiores de lo requerido pueden incrementar la velocidad de la división celular, lo cual, puede resultar en ploidías en células meristemáticas estables y en bajas concentraciones, pueden disminuir el rango de ploidías en suspensión de células, estimulando la división de células meristemáticas

---

citológicamente estables (Kibler y Neumann, 1980). En contraste, altas concentraciones de muchos componentes con actividad de citocinina, pueden incrementar la frecuencia de células poliploides (Zakhlenyuk y Kunakh, 1987). Al igual que con las auxinas, las citocininas sintéticas 2iP, BA y kinetina son las más usadas en el cultivo de tejidos, debido a que presentan mejores respuestas morfogénicas, son económicamente más accesibles y son estables a la autoclave y a la luz durante los cultivos (George, 1993).

### **2.8.1 6-Bencilaminopurina (BA)**

El obtener variantes en los cultivares, también puede ofrecer ventajas cuando las variantes presentan características de interés comercial, se ha informado que las plantas de *Musa* regeneradas mediante cultivo *in vitro* con BA, muestran un mayor porcentaje de anomalías mitóticas (Shepherd y Dos Santos, 1996; Giménez, 2001) en relación a las plantas que han sido propagadas vegetativamente por métodos clásicos. En *Capsicum annuum* Hossain y col. (2003) reportaron variantes fenotípicas en los regenerantes con el uso de 5 mg/L de BA. Los altos niveles de BA (30 mg L<sup>-1</sup>) también aumentaron en gran medida la variabilidad genética de los cultivos de callos de *Oryza sativa* en comparación con los que se encuentran en cultivos incubados con 2 mg L<sup>-1</sup> de BA (Oono, 1985).

### **2.8.2 Kinetina**

Jin y colaboradores (2008) registraron una mayor variación en el nivel de ADN en callos embriogénicos y plántulas regeneradas en el cultivo de tejidos de algodón, con una combinación de 2, 4-D y kinetina, el análisis RAPD y SSR sugirió que la combinación de hormonas 2, 4-D y kinetina podría inducir una variación somaclonal relativamente alta en comparación con el solo uso de kinetina, fenómeno que puede ser relacionado en que las dos hormonas registran división celular. En dos variedades de *Cuminum cyminum* Bahmankar y col. (2017) encontraron variación genética mediante el uso de marcadores RAPD (Fragmentos polimórficos amplificados al azar). Chin y col. (2019) demostraron que la kinetina (1.5 mg/L) induce una alta variabilidad genética en

*Dendrobium*, lo cual fue registrado con el uso de marcadores de ADN ISSR (Inter simple sequence repeats) y DAMD (Amplificación directa con ADN microsatélite).

## 2.9 Ciclo celular

El ciclo de división celular es un proceso mediante el cual las células crecen, copian su material genético y se dividen para reemplazar a las células que lo requieren, este proceso normalmente toma 24 horas algunas células están en constante división como las del epitelio intestinal que se renuevan entre dos y cuatro días o las de las criptas del colon con una renovación de tres a cuatro días, mientras que otras células como las neuronas del sistema nervioso central que apenas se renuevan o los adipocitos que se renuevan cada 8 años (Lagunas *et al.*, 2014),.

Existen dos tipos principales de células en los organismos pluricelulares: las células somáticas y las células germinales, las células somáticas producen otras células somáticas y las células germinales producen otras células germinales, sin embargo, las células germinales también pueden generar gametos, es decir, solo las células germinales pueden entrar en meiosis, proceso mediante el cual se generan cuatro gametos haploides. El ciclo celular contiene una serie de etapas denominadas: G1 (crecimiento), S (síntesis), G2 (segunda etapa de crecimiento) y M (mitosis). Las fases G1, S y G2 se suelen agrupar en la denominada interfase (Pacheco *et al.*, 2017). La mitosis es el mecanismo por el cual se reparten los cromosomas para formar los dos núcleos de las células hijas. La mitosis se puede dividir a su vez en varias etapas profase, metafase, anafase y telofase, durante las que el ADN se compacta, forma cromosomas, éstos se organizan y segregan, y finalmente se descondensan para formar los núcleos de las células hijas. Durante la citocinesis en las células vegetales se sintetiza una pared celular que terminará por separar el citoplasma inicial en dos citoplasmas que tendrán cada una de las células hijas (Lagunas *et al.*, 2014; Pacheco *et al.*, 2017).

## 2.10 Número de subcultivos en la variación somaclonal

La tasa de variación somaclonal aumenta con el número de subcultivos (George, 1993; Bairu *et al.*, 2006, 2011; Ray *et al.*, 2006) especialmente los cultivos de suspensión celular y callos caracterizado por la continua división celular (Reuveni e Israelí, 1990; Rodrigues *et al.*, 1998; Bairu *et al.*, 2006). Rodrigues y col. (1998) mostraron que en *Musa* las variantes somaclonales aparecieron después de 5, 7, 9 y 11 subcultivos a una tasa de 1.3, 1.3, 2.9 y 3.8%, respectivamente. Algunos estudios refieren que la variación somaclonal es particularmente mayor en plantas regeneradas a partir de subcultivos a largo plazo (Reuveni e Israel, 1990; George, 1993; Petolino *et al.*, 2003), el largo período de cultivo aumentó el número de variantes somaclonales observadas en los regenerantes de *Triticum* (Hartmann *et al.*, 1989) y *Musa* (Bairu *et al.*, 2006).

En contraste hay evidencias de que existen cultivos que han permanecido genéticamente estables (Bairu *et al.*, 2011); en un cultivo de múltiples brotes de *Pisum sativum* mantenido en subcultivo durante 24 años, permaneció genéticamente estable al compararse con el genotipo original (Smýkal *et al.*, 2007). También se observó ausencia de variación genética después de 17 meses de subcultivo continuo de *Foeniculum vulgare* (Bennici *et al.*, 2004), lo que sugiere un posible efecto del genotipo.

## 2.11 El efecto del genotipo en la variación somaclonal

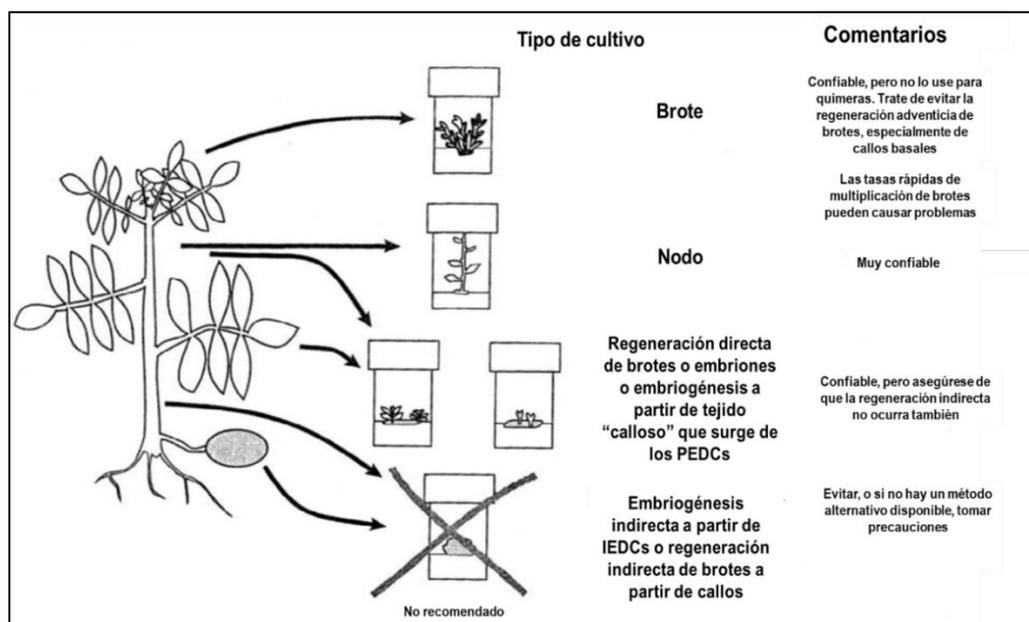
La variación genética ha sido encontrada en cultivos de células y callo en un amplio rango de especies de plantas (Bairu *et al.*, 2011), sin embargo, la susceptibilidad a la variación genética puede diferir entre variedades o cultivares dentro de una especie, por ejemplo, la proporción de células de diploides, aneuploides y poliploides en el cultivo de callo, varía entre aquellas originadas de diferentes plantas madre (Browsers y Orton, 1982). Cuando las plantas han sido regeneradas de callo genéticamente variable, son más propensas a ser variables que aquellas que fueron obtenidas de respuestas directas de cultivo de zonas meristemáticas (George, 1993).

Chaturvedi y Mitra (1975) encontraron bajo mismas condiciones de cultivo,

subclones de *Citrus grandis* que diferían en su patrón morfogenético; un tejido formó numerosos cuerpos globulares verdosos, al subcultivar en el mismo medio se formaron numerosos embrioides, mientras que el otro tejido formó brotes, lo que sugiere un posible efecto del genotipo. Lee y Phillips (1988) señalan que las diferencias en la estabilidad genética de los cultivos están relacionadas en la capacidad que tienen los diferentes genomas para responder a la variación causada por el estrés físico-químico.

## 2.12 Tipo de explante

La variación somaclonal está relacionada con los cultivos sujetos a inestabilidad y crecimiento desorganizado, en general, cultivos con mayor nivel de desorganización celular, son más propensos a presentar mutaciones (Bairu *et al.*, 2011). En el cultivo de tejidos se presenta crecimiento desorganizado de los explantes, desde los que menos perturban la organización celular como lo es el cultivo de meristemas hasta el cultivo de protoplastos y cultivo de explantes sin meristemas donde después de una fase de callo desorganizado o cultivo en suspensión celular, se logra la regeneración mediante formación de brotes adventicios (George, 1993) (Figura 2).



**Figura 2.** Factores encontrados que afectan la variabilidad genética en cultivos de callo y plantas regeneradas de ellos; IEDCs: Células determinadas embriogénicas inducidas PEDCs: Células determinadas preembriogénicas (Tomado de George, 1993).

### **2.13 Efecto de la luz en la variación somaclonal**

La calidad, intensidad y duración de la luz afectan el desarrollo vegetal porque promueven diferentes respuestas fisiológicas (Murillo-Talavera *et al.*, 2016). El sistema de iluminación *in vitro* debe brindar luz en la región espectral que está involucrada en la fotosíntesis y en las respuestas fotomorfogénicas (Gupta y Jatothu, 2013), el espectro de iluminación por LEDs blancos ha sido probado y se ha reportado como favorable para el cultivo *in vitro* de especies como *Oncidium tigrinum* (Murillo-Talavera *et al.*, 2016), *Lilium* (Lian *et al.*, 2002), *Musa* (Nhut *et al.*, 2001), *Fragaria* (Nhut *et al.*, 2003) y *Chrysanthemum* (Kim *et al.*, 2004).

El factor luz en el cultivo *in vitro* puede presentar respuestas morfogénicas contrastantes, Guillen y col. (2015) reportaron en explantes de *Bucarnea inermis* cultivados en presencia de luz la formación de callo y posteriormente la formación de raíces adventicias, en ausencia de luz los explantes se diferenciaban a embriones. En *Malus* van der Krieken y col. (1992) reportaron que en presencia de luz se inhibía la formación de raíces.

Hasta el momento no se cuenta con registros de que la alta intensidad luminosa pueda inducir variación somaclonal, en cultivo *in vitro* de *Solanum tuberosum* (cultivares Snegir y Rozhdestvenskiy), con una intensidad de  $135 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  presentó un crecimiento y desarrollo óptimo durante la micropropagación; sin embargo, se sugiere que la respuesta de la planta a diferentes intensidades de luz es específica de la especie y, en el caso de las plántulas de patata, específica del cultivar (Kulchin *et al.*, 2018).

### **2.14 Efecto de la temperatura en la variación somaclonal**

La temperatura es un factor importante que controla el crecimiento y desarrollo de las plantas (Van Dam *et al.*, 1996). Los efectos del aumento de la temperatura en los cultivos van desde lesiones fisiológicas como quemaduras en hojas y tallos, abscisión y senescencia de las hojas, inhibición del crecimiento de brotes y raíces o daño de

frutos, que consecuentemente conducen a una disminución de la productividad de las plantas (Vollenweider y Günthardt-Goerg, 2005), pero también la temperatura como un factor de estrés a la que se sujetan los cultivos *in vitro* puede influir en la tasa de variación genética (George, 1993). Binns y Meins (1980) identificaron que el callo de *Nicotiana tabacum* incubado a 35°C se mantenía predominantemente diploide, pero en 25°C presentaba una marcada inestabilidad cariotípica y se convertía en tetraploide. Jackson y Dale (1988) observaron en dos genotipos de *Lolium multiflorum* que al aumentar la temperatura (10, 15, 20, 25 y 35°C) un genotipo regeneró un mayor porcentaje de plantas albinas (18%), mientras que en el otro genotipo se presentó un porcentaje bajo de regenerantes albinas (1.8%) en todos los rangos de temperatura.

### **2.15 Métodos de detección de variantes somaclonales**

Las variantes somaclonales se pueden detectar utilizando diversas técnicas que se clasifican ampliamente como técnicas de detección morfológica, fisiológica/bioquímica y molecular (Bairu *et al.*, 2011). Actualmente, las técnicas moleculares para detectar variaciones de secuencia entre genomas presentan gran accesibilidad, por lo que es posible conocer de forma muy precisa las diferencias entre plantas fuente y somaclones (González, 2003). Estas técnicas implican el uso de marcadores moleculares que son útiles para comparar el ADN de diferentes muestras para la diferenciación en plantas, debido a la variación de secuencia mediante la identificación de polimorfismos aleatorios (Cloutier y Landry, 1994).

### **2.16 Marcadores moleculares**

Un marcador molecular se define como una secuencia de ADN, que se ubica en una posición conocida del cromosoma que sirven como puntos de referencia para el análisis del genoma (Kumar, 1999), o un gen cuya expresión fenotípica es fácilmente reconocible y se usa para detectar un individuo, o como una sonda para marcar un cromosoma, núcleo o locus, por lo que las técnicas para estimar la diversidad genética son variadas (Idrees e Irshad, 2014). Una característica de los marcadores es que muestran el polimorfismo, que puede surgir debido a la alteración de nucleótidos o

mutación en los loci del genoma (González, 2003; Bairu *et al.*, 2011) y permiten identificar diferencias genéticas entre organismos o especies individuales (Collard *et al.*, 2005).

### **2.17 Tipos de marcadores**

Varios tipos de marcadores moleculares son usados para estimar el polimorfismo del ADN y estos pueden ser clasificados como marcadores basados en hibridación y marcadores basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Varshney *et al.*, 2007). Los marcadores se agrupan de acuerdo con su capacidad para mostrar homocigosidad, es decir, marcador dominante o heterocigosidad, es decir, marcador codominante (Hartl, 1988). Idealmente se elegiría un marcador fácilmente disponible, con un ensayo rápido y sencillo, reproducible y altamente polimórfico de una herencia codominante y ocurrencia recurrente en el genoma, selectivamente neutral a las condiciones ambientales y que el intercambio de datos entre diferentes laboratorios se realizara de forma fácil. Sin embargo, es difícil obtener un marcador con todas estas características, por lo tanto, el marcador que sea empleado dependerá en gran medida de las características de estudio que se realice (Idrees e Irshad, 2014).

### **2.18 Marcadores usados en *Agave***

*Agave* es uno de los géneros mexicanos más importantes económicamente, diferentes especies son usadas para la producción de bebidas alcohólicas como pulque, mezcal y tequila, para la producción de fibras y como ornamentales (García-Mendoza *et al.*, 2017) por lo que existen diversos estudios genéticos en el género (Cuadro 1).

Cuadro 1. Marcadores moleculares usados en *Agave*

Especie	Marcadores	Referencia
<i>A. victoriae-reginae</i>	Isoenzimas	Martínez-Palacios <i>et al.</i> (1999)
<i>A. tequilana</i>	RAPDs	Gil-Vega <i>et al.</i> (2001)
<i>A. lechuguilla</i>	Isoenzimas	Silvia-Montellano y Eguiarte (2003)
<i>A. cerulata</i>	RAPDs	Navarro-Quezada <i>et al.</i> (2003)
<i>A. deserti</i>	RAPDs	Navarro-Quezada <i>et al.</i> (2003)
<i>A. fourcroydes</i>	AFLP	González <i>et al.</i> (2003)
<i>A. fourcroydes</i>	AFLP ISTR	Demey <i>et al.</i> (2004)
<i>A. garciae-mendozae</i>	ISSRs	González (2004)
<i>Agave sp.</i>	ISSRs	Rocha (2006)
<i>A. difformis</i>	ISSRs	Rocha (2006)
<i>A. striata</i>	ISSRs	Trejo (2006)
<i>A. xylocantha</i>	ISSRs	Colín (2006)
<i>A. s. falcata</i>	ISSRs	Trejo (2006)
<i>A. s. strtiata</i>	ISSRs	Trejo (2006)
<i>A. mapisaga</i> var. Carrizo	RAPDs	Alfaro-Rojas <i>et al.</i> (2006)
<i>A. mapisaga</i> var. Verde	RAPDs	Alfaro-Rojas <i>et al.</i> (2006)
<i>A. mapisaga</i> var. Ayoteco	RAPDs	Alfaro-Rojas <i>et al.</i> (2006)
<i>A. mapisaga</i> var. Manso	RAPDs	Alfaro-Rojas <i>et al.</i> (2006)
<i>A. mapisaga</i> var. Negro	RAPDs	Alfaro-Rojas <i>et al.</i> (2006)
<i>A. mapisaga</i> var. Xilometl	RAPDs	Alfaro-Rojas <i>et al.</i> (2006)
<i>A. delamateri</i>	Isoenzimas	Parker <i>et al.</i> (2007)
<i>A. murpheyi</i>	Isoenzimas	Parker <i>et al.</i> (2007)
<i>A. cupreata</i>	ISSRs	Scheinvar (2008)
<i>A. potatorum</i>	ISSRs	Scheinvar (2008)
<i>A. angustifolia</i> Sonora	AFLPs	Sánchez-Teyer <i>et al.</i> (2009)
<i>A. angustifolia</i> Landraces	ISSRs	Vargas-Ponce <i>et al.</i> (2009)
<i>A. angustifolia</i> Wild	ISSRs	Vargas-Ponce <i>et al.</i> (2009)
<i>A. angustifolia</i> Wild-tolerated	ISSRs	Vargas-Ponce <i>et al.</i> (2009)
<i>A. rhodocantha</i>	ISSRs	Vargas-Ponce <i>et al.</i> (2009)
<i>A. tequilana</i>	ISSRs	Vargas-Ponce <i>et al.</i> (2009)
<i>A. parry</i> Cultivado	Isoenzimas	Parker <i>et al.</i> (2010)
<i>A. parry</i> Wild	Isoenzimas	Parker <i>et al.</i> (2010)
<i>A. parry</i> Cultivado	Microsatélites	Parker <i>et al.</i> (2010)
<i>A. parry</i> Wild	Microsatélites	Parker <i>et al.</i> (2010)
<i>A. tequilana</i>	ISTR	Torres-Morán <i>et al.</i> (2010)
<i>A. cocui</i>	Isoenzimas	Figueredo y Nassar (2011)
<i>A. tequilana</i>	AFLP MSAP	Díaz-Martínez <i>et al.</i> (2012)
<i>A. tequilana</i> <i>A. deserti</i>	NSG	Gross <i>et al.</i> (2013)
<i>A. duranguensis</i>	ISTR	Almaraz-Abarca <i>et al.</i> (2013)
<i>A. furcroydes</i>	AFLP MSAP	Monja-Mio <i>et al.</i> (2018)
<i>A. sisalana</i>	NSG	Sarwar <i>et al.</i> (2019)
<i>A. americana</i>	DAMD ISSR RAPD	Reyes-Zambrano <i>et al.</i> (2021)

AFLP: polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados, MSAP: Secuenciación de polimorfismo de amplificación sensible a metilación, HPLC: cromatografía líquida, ISTR: Repetición etiquetada de secuencia inversa, ISSR: Inter-Secuencias Simples Repetidas, NSG: secuenciación de nueva generación RAPD: ADN polimórfico amplificado al azar.

## **2.19 Secuencias de ADN**

La secuenciación del ADN juega un papel importante para obtener análisis más detallados de la región de interés para diferentes individuos (Sandoval-Rodríguez *et al.*, 2016). Hasta hace algunos años, el uso extenso de secuencias de ADN para los estudios de poblaciones no eran prácticos debido a que los fragmentos de ADN para cada individuo tenían que ser aislados para librerías de ADN subgenómico después de ser identificados por southern blotting e hibridización. Actualmente el uso de secuencias es muy común y se ha aplicado en análisis de genética de poblaciones y problemas taxonómicos (Eguiarte *et al.*, 2007). Estos métodos sólo requieren de pequeñas cantidades de ADN, son altamente confiables y han revolucionado la biología molecular (Sandoval-Rodríguez *et al.*, 2016)

Este método incluye cuatro pasos:

1. Identificar secuencias que tengan la variación necesaria
2. Aislar y purificar un número elevado de la secuencia (ya sea por clonación o amplificación)
3. Secuenciar
4. Alinear la secuencia (con los programas MALIGN, Clustal V para Macintosh ver. 1.5, JACK ver. 4.2) (Eguiarte *et al.*, 2007).

## **2.20 Marcadores neutrales a la selección**

Estos marcadores moleculares son evolutivamente neutros, entre las ventajas podemos distinguir que presentan mayor segregación o polimorfismo, pueden ser evaluados desde los primeros estados de desarrollo de las plántulas, pueden aplicarse a cualquier tipo de material vegetal, son independientes de la época del año en que se realice el análisis, permiten la identificación correcta de la variedad sin necesidad de muchos caracteres y muy probablemente están libres de los efectos epistáticos (Azofeifa-Delgado, 2006).

## **2.21 Marcadores funcionales**

Los marcadores funcionales se derivan de sitios polimórficos dentro de genes causalmente involucrados en la variación de rasgos fenotípicos, son usados en fitomejoramiento, estudios de biodiversidad, así como en genética humana. El desarrollo de los marcadores funcionales parte de la secuencia de un gen con una función asignada, se derivan de secuencias polimórficas y es más probable que participen en la variación de rasgos fenotípicos (Andersen y Lübberstedt, 2003). Se pueden clasificar en cinco grupos: ADN conservado y marcadores basados en familias de genes (CDM), marcadores basados en elementos transponibles (TEM), marcadores basados en genes de resistencia (RGM), marcadores basados en ARN (RBM) y marcadores de huellas dactilares dirigidos (TFM) (Varshney *et al.*, 2007).

### 3. HIPÓTESIS

La presencia de hormonas 2,4-D, BA y kinetina durante el cultivo *in vitro* promueven la presencia de variación somaclonal.

La alta temperatura durante el cultivo *in vitro* promueve la presencia de variación somaclonal.

La intensidad luminosa durante el cultivo *in vitro* promueve la variación somaclonal. Los subcultivos continuos promueven la variación somaclonal

Las combinaciones de varios factores de estrés mencionados inducen la variación somaclonal.

### 4. OBJETIVOS

#### General

Evaluar la variación somaclonal en un clon de *Agave victoriae-reginae* subsp. *swoobodae* a través del efecto de factores físico-químicos que generalmente se aplican en el cultivo *in vitro*.

#### Específicos

- i. Determinar el efecto del 2,4-D, BA y Kin en la variación somaclonal de un clon de *A. victoriae-reginae*.
- ii. Estimar el efecto de la luz en la variación somaclonal de un clon de *A. victoriae-reginae*.
- iii. Determinar el efecto de la temperatura en la variación somaclonal de un clon de *A. victoriae-reginae*.
- iv. Evaluar el efecto del subcultivo en la variación somaclonal para cada hormona.
- v. Evaluar el efecto de la interacción de factores de estrés en la variación somaclonal de *A. victoriae-reginae*.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Material biológico.

Se usó un clon órgano-embriogénico de *Agave victoriae-reginae* subsp. *swobodae*, generado de una semilla que se ha mantenido por 30 años bajo subcultivo continuo en medio basal MS (Murashige y Skoog, 1962), actualmente el clon se encuentra en el Laboratorio de Biotecnología y Genética Forestal del IIAF-UMSNH. Para partir de un clon actualizado, se utilizó un fragmento del propágulo, se cultivó en medio MS basal a 25°C, fotoperiodo 16h luz, 8h oscuridad Después de 9 semanas de cultivo y de haberse incrementado el tejido, fue usado como el stock madre de donde se tomaron los fragmentos para los diversos tratamientos del experimento.

### 5.2 Tratamiento hormonal.

El medio que se utilizó fue MS (Murashige y Skoog, 1962) basal sin reguladores del crecimiento o adicionado con 1.0 mg·L<sup>-1</sup> de 2,4-D, BA o Kin, se usaron frascos de 100 mL de capacidad, el medio se ajustó a un pH de 5.7 al que se agregó 8 g·L<sup>-1</sup> de agar, se calentó hasta disolver y posteriormente se agregaron 30 mL del medio en cada uno de los frascos, los cuales fueron tapados y esterilizados en autoclave durante 15 minutos a una temperatura de 124°C y una presión de 1.5 kg/cm<sup>2</sup>. De los cuatro tratamientos establecidos, se realizaron 10 repeticiones por tratamiento, la unidad experimental fue un explante (callo organogénico) de 0.3 cm<sup>3</sup> de volumen por frasco (Figura 3).

### 5.3 Incubación

Los frascos con explantes se incubaron en un cuarto de cultivo bajo condiciones ambientales controladas a temperatura de 25° y 32°C con una intensidad luminosa de 30 y 60 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> (Figura 3).

#### **5.4 Subcultivo**

El material parental se seleccionó de un solo frasco, los explantes obtenidos se incubaron en los tratamientos ya descritos y cada 9 semanas se subcultivaron bajo el mismo tratamiento del que provenían tomando tejido de las zonas más alejadas del centro del explante original para dar lugar al siguiente subcultivo durante los tres subcultivos (Figura 3).

#### **5.5 Evaluación de la respuesta morfogénica**

Cada 11 semanas se evaluó la respuesta morfogénica que consistió en la presencia de una respuesta organogénica presentando brotes (yemas y hojas) con o sin raíces o de una respuesta embriogénica con la formación de callo organogénico y embriones, mediante observaciones del crecimiento del tejido a través de un microscopio estereoscópico, se usó vernier digital, tomando las medidas ancho (mm), largo (mm) y alto (mm) para obtener el volumen por frasco ( $\text{mm}^3$ ) y de igual forma se calculó el porcentaje de la respuesta morfogénica registrando el total del porcentaje por tratamiento. El color de los tejidos se registró usando la tabla Munsell® durante cada subcultivo.

Finalmente, fueron probados 16 tratamiento, 10 repeticiones por tratamiento, durante 3 subcultivos, la unidad experimental fue el volumen por frasco (Figura 3).

#### **5.6 Aislamiento de ADN y amplificación de secuencias.**

Con base en el protocolo de Doyle (1991) se ajustó el procedimiento para el aislamiento del ADN:

Lisis celular: se usaron de 50 a 100 mg de tejido molido en nitrógeno líquido en un mortero frío, el tejido molido se almacenó en microtubo de 2.0 mL, las muestras se guardaron en congelador a  $-20^{\circ}\text{C}$ , a cada tubo se agregó buffer 1 (Tris HCl 100 mM pH 8, NaCl 0.45 M, EDTA 17 mM pH 8, CTAB 1%, 0.3% beta mercaptoethanol al momento de usar) se centrifugó a 8 000 rpm durante 8 minutos, se eliminó el

sobrenadante, se agregaron 600  $\mu$ L de buffer 2 (Tris HCl 100 mM pH 8, NaCl 1.4 M, EDTA 20 mM pH 8, CTAB 2%, 0.3% beta mercaptoethanol al momento de usar) las muestras se incubaron por 20 min a 65°C mezclando en vortex cada 5 min, posteriormente la muestras se colocaron en hielo por 5 min.

Precipitación de proteínas: se agregaron 650  $\mu$ L de cloroformo: isoamílico 24:1, en vortex se homogenizaron las fases, los tubos se centrifugaron a 12 000 rpm durante 11 min y se recuperaron 400  $\mu$ L del sobrenadante en tubo eppendorf de 1.5 mL

Lavado de ADN: se agregaron 0.6 volúmenes de isopropanol frío (-20°C) y se mezcló suavemente para precipitar los ácidos nucleicos con un reposo de 20 min en congelador (-20°C), posteriormente se centrifugaron a 12 000 rpm durante 10 min y se eliminó el sobrenadante, se agregaron 500  $\mu$ L de etanol 70% frío (-20°C), se usó el vortex hasta que las pastillas se desprendieron y se centrifugaron a 12 000 rpm, se eliminó el sobrenadante y se secaron al vacío 10 min.

Hidratación de ADN: para finalizar se rehidrataron con 75  $\mu$ L de TE (Tris-EDTA pH 8.0) y se reservaron en congelador (-20°C).

La calidad y homogeneidad del ADN genómico se verificó en gel de agarosa al 1% en buffer TAE al 1X, que se corrió a 100 V durante 30 min. Para estimar visualmente la concentración del ADN el gel se observó en un transiluminador de luz ultravioleta.

El ADN se cuantificó en NanoDrop 2000®, la pureza de las extracciones se verificó a una longitud de 260/280, 260/230 y se estandarizaron a una concentración de trabajo de 30 ng/ $\mu$ L. Una vez estandarizadas las extracciones se probaron los oligonucleótidos neutrales psbA, trnK y trnL a un gradiente de 40 a 60°C.

Se amplificaron oligonucleótidos neutrales de cloroplasto, ya que, diversos autores han señalado diversos marcadores que sirven como código de barra de ADN para grupos de especies entre los cuales se encuentran los oligonucleótidos psbA, trnK y trnL, los cuales presentan una buena longitud y alta variación intraespecífica, además de servir como oligonucleótidos universales, los cuales han sido amplificados y

secuenciados en varios organismos fotosintéticos revelando que están altamente conservados (China plantBol Group, 2011), los tres oligonucleótidos se amplificaron para seleccionar el que presentara la secuencia más limpia y completa. Posteriormente se sintetizaron los oligonucleótidos funcionales reportados para variación somaclonal en *Dendrobium* sp. (Ryu *et al.*, 2019), se realizó la amplificación de los *loci* además de la secuenciación de los fragmentos obtenidos para identificar el tamaño deseado.

Además de los tratamientos a los que fue sujeto el clon, se analizaron 10 individuos de *A. victoriae-reginae* provenientes de semillas cultivadas *ex vitro*. Resultando en 48 muestras provenientes de cultivo *in vitro* y 10 muestras de hojas de individuos seleccionados al azar de la misma especie cultivadas *ex vitro* (Cuadro 2).

Cuadro 2. Muestras de *A. victoriae-reginae* usadas para la extracción y análisis del ADN

Muestra	Tratamiento R/T/IL	Muestra	Tratamiento R/T/IL(1)	Muestra	Tratamiento R/T/IL(2)	Muestra	Tratamiento R/T/IL(3)
AV1	<i>ex vitro</i>	AV11	-/25/30	AV12	-/25/30	AV13	-/25/30
AV2	<i>ex vitro</i>	AV14	BA/25/30	AV15	BA/25/30	AV16	BA/25/30
AV3	<i>ex vitro</i>	AV17	2,4-D/25/30	AV18	2,4-D/25/30	AV19	2,4-D/25/30
AV4	<i>ex vitro</i>	AV20	Kin/25/30	AV21	Kin/25/30	AV22	Kin/25/30
AV5	<i>ex vitro</i>	AV23	-/25/60	AV24	-/25/60	AV25	-/25/60
AV6	<i>ex vitro</i>	AV26	BA/25/60	AV27	BA/25/60	AV28	BA/25/60
AV7	<i>ex vitro</i>	AV29	2,4-D/25/60	AV30	2,4-D/25/60	AV31	2,4-D/25/60
AV8	<i>ex vitro</i>	AV32	Kin/25/60	AV33	Kin/25/60	AV34	Kin/25/60
AV9	<i>ex vitro</i>	AV35	-/32/30	AV36	-/32/30	AV37	-/32/30
AV10	<i>ex vitro</i>	AV38	BA/32/30	AV39	BA/32/30	AV40	BA/32/30
		AV41	2,4-D/32/30	AV42	2,4-D/32/30	AV43	2,4-D/32/30
		AV44	Kin/32/30	AV45	Kin/32/30	AV46	Kin/32/30
		AV47	-/32/60	AV48	-/32/60	AV49	-/32/60
		AV50	BA/32/60	AV51	BA/32/60	AV52	BA/32/60
		AV53	2,4-D/32/60	AV54	2,4-D/32/60	AV55	2,4-D/32/60
		AV56	Kin/32/60	AV57	Kin/32/60	AV58	Kin/32/60

(1)= subcultivo 1, (2)= subcultivo 2, (3)= subcultivo 3, IL= intensidad luminosa ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), R= regulador del crecimiento, T= temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ).

### 5.7 Marcadores neutrales a la selección (MN)

Se probaron tres oligonucleótidos neutrales de cloroplastos *psbA*, *trnK* y *trnL* (Cuadro 3) a un gradiente de temperatura de 40 a 60 $^{\circ}\text{C}$ , para elegir el oligonucleótido y la temperatura adecuada se verificaron los productos de amplificación en geles de agarosa al 1.5% a 100 V en transiluminador de luz ultravioleta. Todas las

amplificaciones se secuenciaron en ambas direcciones por el método de Sanger y Coulson (1975). Las reacciones de PCR obtenidas se secuenciaron en el Laboratorio Nacional de Análisis y Síntesis Ecológica (Escuela Nacional de Estudios Superiores, UNAM, campus Morelia). Se revisaron mediante un electroferograma, se ensamblaron y editaron en el programa MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis versión 10.2.4) (Tamura *et al.*, 2015). Así mismo, las secuencias se compararon con la ayuda del programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés).

Cuadro 3. Secuencias de los oligonucleótidos para amplificación de los marcadores neutrales.

Oligonucleótido	Secuencia
psbA trnH 3' F	ACTGCCTTGATCCACTTGGC
psbA trnH 3' R	CGAAGCTCCATCTACAAATGG
trnK 3' F	CTTCGACTTTCGTGTGCTAG
trnK 3' R	AACTAGTCGGATGGAGTAG
trnL 3' F	GGTTCAAGTCCCTCCCTCTATCCC
trnL 3' R	ATTTGAACTGGTGACACGAG

F= forward, R= reverse

(Yao *et al.*, 2009; Nyffeler, 2002; Valentini *et al.*, 2009)

### 5.7.1 Condiciones de la amplificación

Para la reacción de la PCR se utilizaron siguientes componentes en un volumen final de 15 µl; 7.5 µl de Multiplex®, 1.2 µl de oligonucleótido F, 1.2 µl de oligonucleótido R, 3.2 µl H<sub>2</sub>O y 2 µl de ADN. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 95°C por 15 min como desnaturalización inicial, seguida 95°C por 1 min para abrir ADN, 58°C por 1 min para alineamiento y 1 min a 72°C, de 25 a 35 ciclos, con una extensión final de 5 min a 72°C y finalmente a 10°C para almacenar.

### 5.7.2 Secuenciación

Las amplificaciones obtenidas se ensamblaron y editaron en el programa MEGA X®.

Posteriormente las secuencias se compararon con la ayuda del programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés).

### 5.8 Marcadores Funcionales (MF)

Una vez amplificados los MN, se seleccionaron y amplificaron marcadores funcionales (Cuadro 4) basados en *Dendrobium* sp. (Ryu *et al.*, 2019), donde se reportó variación somaclonal, los tres oligonucleótidos seleccionados denominados como: Longifolia, Jazmonyl y AT2.

Cuadro 4. Secuencias de los oligonucleótidos para amplificación de los genes específicos

Oligonucleótido	Secuencia
Longifolia 3' F	ACTGCCTTGATCCACTTGGC
Longifolia 3' R	CGAAGCTCCATCTACAAATGG
Jazmonyl 3' F	CTTCGACTTTCGTGTGCTAG
Jazmonyl 3' R	AACTAGTCGGATGGAGTAG
AT2 3' F	GGTTCAAGTCCCTCCCTCTATCCC
AT2 3' R	ATTTGAACTGGTGACACGAG

F= forward, R= reverse

(Ryu *et al.*, 2019)

#### 5.8.1 Condiciones de la amplificación

La reacción de la PCR se realizó a un volumen final de 15 µl, 7.5 µl de Mater mix®, 1.2 µl de oligo F, 1.2 µl de oligo R, 3.1 µl H<sub>2</sub>O y 2 µl de ADN. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 95°C por 5 min como desnaturalización inicial, seguida 95°C por 1 min para abrir ADN, 50°C por 1 min para alineamiento y 1 min a 72°C, de 25 a 35 ciclos, con una extensión final de 5 min a 72°C y finalmente a 10°C para almacenar.

### 5.9 Recorte y limpieza de geles

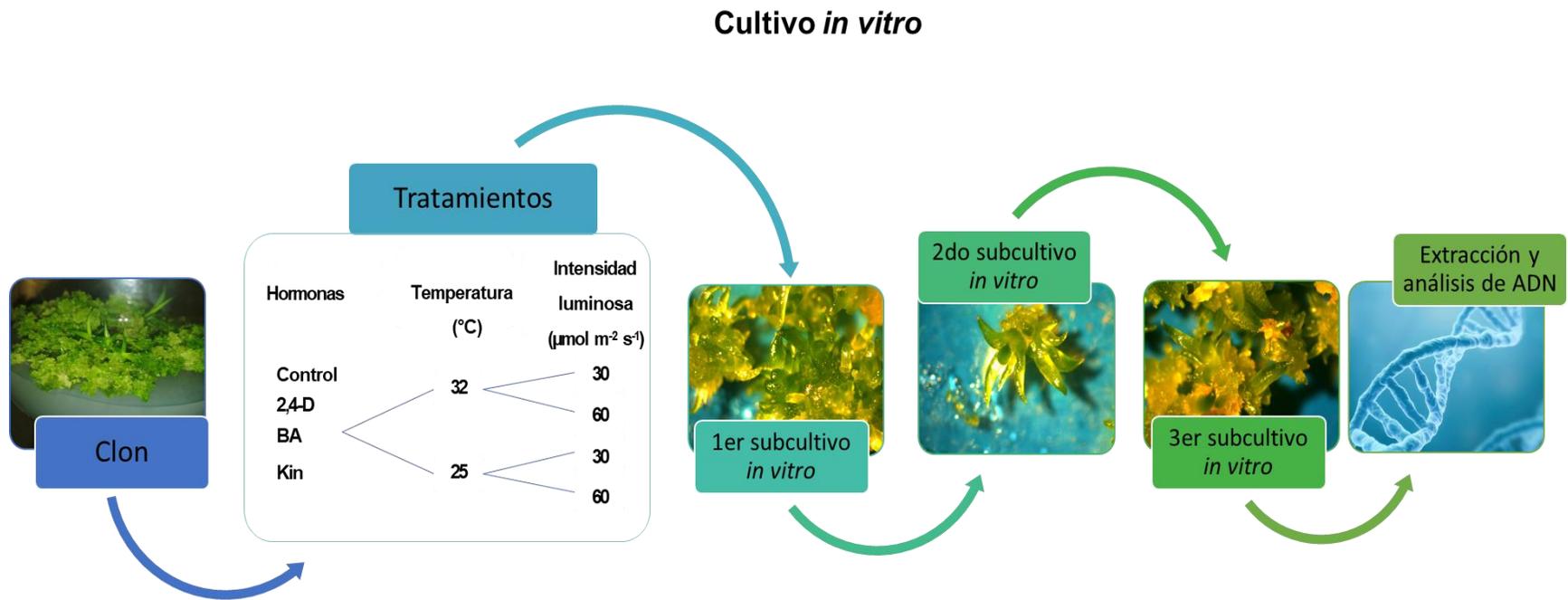
Se amplificaron los marcadores funcionales a un volumen final de 30 µl, se preparó gel

de agarosa al 1.5% y se recortaron las bandas Longifolia 500-600 pb, Jazmonyl 500-600 pb y AT2 200-300 pb, el peso de las bandas se multiplicó por tres volúmenes de la solución W1 del kit de purificación de PCR Thermo Fisher Scientific®, la mezcla se colocó en incubación hasta disolver con ayuda de vortex y agitación, se colocaron 850 µl por tubo de filtrado y se centrifugó a 12 000 rpm durante un minuto, se agregaron 500 µl de W1 y se centrifugó a 12 000 rpm por 3 minutos, el filtro se colocó en tubo de 1.5 µl y se agregaron 50 µl de la solución E1 con un reposo de 10 minutos, posteriormente se centrifugó a 12 000 rpm por 1 minuto y el excedente se almacenó.

### **5.10 Análisis estadístico**

Para conocer el efecto de los tratamientos en el crecimiento en volumen del clon, se utilizó el programa R statistical® mediante el análisis de varianza ANOVA, en cada caso se comprobó la homocedasticidad y la normalidad de los tratamientos. El supuesto de homocedasticidad se analizó mediante la prueba de Bartlett y la normalidad usando la prueba de Shapiro, en todos los casos se encontró que existen diferencias en las varianzas ( $p < 0.05$ ) pero que todas cumplen con el supuesto de normalidad ( $p > 0.05$ ) por lo que se realizó un ANOVA de Welch y una comparación por pares para cada caso. Posteriormente se realizó un análisis multivariado en el programa PAST 2.17® para analizar si existe interacción entre las variables con el análisis de componentes principales y un análisis de coordenadas principales.

La principal función de los análisis multivariados es explorar como las variables medidas explican la distribución que tienen los datos, si hay dentro de esta matriz un orden que ayude a explicar cómo la interacción de las variables influye en el resultado de los datos obtenidos. Son una herramienta que permite interpretar los datos, su principal función es clarificar o permitir ver en un conjunto de datos si hay alguna estructura interna en respuesta a uno o varias variables, o si su distribución es respuesta del azar.



**Figura 3.** Diagrama de flujo de los tratamientos y subcultivo del clon de *A. victoriae-reginae*. Control: sin reguladores del crecimiento, BA: 1.0 mgL, 2,4-D: 1mgL, Kin: 1mgL, Fotoperiodo: 16h luz-8h oscuridad.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Respuestas morfológicas y crecimiento del clon

Los explantes presentaron respuestas embriogénicas, organogénicas o ambas, sin reguladores del crecimiento el 100% de las respuestas fue organogénico con presencia de brotes con yemas en desarrollo, hojas diferenciadas y presencia de raíces pequeñas. Con BA la respuesta fue organogénica en un 100% durante el primer subcultivo, en el segundo subcultivo apareció también la presencia de callo en un 8% y en el tercer subcultivo aumento la respuesta a un 25% con un callo no friable posiblemente embriogénico. Los explantes con kinetina presentaron una respuesta organogénica en un 100% durante el primer subcultivo y segundo subcultivo, en el tercer subcultivo los explantes presentaron una desdiferenciación a callo bastante friable en un 80%. Los explantes con 2,4-D presentaron desde el primer subcultivo una desdiferenciación a callo no friable en un 100%, y la presencia de algunos proembriones; en el segundo subcultivo algunos explantes presentaron alteraciones morfológicas en un 28%; en el tercer subcultivo el porcentaje de alteraciones morfológicas fue de 21%

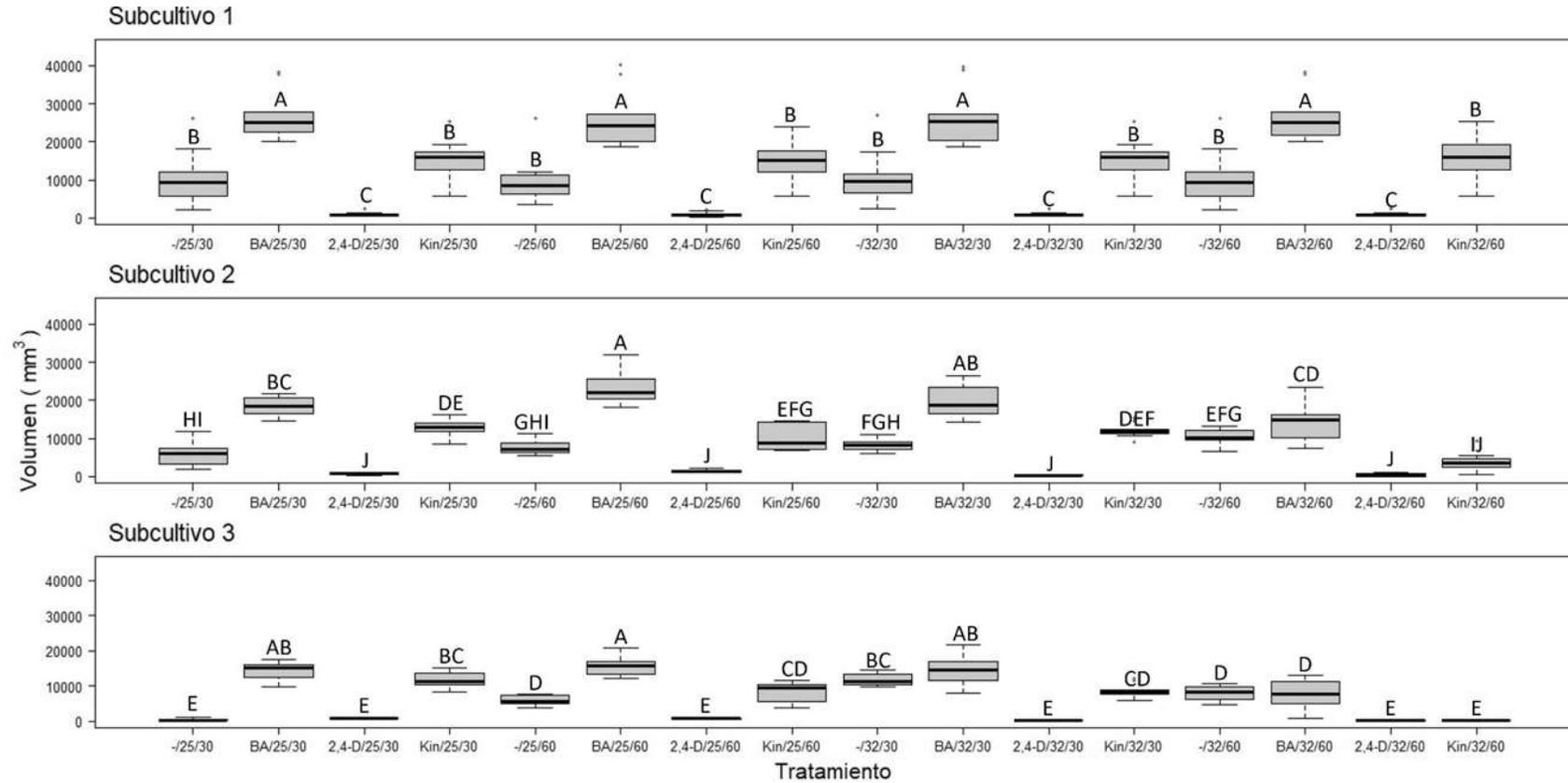
El análisis estadístico mostró que existen diferencias entre los tratamientos (Cuadro 5) las medias de crecimiento en volumen mas altas se presentaron en los tratamientos con BA y sin reguladores de crecimiento, las medias mas bajas se presentaron en los tratamientos con 2,4-D y en el tercer subcultivo con kinetina (Figura 4)

Cuadro 5. Análisis de varianza del crecimiento en volumen del clon en todos los tratamientos con y sin reguladores del crecimiento, intensidad luminosa y temperatura.

	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	Prob > F
<b>Tratamientos</b>	47	2.97E+10	632291792	43.2867	
<b>Error</b>	432	6310256531	14607075		
<b>C. Total</b>	479	3.60E+10			<.0001***

F= variación entre las muestras, DF = Grados de libertad numerador, \*\*\*Altamente significativo.

VARIACIÓN SOMACLONAL EN *Agave victoriae-reginae* T. MOORE



**Figura 4.** Crecimiento en los explantes de *A. victoriae-reginae* cultivados *in vitro*. Reguladores del crecimiento / Temperatura (°C) / Intensidad luminosa ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).

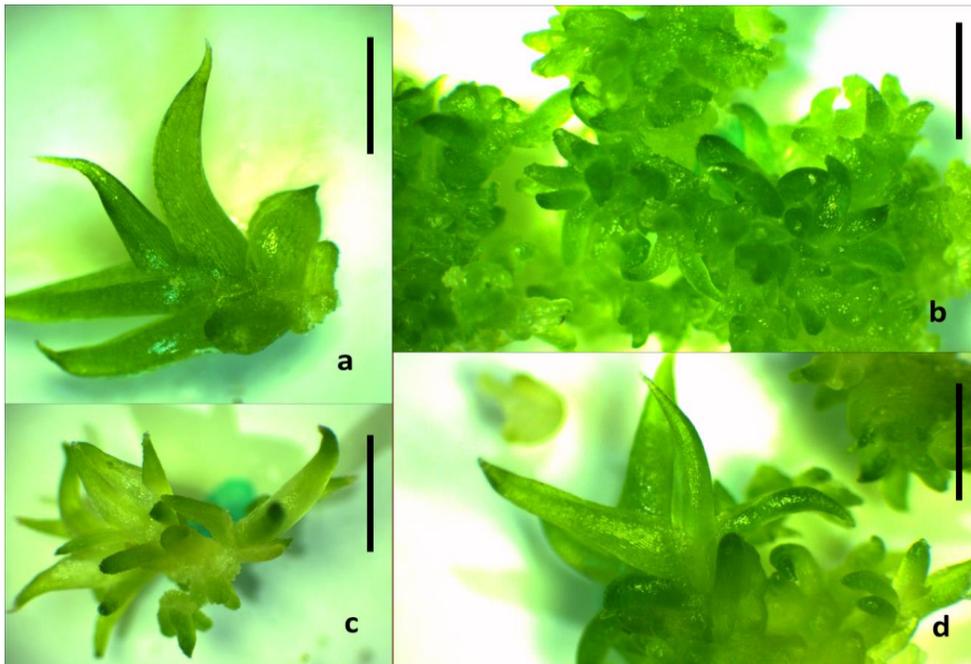
## 6.2 Tratamientos sin reguladores del crecimiento

El clon presentó una respuesta organogénica en los tratamientos sin reguladores de crecimiento, los brotes se caracterizaron por presentar hojas bien definidas y raíces adventicias (Figura 5), la respuesta fue del 100% del tejido. El análisis de varianza mostró que existen diferencias de crecimiento en los tratamientos (Cuadro 6), lo cual se puede observar en el tercer subcultivo del tratamiento bajo  $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y  $25^\circ\text{C}$  (Figura 6).

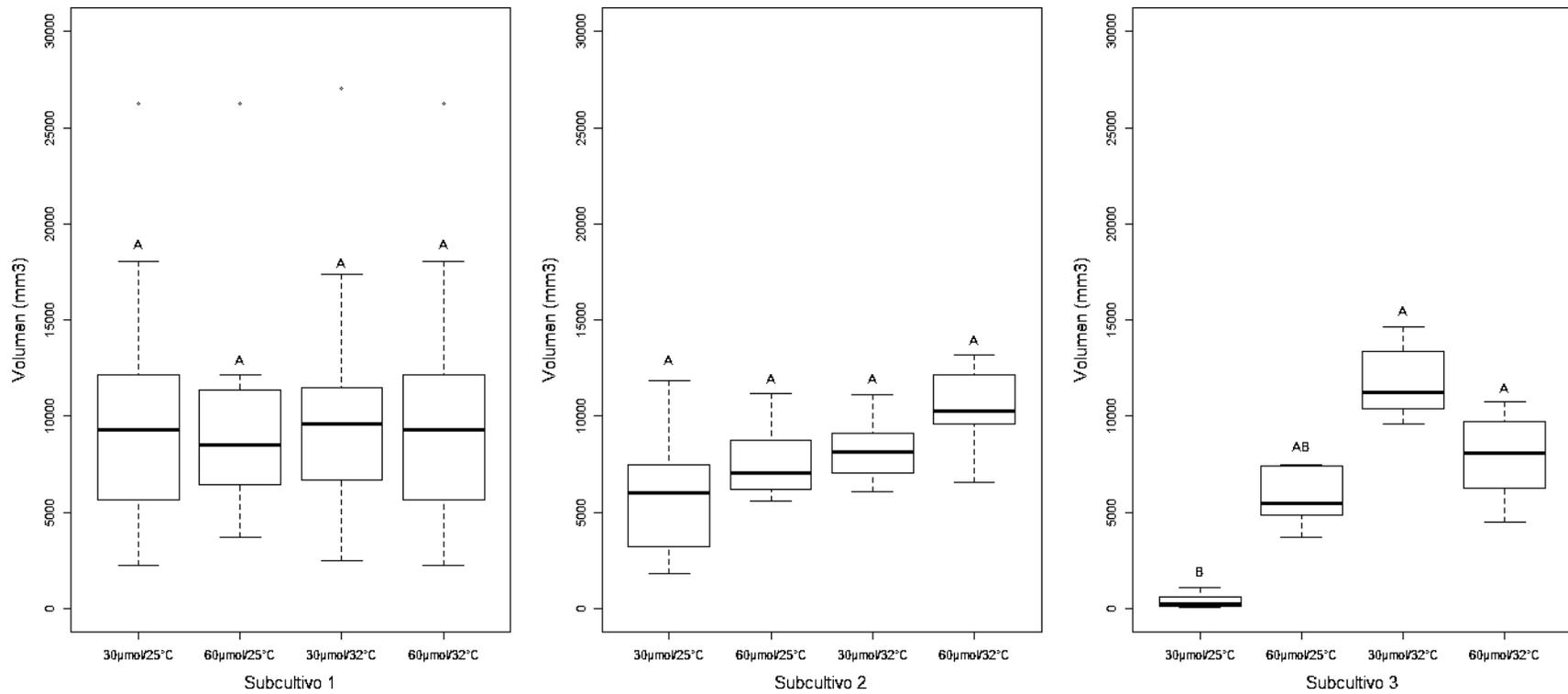
Cuadro 6. Análisis de varianza del crecimiento en volumen del clon sin reguladores del crecimiento en los tratamientos con intensidad luminosa y temperatura.

	F	DF1	DF2	Sig
<b>Control</b>	90.199	11.000	40.432	2.2e-16***

F= variación entre las muestras, DF1 = Grados de libertad numerador, DF2 = Grados de libertad del denominador, Sig= Significancia, \*\*\*Altamente significativo.



**Figura 5.** Brotes de *A. victoriae-reginae* cultivados *in vitro* sin reguladores del crecimiento bajo condiciones de temperatura ( $^\circ\text{C}$ ) / intensidad luminosa ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). a) 25/30; b) 25/60; c) 32/30 d) 32/60. Bar: 0.2 mm.



**Figura 6.** Crecimiento en volumen de brotes de *A. victoriae-reginae* sin reguladores del crecimiento durante tres subcultivos.

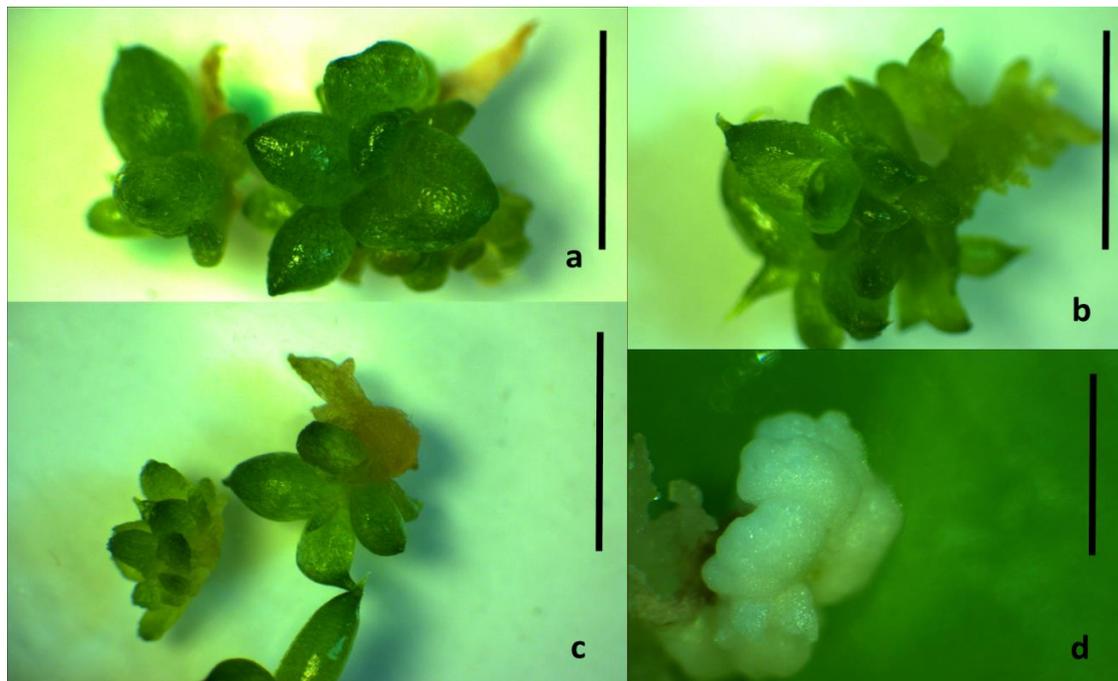
### 6.3 Efecto del BA en el crecimiento y la morfogénesis del clon

En los tratamientos con BA la respuesta fue organogénica en la mayoría de los tratamientos, las hojas de los brotes se observaron más pequeñas y globulares, se caracterizaron por presentar una forma más globular y sin la presencia de raíces adventicias (Figura 7), el tratamiento con  $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y  $32^\circ\text{C}$  presentó tanto una respuesta organogénica con formación de hojas y raíces, así como una respuesta de callo no friable a partir del segundo subcultivo (8%) que aumentó en el tercer subcultivo (25%), el ANOVA mostró diferencias de crecimiento entre los tratamientos (Cuadro 7), (Figura 8).

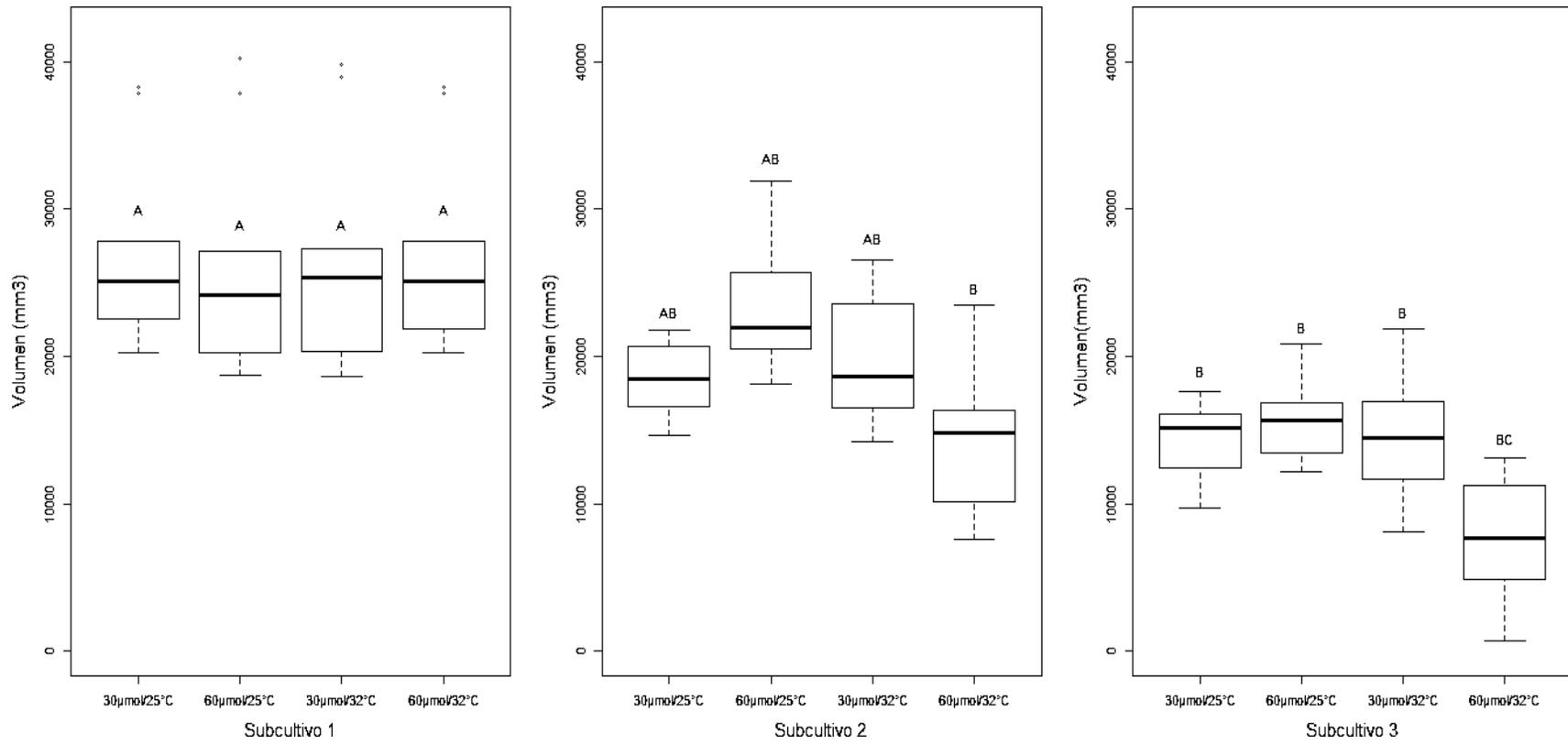
Cuadro 7. Análisis de varianza del crecimiento en volumen del clon con BA en los tratamientos con intensidad luminosa y temperatura.

	F	DF1	DF2	Sig
BA	12.951	11.000	42.318	2.854e-10***

F= variación entre las muestras, DF1 = Grados de libertad numerador, DF2 = Grados de libertad del denominador, Sig= Significancia, \*\*\*Altamente significativo.



**Figura 7.** Respuesta morfogénica en explantes de *A. victoriae-reginae* bajo cultivo *in vitro* con BA, en condiciones de temperatura ( $^\circ\text{C}$ ) / intensidad luminosa ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). a) 25/30; b) 25/60; c) 32/30 d) 32/60. Bar: 0.2 mm.



**Figura 8.** Crecimiento en volumen del explante de *A. victoriae-reginae* con el regulador del crecimiento BA durante tres subcultivos.

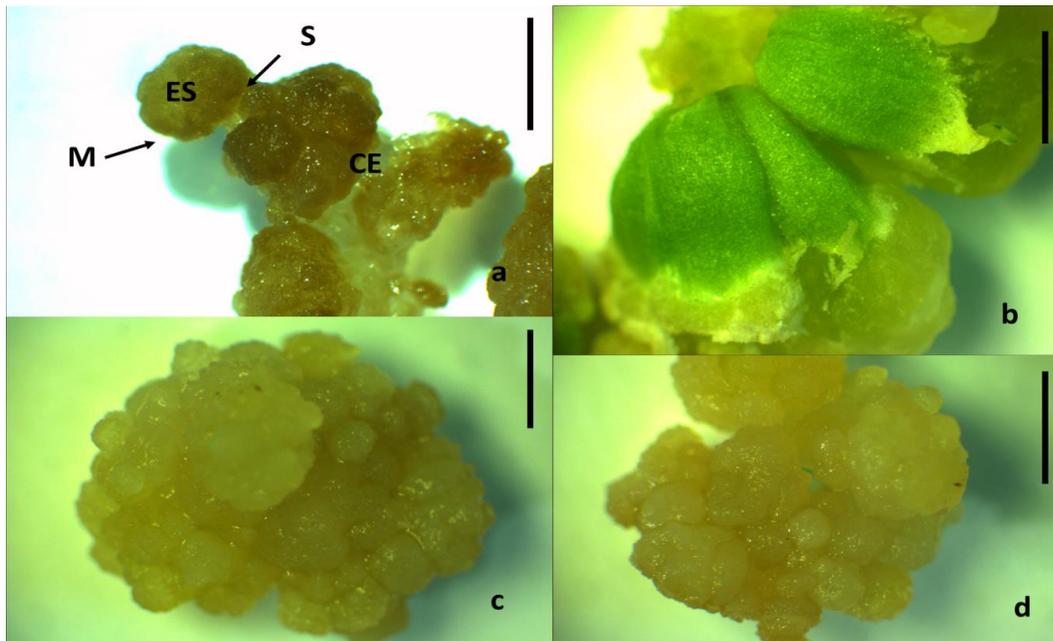
### 6.4 Efecto del 2,4-D en la morfogénesis

Los tratamientos con la auxina 2,4-D presentaron una respuesta embriogénica, el explante se desdiferenció a callo y posteriormente se observó un callo embriogénico poco friable (Figura 9), con presencia de algunos embriones definidos (Figura 9 a, c, d), la respuesta en el crecimiento fue escasa con diferencias en los tratamientos (Cuadro 8, Figura 10).

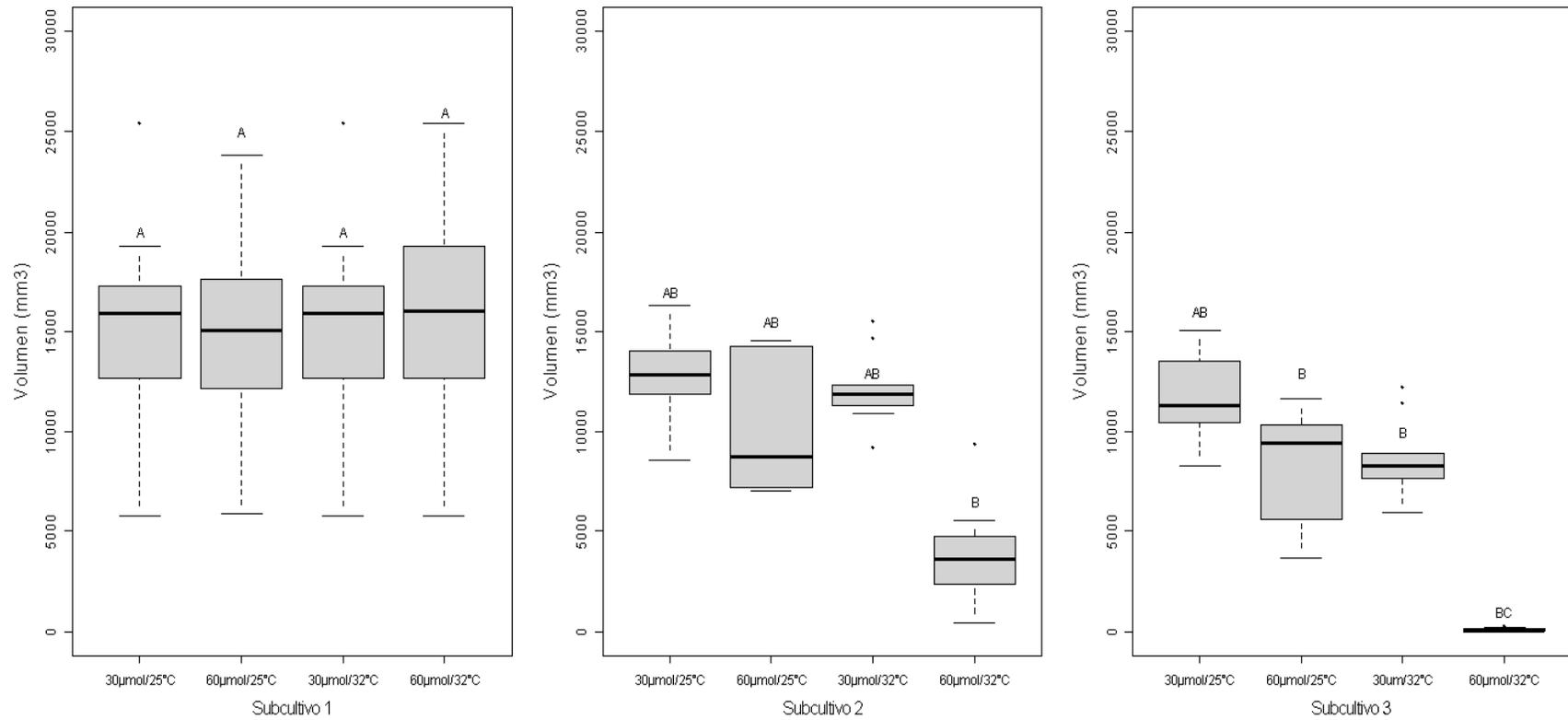
Cuadro 8. Análisis de varianza del crecimiento en volumen del clon con 2,4-D en los tratamientos con intensidad luminosa y temperatura.

	F	DF1	DF2	Sig
2,4-D	62.087	11.000	39.036	2.2e-16***

F= variación entre las muestras, DF1 = Grados de libertad numerador, DF2 = Grados de libertad del denominador, Sig= Significancia, \*\*\*Altamente significativo.



**Figura 9.** Respuesta morfogénica en *A. victoriae-reginae* durante tres subcultivos con 2,4-D a diferente temperatura (°C) / intensidad luminosa ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). a) 25/30; b) 25/60; c) 32/30 d) 32/60. Bar: 0.2



**Figura 10.** Crecimiento en volumen de *A. victoriae-reginae* bajo cultivo *in vitro* con 2,4-D durante tres subcultivos.

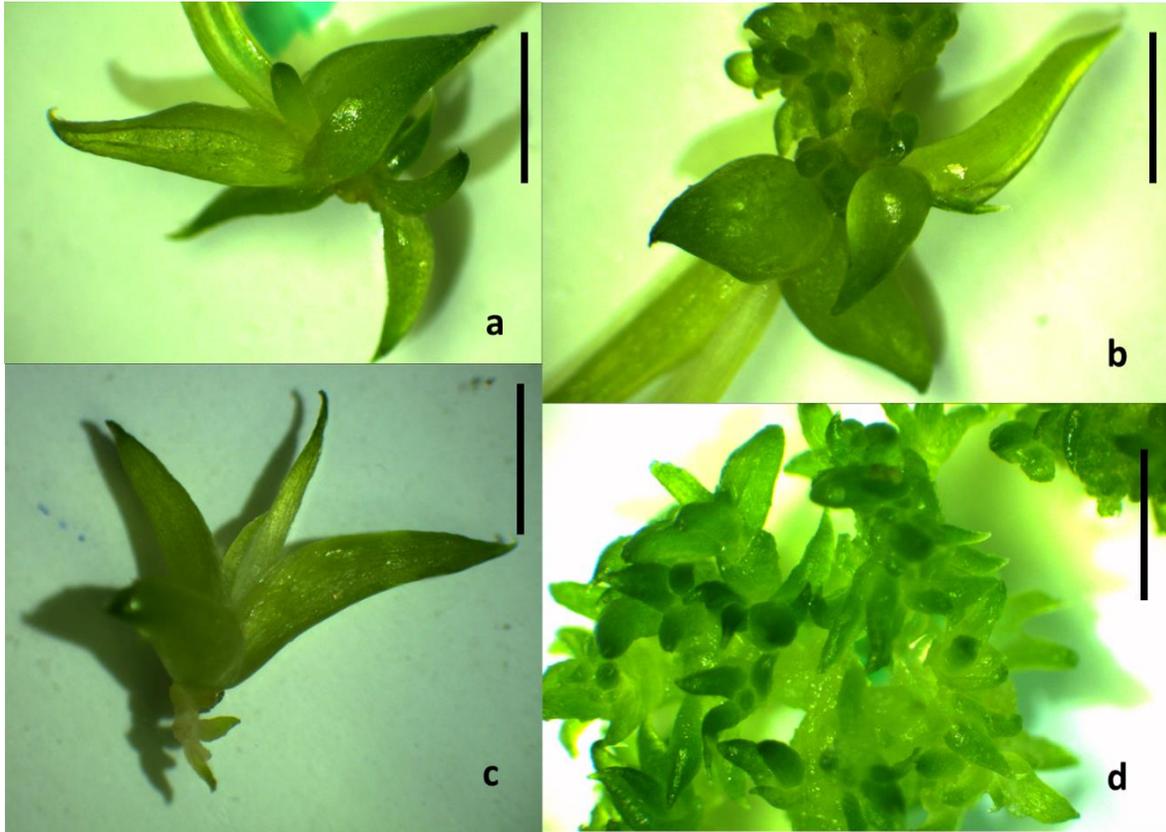
### 6.5 Efecto de la kinetina en la morfogénesis

En los tratamientos con kinetina la respuesta también fue organogénica, las hojas de los brotes se observaron bien desarrolladas, así como raíces presentes, se observó mayor presencia de raíces en los tratamientos con kinetina (12%) (Figura 11), con respuesta organogénica de 100%, presentando brotes durante el primer subcultivo, en el segundo subcultivo también se observó una respuesta de brotes en un 90% y aparecieron zonas con presencia de callo friable (10%), en el tercer subcultivo todos los tratamientos con intensidad luminosa de  $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y temperatura de  $32^\circ\text{C}$  se desdiferenciaron y presentaron una respuesta de callo con posibles proembriones en un 80% (Figura 11), el análisis estadístico mostró diferencias entre los tratamientos (Cuadro 9, Figura 12)

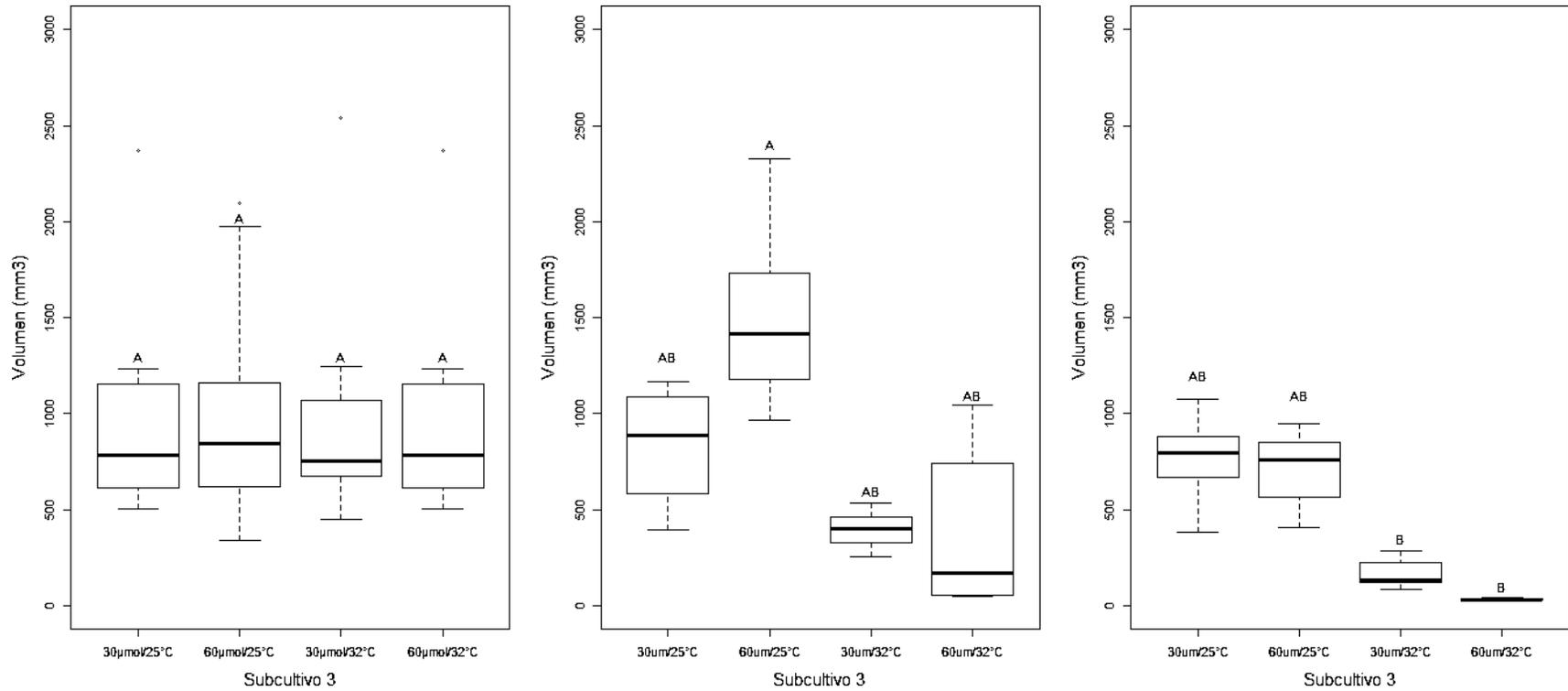
Cuadro 9. Análisis de varianza del crecimiento en volumen del clon con kinetina en los tratamientos con intensidad luminosa y temperatura.

	<b>F</b>	<b>DF1</b>	<b>DF2</b>	<b>Sig</b>
<b>Kinetina</b>	143.96	11.000	39.051	2.2e-16***

F= variación entre las muestras, DF1 = Grados de libertad numerador, DF2 = Grados de libertad del denominador, Sig= Significancia, \*\*\*Altamente significativo.



**Figura 11.** Respuesta morfológica con kinetina en *A. victoriae-reginae* durante tres subcultivos a diferente temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) / intensidad luminosa ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). a) 25/30; b) 25/60; c) 32/30 d) 32/60. Bar: 0.2 mm.



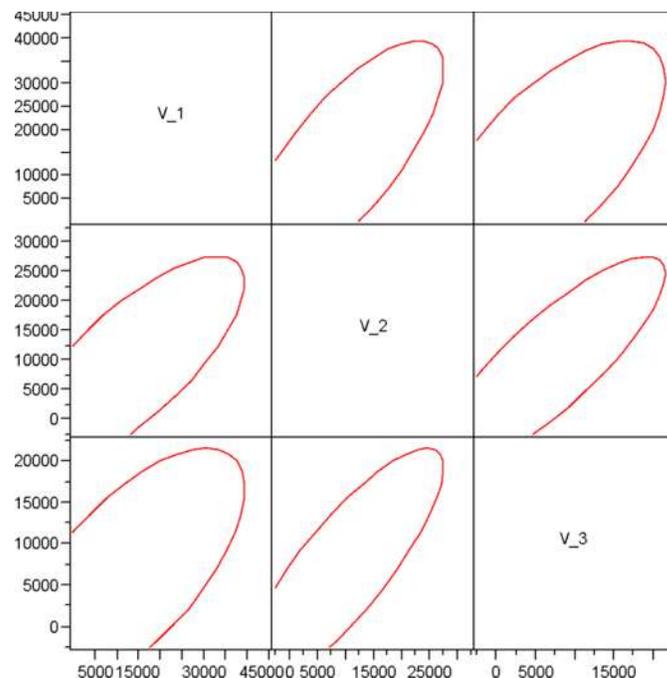
**Figura 12.** Crecimiento del clon de *A. victoriae-reginae* durante tres subcultivos con kinetina.

### 6.6 Análisis de componentes principales

Primero se realizó una prueba de normalidad multivariada (Cuadro 6) donde se observó que no presenta una distribución normal multivariada, sin embargo, se realizó una prueba visual para conocer la efectividad de los métodos en tratar la correlación de las variables (Figura 13) donde se aprecia que si se considera el método multivariado correctamente con sus limitaciones y falta de normalidad multivariada, pueda arrojar ideas sobre el comportamiento de los datos y las variables que generan dicho comportamiento.

Cuadro 10. Pruebas de normalidad multivariada.

Multivariado	Coefficiente	Estadística	Df	p(normal)
<b>Skewness:</b>	2.08	55.47	10	2.57E-08
<b>Skewness corrected:</b>		57.05	10	1.31E-08
<b>Kurtosis:</b>	17.31	2.669		0.0076
<b>Dornik and Hansen omnibus</b>				
<b>Ep:</b>	71.6			
<b>p(normal):</b>	1.92E-13			

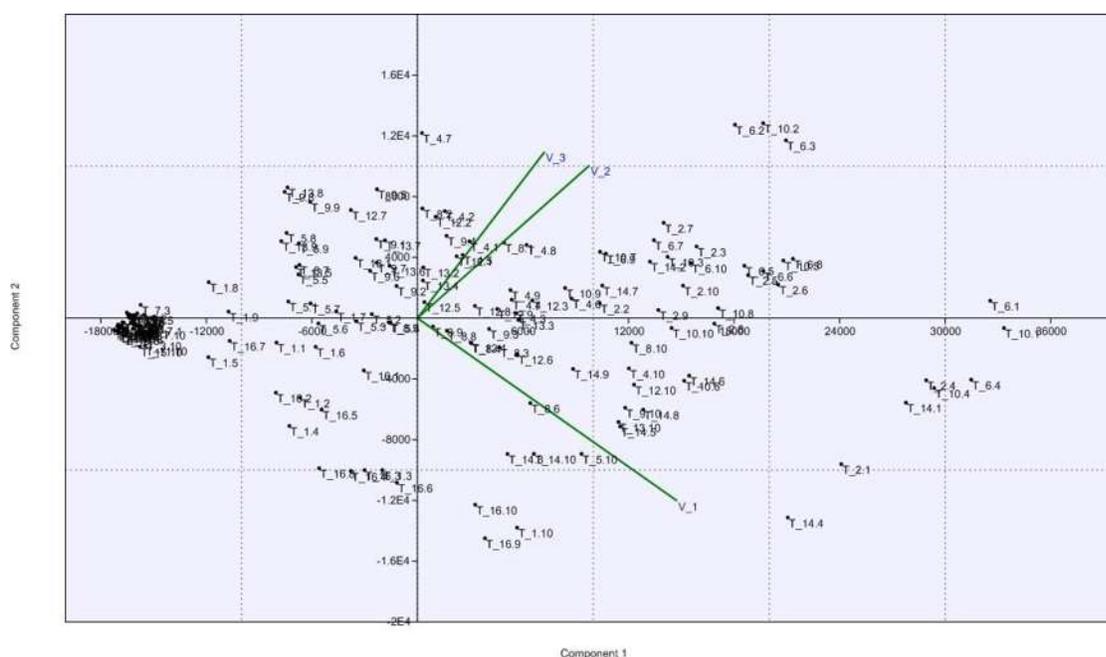


**Figura 13.** Correlación del crecimiento contra los tratamientos sin reguladores del crecimiento, BA, 2,4-D, kinetina, intensidad luminosa y temperatura.

El análisis de componentes principales fue exitoso con respecto a considerar que desde el primer componente se explicaba el 84.9% de la variación encontrada, teniendo poco más del 99% de la variación explicada en los tres componentes (Cuadro 11, Figura 14).

Cuadro 11. Valores y variación explicada dentro de los primeros tres componentes.

PC	Eigenvalue	% variancia
1	1.74E+08	84.939
2	2.43E+07	11.839
3	6.61E+06	3.2216



**Figura 14.** Distribución de datos del crecimiento de *A. victoriae-reginae* contra los tratamientos sin reguladores del crecimiento, BA, 2,4-D, kinetina, intensidad luminosa y temperatura.

En el cuadro 11 podemos observar la proporción de variación que aporta cada variable para cada uno de los componentes. Donde la variable V1 (volumen del primer subcultivo) aporta la mayor parte de la variación, y para el tercer componente la variable V3 (volumen del tercer subcultivo) aporta la mayor parte de la variación explicada.

Cuadro 12. Grado de aportación de cada variable en variación explicada dentro de los tres componentes.

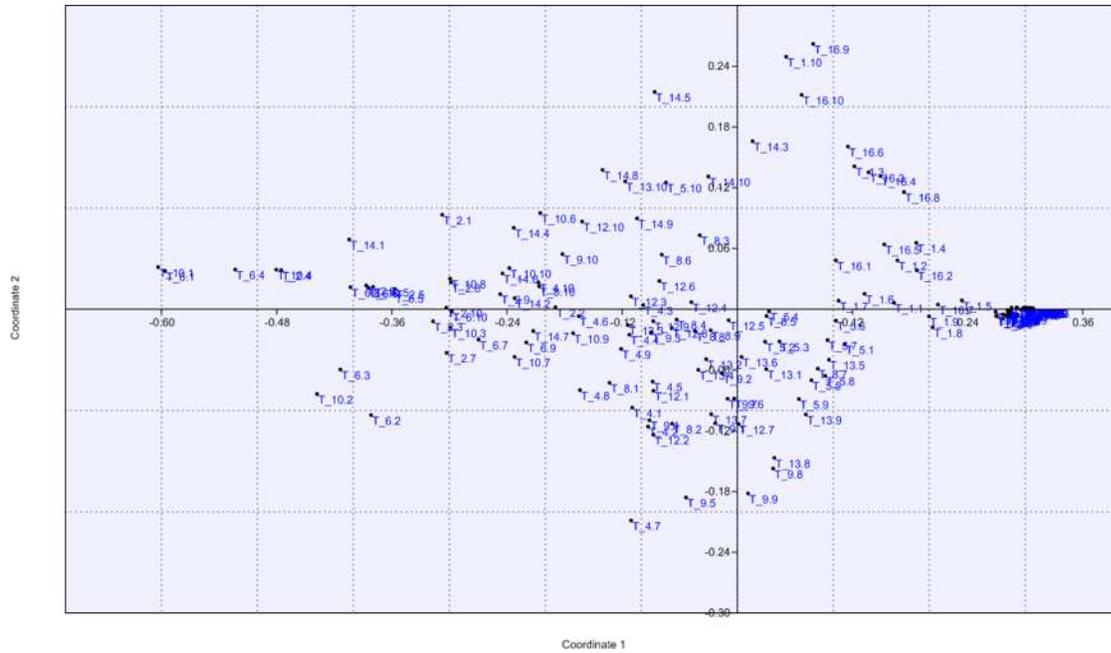
<b>Eigenvalue</b>	1.74E+08	2.43E+07	6.61E+06
<b>Percent</b>	84.9393	11.8392	3.2216
<b>Cum Percent</b>	84.9393	96.7784	100
<b>Eigenvectors</b>			
<b>V1</b>	0.77178	-0.62887	0.0942
<b>V2</b>	0.51132	0.52567	-0.67987
<b>V3</b>	0.37803	0.57288	0.72726

### 6.7 Coordenadas Principales

Los componentes principales también contuvieron más del 70% de variación explicada (Cuadro 13, Figura 15). Se utilizó el método de distancias de Gower, método más utilizado, con un exponente de transformación de dos unidades (es decir, multiplicar por dos para poder apreciar de mejor manera las distancias entre los datos).

Cuadro 13. Valores y variación explicada dentro de los primeros tres componentes.

<b>Axis</b>	<b>Eigenvalue</b>	<b>Porcentaje</b>
<b>1</b>	8.72	67.91
<b>2</b>	0.88	6.88
<b>3</b>	0.33	2.54



**Figura 15.** Gráfico de datos del análisis de coordenadas principales del crecimiento de *A. victoriae-reginae* contra los tratamientos sin reguladores del crecimiento, BA, 2,4-D, kinetina, intensidad luminosa y temperatura.

VARIACIÓN SOMACLONAL EN *Agave victoriae-reginae* T. MOORE

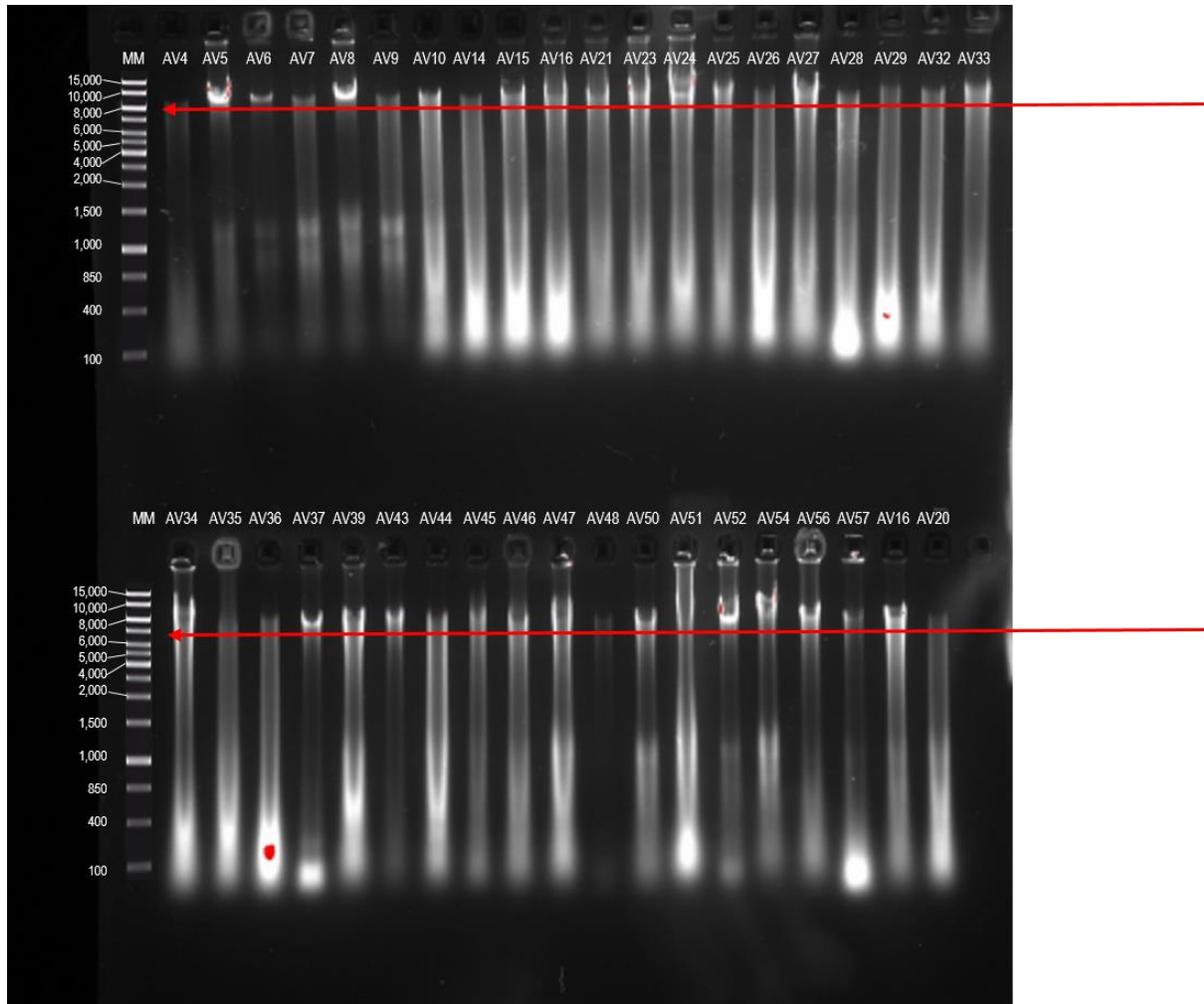
Cuadro 14. Respuestas morfogénicas del clon *A. victoriae-reginae* a los tratamientos sin reguladores del crecimiento, BA, 2,4-D, kinetina, intensidad luminosa y temperatura.

TR	BA	2,4-D	Kin	IL	T	M1	Tky1	RM1	M2	Tky2	RM2	M3	Tky3	RM3	Color TI
1	-	-	-	30	25	10659.91	B	B/100	5822.81	HI	B/100	411.33	E	B/100	VA
2	1.0	-	-	30	25	26770.74	A	B/100	18450.57	BC	B/100	14290.08	AB	B/100	VA
3	-	1.0	-	30	25	958.95	C	ES/100	832.80	J	ES/100	776.16	E	ES/100	A
4	-	-	1.0	30	25	15180.81	B	B/100	12857.93	DE	B/100	11759.16	BC	B/100	VA
5	-	-	-	60	25	10008.45	B	B/100	7654.48	GHI	B/100	5854.57	D	B/100	VA
6	1.0	-	-	60	25	25936.70	A	B/100	23340.93	A	B/100	15756.07	A	B/100	VA
7	-	1.0	-	60	25	1022.46	C	ES/100	1479.84	J	ES/72 *	712.99	E	ES/79 *	A
8	-	-	1.0	60	25	15182.20	B	B/100	10323.70	EFG	B/100	8611.63	CD	B/100	VA
9	-	-	-	30	32	10841.03	B	B/100	8106.82	FGH	B/100	11833.15	BC	B/100	VA
10	1.0	-	-	30	32	26322.47	A	B/100	19677.54	AB	B/100	14773.37	AB	B/100	VA
11	-	1.0	-	30	32	954.56	C	ES/100	390.11	J	ES/100	169.37	E	ES/100	A
12	-	-	1.0	30	32	15181.75	B	B/100	12123.19	DEF	B/100	8682.78	CD	B/100	VA
13	-	-	-	60	32	10659.91	B	B/100	10435.64	EFG	B/100	7938.34	D	B/100	VA
14	1.0	-	-	60	32	26604.76	A	B/100	14824.28	CD	B/92, ES/8	7556.25	D	B/75, ES/25	VA, A
15	-	1.0	-	60	32	958.95	C	ES/100	390.59	J	ES/100	34.11	E	ES/100	VA
16	-	-	1.0	60	32	15882.35	B	B/100	3942.59	IJ	B/90, C/10	107.59	E	B/20, ES/80	A

\*= Presencia de alteraciones morfológicas, 2,4-D= 2,4-Diclorofenoxiacético ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), BA= Benciladenina ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), B = Brotes, C= Callo, Color TI= Color del tejido inductor, ES= Embriones somáticos, IL= Intensidad luminosa ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), Kin= Kinetina, M1= Media del crecimiento ( $\text{mm}^3$ ) 1er subcultivo, M2= Media del crecimiento ( $\text{mm}^3$ ) 2do subcultivo, M3= Media del crecimiento ( $\text{mm}^3$ ) 3er subcultivo, RM1= Respuesta morfogénica / % de la respuesta morfogénica del 1er subcultivo, RM2= Respuesta morfogénica / % de la respuesta morfogénica del 2do subcultivo, RM3= Respuesta morfogénica / % de la respuesta morfogénica del 3er subcultivo, T=Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ), Tky1= Tukey del 1er subcultivo, Tky2= Tukey del 2do subcultivo, Tky3= Tukey del 3er subcultivo, TR=Tratamientos.

## 6.8 Extracción y análisis de ADN

El ADN de las 58 muestras analizadas fue verificado en gel de agarosa, dando como resultado que todas presentaron ADN de alta densidad molecular, entre 8 000 a 12 000 pb (Figura 15).



**Figura 16.** Gel de agarosa para verificar presencia de ADN de calidad. MM= marcador molecular, AV= Bandas de ADN genómico total de *A. victoriae-reginae*.

## 6.9 Cuantificación y estandarización de ADN

Todas extracciones cumplieron con los rangos de pureza en la longitud 260/280 y 260/230 en NanoDrop 2000® por lo que posteriormente se estandarizaron a una concentración de trabajo de 30 ng/μl con agua libre de nucleasas (Cuadro 15).

*Cuadro 15.* Cuantificación y estandarización del ADN de los tratamientos de *A. victoriae-reginae*

Muestra	[ ] ng/μl	260/280	260/230	Vol	Agua
AV 1	718.8	1.97	2.10	4.2	95.8
AV 2	512.8	1.98	2.24	5.0	95
AV 3	422.2	2.10	1.90	4.16	95.9
AV 4	35.8	1.45	0.63	-	-
AV 5	250.4	1.74	1.59	11.98	88.02
AV 6	298.3	1.89	2.03	10.06	89.94
AV 7	106.1	1.92	2.00	28.28	71.72
AV 8	200.3	1.87	1.89	14.98	85.02
AV 9	296.1	1.84	1.75	10.13	89.87
AV 10	216.1	1.77	1.96	13.88	86.12
AV 11	713.8	1.97	2.14	4.2	95.8
AV 12	596.1	1.98	2.24	5	95
AV 13	720.3	2.02	2.19	4.16	95.9
AV 14	627.5	1.85	2.00	4.78	95.22
AV 15	544.4	1.93	1.99	5.51	94.49
AV 16	539.7	1.96	1.89	5.56	94.44
AV 17	439.8	1.98	1.53	6.8	93.2
AV 18	480.6	1.67	.99	6.8	93.2
AV 19	422.2	2.10	1.50	7.1	92.9
AV 20	623.4	2.03	2.00	4.81	95.19
AV 21	1154.4	2.09	2.03	2.60	97.40
AV 22	344.4	2.02	2.00	8.71	91.29
AV 23	729.6	2.03	2.01	4.11	95.89
AV 24	642.6	2.01	1.98	4.67	95.33
AV 25	953.4	2.00	1.88	3.15	96.85
AV 26	397.5	1.98	1.99	7.55	92.45
AV 27	706.4	1.99	1.98	4.25	95.75
AV 28	812.4	1.99	2.00	3.69	96.31
AV 29	747.1	2.04	2.00	4.02	95.98
AV 30	445.4	2.06	1.69	9.4	90.6
AV 31	239.1	2.10	1.82	12.5	87.5
AV 32	703	1.89	1.78	4.27	95.73

VARIACIÓN SOMACLONAL EN *Agave victoriae-reginae* T. MOORE

AV 33	552.3	1.95	2.12	5.43	94.57
AV 34	901.3	2.00	2.00	3.33	96.67
AV 35	735.6	2.03	1.99	4.08	95.92
AV 36	701.4	1.89	2.03	4.28	95.72
AV 37	819.2	1.90	2.02	3.66	96.34
AV 38	570.1	2.07	1.43	5.26	94.8
AV 39	209	1.99	2.00	14.35	85.65
AV 40	121.9	2.02	0.57	24.6	75.4
AV 41	672.6	1.98	1.74	4.4	95.6
AV 42	347	1.99	2.00	8.65	91.35
AV 43	1866.7	1.89	2.00	1.61	98.39
AV 44	108.2	2.02	2.04	27.73	72.27
AV 45	635.9	2.03	2.01	4.72	95.28
AV 46	218.1	2.05	2.01	13.76	86.24
AV 47	741.5	2.03	2.00	4.05	95.95
AV 48	865	1.88	1.93	3.47	96.53
AV 49	1048.4	2.10	2.24	2.86	97.2
AV 50	41.1	1.74	1.82	-	-
AV 51	371.4	1.89	2.02	8.08	91.92
AV 52	3307	2.01	2.01	0.91	99.09
AV 53	617.9	2.11	1.99	4.8	95.2
AV 54	3223.6	2.04	2.00	0.93	99.07
AV 55	1287.8	2.00	1.86	2.3	97.7
AV 56	509	2.01	2.02	5.89	94.11
AV 57	432.3	2.03	2.03	6.94	93.06
AV 58	1484.1	2.0	1.85	2.0	98.0

AV= *Agave victoriae-reginae*, Vol= volumen para 30 ng/μl.

### 6.10 Marcadores neutrales a la selección (MN)

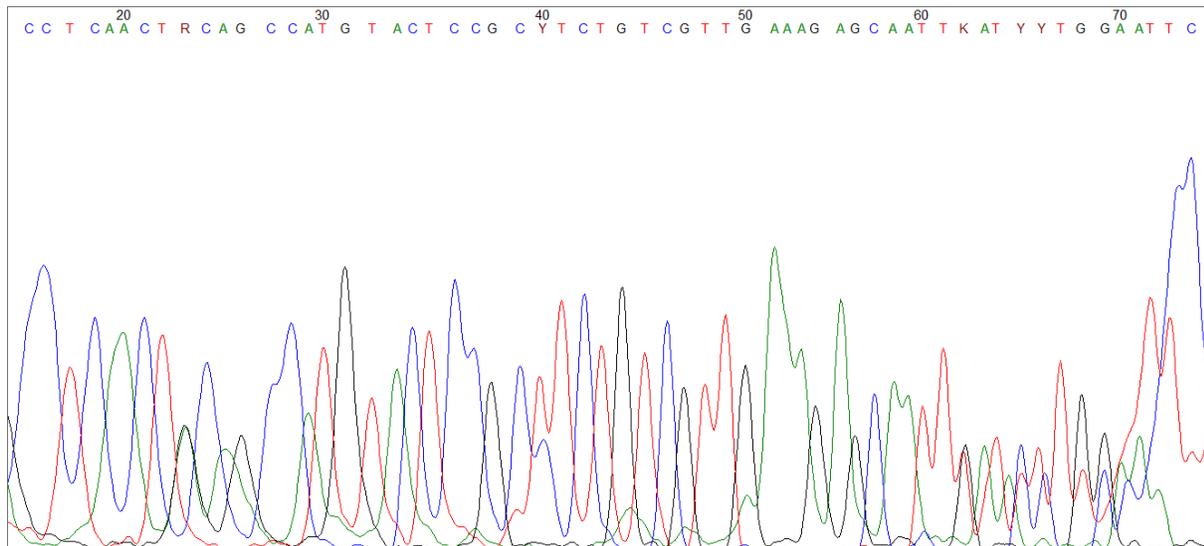
Los tres oligonucleótidos neutrales de cloroplastos lograron amplificar para el clon de *A. victoriae-reginae*, sin embargo, se seleccionó el marcador trnK ya que presentó la secuencia más completa y limpia, la temperatura óptima fue 58°C.

Cuadro 16. Secuencias de los oligonucleótidos para amplificación de los marcadores neutrales.

Oligonucleótido	Secuencia
trnK 3' F	CTTCGACTTTCGTGTGCTAG
trnK 3' R	AACTAGTCGGATGGAGTAG

F= forward, R= reverse

Cada secuencia obtenida se corrigió mediante la IUPAC neucleotide code (Figura 17). De lo anterior, se obtuvieron 42 secuencias (Apéndice A; el cual puede ser consultado en el Repositorio Institucional de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo <http://bibliotecavirtual.dgb.umich.mx:8083/jspui/>)



**Figura 17.** Ejemplo de un electroferograma de una muestra de *A. victoriae-reginae* con el oligonucleótido trnK a 58°C, cada pico de distinto color representa una base nucleotídica.

### 6.11 Marcadores funcionales (MF)

Los marcadores funcionales lograron amplificarse, sin embargo, mostraron muchas bandas impidiendo encontrar el tamaño específico para el clon de *A. victoriae-reginae*, por lo que se realizó en primera instancia la técnica de Gen clean, que tampoco aportó la secuencia buscada.

## 7 DISCUSIÓN

### 7.1 Morfogénesis y crecimiento del clon sin reguladores del crecimiento

Los tratamientos sin reguladores del crecimiento mostraron un crecimiento abundante en los tres subcultivos (Figura 4), tanto en intensidad luminosa de 30 y 60  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y temperatura de 25 y 32°C, aunque el ANOVA mostró diferencias estadísticas en el crecimiento (Cuadro 5), lo anterior muestra el amplio rango de tolerancia a las altas temperaturas y a la alta intensidad luminosa en la especie, la cual, en condiciones naturales se encuentra en zonas geográficas con climas estresantes (García *et al.*, 2017), el tercer subcultivo muestra un bajo crecimiento en el clon a una intensidad luminosa de 30  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y una temperatura de 25°C por lo que el subcultivo continuo (cada 9 semanas) puede ser un factor que limita el crecimiento del clon, el subcultivo a largo plazo juega un papel esencial en la multiplicación y producción a gran escala de plántulas somáticas. Por ejemplo, *Cedrela fissilis* se ha asociado con cambios en los perfiles de hormonas y proteínas así como en una disminución en la respuesta de enraizamiento *ex vitro* (dos Reis de Oliveira *et al.*, 2022).

### 7.2 Efecto de las hormonas, temperatura e intensidad luminosa en el crecimiento del clon

El análisis de componentes explicó el 84.9% de la variación encontrada, teniendo poco más del 99% de la variación explicada en los tres componentes, necesarios para considerarlo significativo donde la intensidad lumínica como la temperatura parece no tener un efecto significativo a través de los tratamientos ni de los subcultivos, no así las hormonas. La hormona BA presenta los volúmenes de crecimiento más altos en todos los tratamientos, es conocido el efecto de esta hormona en los cultivos (Kapchina-Toteva *et al.*, 2005), mientras que la hormona 2,4-D muestra los volúmenes más bajos lo anterior se relaciona con el efecto biológico de cada hormona, la BA estimulando la organogénesis y el 2,4-D promoviendo la embriogénesis (Martínez-Palacios *et al.*, 2003).

### 7.3 Efecto del BA en la morfogénesis

Los explantes sometidos a tratamientos con la citocinina BA presentaron una respuesta organogénica en la mayoría de los tratamientos, cuando se presentó fue caracterizada por la presencia de brotes, Martínez-Palacios (2003) reportó previamente esta respuesta en tallos (plántulas generadas de semilla) de *A. victoriae-reginae* a concentraciones de 1.0 y 0.5 mgL, el clon mostró brotes con hojas pequeñas y globulares en comparación con los tratamientos sin reguladores del crecimiento, debido a la conocida actividad de la BA como promotor de la división celular. En *Lycopersicum esculentum* concentraciones superiores o por debajo de 5  $\mu$ M de BA resultó en un desarrollo lento de brotes (Karthi et al., 1976), para el clon el estímulo de 1 mgL es suficiente para presentar una división celular superior a los tratamientos sin reguladores, respuesta que se mantiene en los tratamientos con temperatura e intensidad de 25°C / 30  $\mu$ mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>; en los tratamientos con 60  $\mu$ mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> y 32°C se observó una respuesta órgano-embriogénica 92-8% respectivamente, durante el segundo subcultivo y una respuesta embriogénica de un 75% durante el tercer subcultivo, en *Ananas comosus* se observó que para el cuarto subcultivo, independientemente de los períodos de incubación, los explantes perdieron el 50% de su capacidad de formación de brotes (Hamad y Taha, 2008).

### 7.4 Efecto del 2,4-D en la morfogénesis

La auxina 2,4-D es conocida por su acción reguladora de la morfogénesis (George, 1993; Song, 2014); presentando una respuesta embriogénica en el clon, los explantes subcultivados se desdiferenciaron a callo y posteriormente se formaron embriones somáticos, se observaron los callos embriogénicos de los cuales emergen los embriones, así como el meristemo apical del brote, el cotiledón y el suspensor de los embriones (Figura 9). Martínez-Palacios (2003) obtuvo embriones de ápices de tallo y proembriones de hoja en *A. victoriae-reginae* a una concentración de 0.5 y 1.0 mg·L<sup>-1</sup>, sin embargo, solo el 50% de los callos generados formaron callos embriogénicos y de estos el 50% se diferenciaron en embriones. Previamente se reportó en el clon un promedio de 97.6% embriones somáticos (ES) en explantes sometidos a 0.5 mg·L<sup>-1</sup> y

83.4% a  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de 2,4-D bajo las mismas condiciones ambientales que el tratamiento control (Pérez-Rangel, 2021 datos no publicados).

En la presente investigación los ES se presentaron en un 95.9% del tejido total; el crecimiento en volumen durante el primer subcultivo se mostró homogéneo entre los tratamientos, sin diferencias estadísticas; durante el segundo subcultivo se observó que el tratamiento con una intensidad luminosa de  $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  y  $25^\circ\text{C}$  mantuvo la media en el crecimiento, sin embargo, se presentaron embriones anormales morfológicamente; al presentar una respuesta organogénica el crecimiento es poco debido al proceso de desdiferenciación, formación de callo y formación de ES, por lo que se registra el menor crecimiento en los tratamientos con 2,4-D, durante el segundo cultivo el crecimiento disminuyó en todos los tratamientos; en el tercer subcultivo se registraron las medias más bajas y solo el tratamiento con intensidad luminosa de  $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  y  $32^\circ\text{C}$  presentó nuevamente embriones anormales. En *Origanum majorana* durante los primeros 2 subcultivos se obtuvo una alta tasa de callo, a partir del tercer y cuarto subcultivo, los regenerantes obtuvieron un bajo crecimiento o no sobrevivieron (Hussein *et. al.*, 2014).

### **7.5 Efecto de la kinetina en la morfogénesis**

Los tratamientos con kinetina presentaron una respuesta organogénica con presencia de brotes, los regenerantes presentaron brotes con hojas bien definidas y se observaron raíces adventicias, en los tratamientos con BA aunque los brotes fueron abundantes con las medias en crecimiento más altas, se obtuvieron hojas de solo 0.1 mm en promedio ya que se encuentran estimuladas con una división continua y acelerada, las hojas de los brotes con kinetina lograron un tamaño superior a los 0.4 mm en promedio. En una investigación previa en el clon de *A. victoriae-reginae* con  $0.5$  y  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de kinetina en presencia de luz ( $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), también mostró una respuesta abundante de brotes con un volumen medio de 17090 y 6358  $\text{mm}^3$  respectivamente (Pérez-Rangel, 2021; datos no publicados), el ANOVA mostró diferencias entre los tratamientos, durante el primer subcultivo la respuesta en crecimiento fue abundante y homogénea entre las medias de todos los tratamientos,

en el segundo subcultivo, las medias disminuyeron y en el tratamiento con  $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y  $32^\circ\text{C}$  se presentó la media más baja, en el tercer subcultivo el crecimiento volvió a disminuir y el tratamiento con  $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y  $32^\circ\text{C}$  presentó la media más baja.

### **7.6 Efecto de la luz**

A partir del segundo subcultivo en el tratamiento con 2,4-D y una intensidad luminosa de  $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , se observaron embriones atípicos morfológicamente en un 27% de la respuesta morfogénica durante el segundo subcultivo y 21% en el tercer subcultivo. Garcia y col. (2019) indican que cualquier condición que induce estrés en el cultivo, como los componentes del medio y las condiciones ambientales pueden inducir anomalías en la morfología de los embriones.

En *Rosa chinensis* la luz blanca con una intensidad de  $27 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  provoca la formación de embriones sin cotiledones (Chen *et al.*, 2014) y en *Daucus carota* la luz blanca con una intensidad de  $200\text{-}300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  induce anomalías embrionarias como cotiledones múltiples, radículas ramificadas y elongación del hipocótilo (Michler y Lineberger, 1987). La auxina 2,4-D a altas concentraciones induce anomalías en embriones de *Hovenia dulce* (Yang *et al.*, 2013), *Theobroma cacao* (Garcia *et al.*, 2016), *Glicine max* (Shoemaker *et al.*, 1991) y *Capsicum chinense* (López-Puc *et al.*, 2006).

### **7.7 Efecto de la temperatura**

En los tratamientos con una temperatura de  $32^\circ\text{C}$  no se observó alguna anomalía en las respuestas morfogénicas, en los tratamientos con respuesta organogénica los brotes se caracterizaron por presentar hojas bien definidas y en algunos casos con presencia de raíces; en el tratamiento con respuesta embriogénica se observó callo embriogénico con algunos embriones somáticos y sus estructuras características. *Agave* es un género con metabolismo CAM que se caracteriza por sus adaptaciones únicas al estrés ambiental (García *et al.*, 2017), por lo que el aumentar la temperatura durante el cultivo no afectó la abundancia de los brotes ni de los embriones somáticos.

### **7.8 Efecto de la luz y temperatura**

El tratamiento con BA presentó una respuesta órgano-embriogénica cuando la intensidad luminosa se aplicó a  $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  con una temperatura de  $32^{\circ}\text{C}$ , a las 11 semanas el tejido se observó con zonas embriogénicas y organogénicas con los brotes poco diferenciados y callos embriogénicos con la formación de embriones somáticos, a las 20 semanas los brotes y los embriones somáticos se observaron con claridad. La citocinina son conocidas por promover la división celular en los tejidos vegetales por lo que a menudo son adicionados al medio de cultivo para estimular el crecimiento y desarrollo de los brotes (George, 1993), en tallos de *A. victoriae-reginae* Martínez-Palacios (2003) indicó que la BA favorece el desarrollo de los embriones y que al aplicarla a 0.5 y 1.0 mg·L<sup>-1</sup> se favorece la proliferación de brotes, también indicó que solo en un explante se vio favorecido la inducción de callo usando una concentración de 1.0 mg.

El análisis multivariado muestra por la distribución de los datos, tanto la intensidad lumínica como la temperatura no tuvieron un efecto significativo en el crecimiento a través de los tratamientos, ya que se encuentran repartidos de manera uniforme en toda la nube de datos.

### **7.9 Secuenciación de marcadores neutrales a la selección (MN).**

Se obtuvieron 42 lecturas en ambas direcciones por el método de Sanger y Coulson (1975). Los resultados de la secuenciación de MN indican que no se presentan cambios genéticos entre los tratamientos y que tampoco hay cambios entre los tejidos tomados como control de hojas cultivadas *ex vitro* y el clon, lo cual es debido a la naturaleza misma de estos marcadores, ya que estos no están sujetos a selección natural, por lo que no detectan variaciones en el ADN que cambien rasgos metabólicos o fenotípicos, los MN sólo pueden proporcionar una visión parcial de parámetros como diversidad genética, adaptación local, potencial evolutivo, tamaño efectivo de la población y designaciones taxonómicas (Kirk y Freeland, 2011).

### **7.10 Secuenciación de marcadores funcionales (MF).**

Aunque no se logró secuenciar con marcadores funcionales, es necesario el uso de estos para comparar con los marcadores neutrales y así poder resolver las incógnitas acerca de si existe variación somaclonal en el clon, así mismo, se propone lograr la secuenciación utilizando la técnica de PCR touchdown, con el fin de analizar todas las bandas que se amplifican y verificar si alguna coincide para *A. victoriae-reginae*, lo que permitiría analizar si existe variación somaclonal en los tratamientos.

## 8. CONCLUSIONES

- Debido a que no fue posible secuenciar con los marcadores funcionales, las hipótesis no se pudieron poner a prueba y los objetivos se cumplieron parcialmente al registrar solo la respuesta morfogénica sin el análisis genético completo.
- El clon muestra un crecimiento rápido en todos los tratamientos sin reguladores del crecimiento. En el tercer subcultivo el mayor crecimiento se presentó en los tratamientos con 32°C, el cual presentó una respuesta organogénica con hojas bien definidas de una coloración verde y presencia de raíces.
- En los tratamientos con BA presentó una respuesta organogénica durante los tres subcultivos. El tratamiento con una intensidad luminosa de 60  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y 32°C presentó una respuesta inicial organogénica y en el tercer subcultivo una respuesta mayormente embriogénica.
- Los tratamientos con 2,4-D presentaron una respuesta embriogénica con presencia de callo embriogénico y embriones somáticos definidos. El tratamiento con una intensidad luminosa de 60  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  presentó embriones con alteraciones morfológicas desde el segundo subcultivo.
- Los explantes con kinetina presentaron una respuesta organogénica con un crecimiento estadísticamente igual en comparación con los tratamientos sin reguladores del crecimiento, pero con mayor presencia de raíces.
- Las variantes morfogénicas obtenidas fueron registradas para poder relacionar los cambios morfológicos, como posibles causales de la variación somaclonal en caso de presentarse al analizar los tratamientos con los marcadores funcionales, debido a que no se logró secuenciar con ellos, es un objetivo aun a resolver.

## 9. LITERATURA CITADA

- Ahmed, E. U., Hayashi, T., & Yazawa, S. (2004). Auxins increase the occurrence of leaf-colour variants in *Caladium* regenerated from leaf explants. *Scientia horticulturae*, 100(1-4), 153-159.
- Alfaro-Rojas, G., Legaria-Solano, J. P., & Rodríguez-Pérez J. E. (2006). Diversidad genética en poblaciones de agaves pulqueros (*Agave* spp.) del nororiente del Estado de México. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 30, 1-2.
- Almaraz-Abarca, N., Delgado-Alvarado, E. A., Torres-Morán, M. I., Herrera-Corral, J., Ávila-Reyes, J. A., Naranjo-Jiménez, N., & Uribe-Soto, J. N. (2013). Genetic variability in natural populations of *Agave durangensis* (Agavaceae) revealed by morphological and molecular traits. *The Southwestern Naturalist*, 58(3), 314-324.
- Andersen, J. R., & Lübberstedt, T. (2003). Functional markers in plants. *Trends in plant science*, 8(11), 554-560.
- Azofeifa-Delgado, Á. (2006). Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. *Agronomía mesoamericana*, 221-224
- Bahmankar, M., Mortazavian, S. M. M., Tohidfar, M., Sadat Noori, S. A., Izadi Darbandi, A., Corrado, G., & Rao, R. (2017). Chemical compositions, somatic embryogenesis, and somaclonal variation in cumin. *BioMed research international*.
- Bairu, M. W., Aremu, A. O., & Van Staden, J. (2011). Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. *Plant Growth Regulation*, 63(2), 147-173.
- Bairu, M. W., Fennell, C.W. & Van Staden, J. (2006). The effect of plant growth regulators on somaclonal variation in *Cavendish banana* (*Musa* AAA cv 'Zelig'). *Scientia Horticulturae*. 108 (4), 347-351.

- Bajaj, Y. P. S. (1990). Somaclonal variation-origin, induction, cryopreservation, and implications in plant breeding. In *Somaclonal variation in crop improvement I*, Springer, 3-48.
- Bennici, A., Anzidei, M., & Vendramin, G. G. (2004). Genetic stability and uniformity of *Foeniculum vulgare* Mill. regenerated plants through organogenesis and somatic embryogenesis. *Plant science*, 166(1), 221-227.
- Bhattacharyya, G. N. (1968). Chromosomes in different species of Agave. *Journal of Cytology and Genetics*, 3, 1-6.
- Binns, A. N., & Meins, F. (1980). Chromosome number and the degree of cytokinin habituation of cultured tobacco pith cells. *Protoplasma*, 103(2), 179-187.
- Bouman, H., & De Klerk, G. J. (2001). Measurement of the extent of somaclonal variation in begonia plants regenerated under various conditions. Comparison of three assays. *Theoretical and Applied Genetics*, 102(1), 111-117.
- Browsers, M. A., & Orton, T. J. (1982). A factorial study of chromosomal variability in callus cultures of celery (*Apium graveolens*). *Plant Science Letters*, 26(1), 65-73.
- Castillo, A. (2004). Propagación de plantas por cultivo in vitro: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. *INIA*.
- Chaturvedi, H. C., & Mitra, G. C. (1975). A shift in morphogenetic pattern in *Citrus callus* tissue during prolonged culture. *Annals of Botany*, 39(4), 683-687.
- Chen, J. R., Wu, L., Hu, B. W., Yi, X., Liu, R., Deng, Z. N., & Xiong, X. Y. (2014). The influence of plant growth regulators and light quality on somatic embryogenesis in *China rose* (*Rosa chinensis* Jacq.). *Journal of Plant Growth Regulation*, 33(2), 295-304.
- Chin, C. K., Lee, Z. H., Mubbarakh, S. A., Antony, J. J. J., Chew, B. L., & Subramaniam, S. (2019). Effects of plant growth regulators and activated

charcoal on somaclonal variations of protocorm-like bodies (PLBs) of *Dendrobium* Sabin Blue orchid. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 22, 101426.

China Plant BOL Group 1, Li, D. Z., Gao, L. M., Li, H. T., Wang, H., Ge, X. J., ... & Duan, G. W. (2011). Comparative analysis of a large dataset indicates that internal transcribed spacer (ITS) should be incorporated into the core barcode for seed plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(49), 19641-19646.

Cloutier, S., & Landry, B. S. (1994). Molecular markers applied to plant tissue culture. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 30(1), 32-39.

Colín, R. (2006). Análisis de la diversidad genética y estructura poblacional de *Agave xylonacantha* (Agavaceae) utilizando "Inter Simple Sequence Repets" (ISSR) como marcador molecular. Tesis de Licenciatura, Biología. Facultad de Ciencias, UNAM, D.F., México.

Collard, B. C., Jahufer, M. Z. Z., Brouwer, J. B., & Pang, E. C. K. (2005). An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: the basic concepts. *Euphytica*, 142(1), 169-196.

Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres. (2017). Apéndices I, II y III. Recuperado de: <https://www.cites.org/esp/app/appendices.php>.

d'Amato, F. (1975). The problem of genetic stability in plant tissue and cell cultures. *Crop genetic resources for today and tomorrow*, 333-348.

Davies, P. J. (1995). *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. Kluwer Academic, Dordrecht, Boston.

Demey, J. R., Gamez, E., Molina, S., & Infante, D. (2004). Comparative study of the discriminating capacity of AFLP and ISTR markers for genetic analysis of *Agave*

*fourcroydes*. *Plant Molecular Biology Reporter*, 22(1), 29-35.

Díaz-Martínez, M., Nava-Cedillo, A., Guzmán-López, J. A., Escobar-Guzmán, R., & Simpson, J. (2012). Polymorphism and methylation patterns in *Agave tequilana* Weber var. 'Azul' plants propagated asexually by three different methods. *Plant Science*, 185, 321-330.

Dixon, R. A., (1985). *Plant cell culture: a practical approach*. Department of Biochemistry, Royal Holloway College, Egham Hill, Egham, Surrey TW20 OEX, UK.

dos Reis de Oliveira, T., Balfagón, D., de Sousa, K. R., Mesquita-Aragão, V. P., de Oliveira, L. F., Segal-Floh, E. I., Silveira, V., Gómez-Cadenas, & Santa-Catarina, C. (2022). Long-term subculture affects rooting competence via changes in the hormones and protein profiles in *Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae) shoots. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 148(1), 137-153.

Doyle, J. (1991). DNA protocols for plants. In *Molecular techniques in taxonomy* (pp. 283-293). Springer, Berlin, Heidelberg.

Eguiarte, L. E., Souza, V. & Aguirre, X. (2007). *Ecología molecular*. Instituto Nacional de Ecología.

Figueredo, C. J., & Nassar, J. M. (2011). Population genetics of *Agave cocui*: evidence for low genetic diversity at the southern geographic limit of genus *Agave*. *Journal of Heredity*, 102(3), 306-314.

Garcia, C., Corrêa, F., Findley, S., Almeida, A. A., Costa, M., Motamayor, J. C., Schnell, R., & Marelli, J. P. (2016). Optimization of somatic embryogenesis procedure for commercial clones of *Theobroma cacao* L. *African Journal of Biotechnology*, 15(36), 1936-1951.

Garcia, C., de Almeida, A. A. F., Costa, M., Britto, D., Valle, R., Royaert, S., & Marelli, J. P. (2019). Abnormalities in somatic embryogenesis caused by 2, 4-D: an

overview. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 137(2), 193-212.

García, M. A. J., Cházaro, B. M. J., Nieto, S. J., Sánchez, T L. F., Tapia, C. E., Gómez, L. J.F., Tamayo, O. M., Narváez, Z. J. A., Rodríguez, G. B., G.A. Palomino, H. G. A., Martínez, R. J., Martínez, R. J. C., Quiñones, A. E. E., Rincón, E. G., Beltrán, G. M. J., Quí, Z. J. A., Guzmán, M. R., Mercado, F. Y., Ragazzo, S. J. A, Calderón, S. M., y Gutiérrez, M. A. (2017). Agave. *In: Saenz Ramos. Panorama del Aprovechamiento de los Agaves en México.* (pp. 21-23). Guadalajara, México.

García-Mendoza, A. J., Cházaro, B. M. J., Nieto, S. J., Sánchez, T. L. F., Tapia, C. E., Gómez-Leyva, J. F., & AGARED (Red temática mexicana aprovechamiento integral sustentable y biotecnología de los Agaves). (2017). Los agaves. *AGARED (Red temática mexicana aprovechamiento integral sustentable y biotecnología de los Agaves) (Eds.), Panorama del aprovechamiento de los agaves en México*, 15-65.

Gaspar, T., Kevers, C., Faivre-Rampant, O. (2003). Changing concepts in plant hormone action. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant.* 39 (85).

Gentry, S. H. (1982). *Agaves of Continental North America.* University of Arizona Press, Tucson.

George, E. F. (1993). *Plant Propagation by Tissue Culture. The Technology.* (2<sup>da</sup> ed., Vols 1-2). Edington, Wilts, England: Exegetics Limited.

Gesteira, A. S., Otoni, W. C., Barros, E. G., & Moreira, M. A. (2002). RAPD-based detection of genomic instability in soybean plants derived from somatic embryogenesis. *Plant Breeding*, 121(3), 269-271.

Gil-Vega, K., González-Chavira, M., Martínez de la Vega, O., Simpson, J., & Vandemark, G. (2001). Analysis of genetic diversity in *Agave tequilana* var. Azul using RAPD markers. *Euphytica*, 119(3), 335-341.

Giménez, C., De Garcia, E., De Enrech, N. X., & Blanca, I. (2001). Somaclonal

variation in banana: cytogenetic and molecular characterization of the somaclonal variant CIEN BTA-03. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 37(2), 217-222.

González, A. (2004). *Biología reproductiva y genética de poblaciones del Agave garciae-mendozae* (Doctoral dissertation, Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM, México, DF, México).

González, E. G. (2003). Microsatélites: sus aplicaciones en la conservación de la biodiversidad. *Graellsia*, 59(2-3), 377-388.

González, G., Alemán, S., & Infante, D. (2003). Asexual genetic variability in *Agave fourcroydes* II: selection among individuals in a clonally propagated population. *Plant Science*, 165(3), 595-601.

Gould, A. R. (1986). Factors controlling generation of variability in vitro. *Plant regeneration and genetic variability*, 549-567.

Gross, S. M., Martin, J. A., Simpson, J., Abraham-Juárez, M. J., Wang, Zhong. & Visel, A. *Ensamblaje del transcriptoma de novo* de plantas CAM tolerantes a la sequía, *Agave deserti* y *Agave tequilana*. *BMC Genomics* 14 , 563 (2013).

Guillén, S., Martínez-Palacios, A., Martínez, H., Martínez-Ávalos, J. G., (2015). Organogénesis y embriogénesis somática de *Beaucarnea inermis* (Asparagaceae), una especie amenazada del noreste de México. *Botanical Sciences*, 93(2): 221-230.

Gupta, S. D., & Jatothu, B. (2013). Fundamentals and applications of light-emitting diodes (LEDs) in in vitro plant growth and morphogenesis. *Plant Biotechnology Reports*, 7(3), 211-220.

Halda, J. J. (2000). *Agave victoriae-reginae* subsp. *swobodae*. *Acta Musei Richnoviensis. Sectio Natura*, 7(2), 71.

Hamad, A. M., & Taha, R. M. (2008). Effect of sequential subcultures on in vitro

---

proliferation capacity and shoot formations pattern of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.) over different incubation periods. *Scientia Horticulturae*, 117(4), 329-334.

Hartl, D. L. (1988). *A primer of population genetics*. Sinauer Associates, Inc.

Hartmann, C., Henry, Y., De Buyser, J., Aubry, C., & Rode, A. (1989). Identification of new mitochondrial genome organizations in wheat plants regenerated from somatic tissue cultures. *Theoretical and applied genetics*, 77(2), 169-175.

Hossain, M. A., Konisho, K., Minami, M., & Nemoto, K. (2003). Somaclonal variation of regenerated plants in chili pepper (*Capsicum annum* L.). *Euphytica*, 130(2), 233-239.

Hussein, Y., Amin, G., Hashem, E., & Youssef, K. (2014). *In-vitro* Cultivation of Marjoram (*Origanum majorana* L.) under influence of 2,4-D (2,4-Dichlorophenoxy Acetic Acid) as herbicide. *Life Sci J*, 11(2), 249-57.

Idrees, M. & Irshad, M. (2014). Molecular markers in plants for analysis of genetic diversity: a review. *European academic research*, 2(1), 1513-1540.

Jackson, J. A., & Dale, P. J. (1988). Callus induction, plant regeneration and an assessment of cytological variation in regenerated plants of *Lolium multiflorum* L. *Journal of plant physiology*, 132(3), 351-355.

Jin, S., Mushke, R., Zhu, H., Tu, L., Lin, Z., Zhang, Y., & Zhang, X. (2008). Detection of somaclonal variation of cotton (*Gossypium hirsutum*) using cytogenetics, flow cytometry and molecular markers. *Plant Cell Reports*, 27(8), 1303-1316.

Kapchina-Toteva, V. M., Iakimova, E. T., & Chavdarov, I. P. (2005). Effect of cytokinins on *in vitro* cultured *Exacum affine* Balf. In *Proceedings of the Balkan Scientific Conference of Biology*, 714-722.

Karp, A. (1994). Origins, causes and uses of variation in plant tissue cultures. In *Plant cell and tissue culture*, Springer, 139-151.

- Kartha, K. K., Gamborg, O. L., Shyluk, J. P., & Constabel, F. (1976). Morphogenetic investigations on *in vitro* leaf culture of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Starfire) and high frequency plant regeneration. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 77(4), 292-301.
- Kibler, R., Blaschke, J., Forche, E., & Neumann, K. H. (1980). Investigations on ploidy levels of haploid and diploid callus and cell suspension cultures of *Datura innoxia* Mill. *Journal of cell science*, 44(1), 365-373.
- Kim, S. J., Hahn, E. J., Heo, J. W., & Paek, K. Y. (2004). Effects of LEDs on net photosynthetic rate, growth and leaf stomata of *Chrysanthemum* plantlets *in vitro*. *Scientia Horticulturae*, 101(1-2), 143-151.
- Kirk, H., & Freeland, J. R. (2011). Applications and implications of neutral versus non-neutral markers in molecular ecology. *International journal of molecular sciences*, 12(6), 3966-3988.
- Kulchin, Y. N., Nakonechnaya, O. V., Gafitskaya, I. V., Grishchenko, O. V., Epifanova, T. Y., Orlovskaya, I. Y., Zhuravlev, Y. N., & Subbotin, E. P. (2018). Plant morphogenesis under different light intensity. In *Defect and diffusion forum*, 386, 201-206.
- Kumar, L. S. (1999). DNA markers in plant improvement: an overview. *Biotechnology advances*, 17(2-3), 143-182.
- Lagunas-Cruz, M. D. C., Valle-Mendiola, A., & Soto-Cruz, I. (2014). Ciclo celular: Mecanismos de regulación. *Vertientes. Revista Especializada en Ciencias de la Salud*, 17(2).
- Larkin, P. J., & Scowcroft, W. R. (1981). Somaclonal variation—a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theoretical and applied genetics*, 60(4), 197-214.
- Lee, M., & Phillips, R. L. (1988). The chromosomal basis of somaclonal variation.

*Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 39(1), 413-437.

Lian, M. L., Murthy, H. N., & Paek, K. Y. (2002). Effects of light emitting diodes (LEDs) on the *in vitro* induction and growth of bulblets of *Lilium oriental* hybrid 'Pesaro'. *Scientia Horticulturae*, 94(3-4), 365-370.

López-Puc, G., Canto-Flick, A., Barredo-Pool, F., Zapata-Castillo, P., Montalvo-Peniche, M. D. C., Barahona-Pérez, F., Santana-Buzzy N., & Iglesias-Andreu, L. (2006). Direct somatic embryogenesis: a highly efficient protocol for *in vitro* regeneration of habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.). *HortScience*, 41(7), 1645-1650.

Martínez-Palacios, A., Eguiarte, L. E., & Furnier, G. R. (1999). Genetic diversity of the endangered endemic *Agave victoriae-reginae* (Agavaceae) in the Chihuahuan Desert. *American Journal of Botany*, 86(8), 1093-1098.

Martínez-Palacios, A., Ortega-Larrocea, M. P., Chávez, V. M., & Bye, R. (2003). Somatic embryogenesis and organogenesis of *Agave victoriae-reginae*: Considerations for its conservation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 74(2), 135-142.

Michler, C. H., & Lineberger, R. D. (1987). Effects of light on somatic embryo development and abscisic levels in carrot suspension cultures. *Plant cell, tissue and organ culture*, 11(3), 189-207.

Mohanty, S., Panda, M. K., Subudhi, E., & Nayak, S. (2008). Plant regeneration from callus culture of *Curcuma aromatica* and *in vitro* detection of somaclonal variation through cytophotometric analysis. *Biologia Plantarum*, 52(4), 783-786.

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*, 9(4), 745-762.

- Murashige, T. y Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15, 473-497.
- Murillo-Talavera, M. M., Pedraza-Santos, M. E., Gutiérrez-Rangel, N., Rodríguez-Mendoza, M. D. L. N., Lobit, P., & Martínez-Palacios, A. (2016). Calidad de la luz led y desarrollo *in vitro* de *Oncidium tigrinum* y *Laelia autumnalis* (orchidaceae). *Agrociencia*, 50(8), 1065-1080.
- Navarro-Quezada, A., González-Chauvet, R., Molina-Freaner, F., & Eguiarte, L. E. (2003). Genetic differentiation in the *Agave deserti* (Agavaceae) complex of the Sonoran desert. *Heredity*, 90(3), 220-227.
- Nehra, N. S., Kartha, K. K., Stushnott, C., & Giles, K. L. (1992). The influence of plant growth regulator concentrations and callus age on somaclonal variation in callus culture regenerants of strawberry. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 29(3), 257-268.
- Nhut, D. T., Takamura, T., Watanabe, H., & Tanaka, M. (2001). Efficiency of a novel culture system by using light-emitting diode (LED) on *in vitro* and subsequent growth of micropropagated banana plantlets. In *1 International Symposium on Acclimatization and Establishment of Micropropagated Plants*, 616, 121-127.
- Nhut, D. T., Takamura, T., Watanabe, H., Okamoto, K., & Tanaka, M. (2003). Responses of strawberry plantlets cultured *in vitro* under superbright red and blue light-emitting diodes (LEDs). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 73(1), 43-52.
- Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. 30 de Diciembre del 2010.
- Nyffeler, R. (2002). Phylogenetic relationships in the cactus family (Cactaceae) based on evidence from trnK/matK and trnL-trnF sequences. *American Journal*

*of Botany*, 89(2), 312-326.

Oono, K. (1985). Putative homozygous mutations in regenerated plants of rice. *Molecular and General Genetics MGG*, 198(3), 377-384.

Pacheco, M. M., Diego, M. A. P., & García, P. M. (2017). Atlas de Histología vegetal y animal. *Alambique: Didáctica de las ciencias experimentales*, 90, 76-77.

Parker, K. C., Hamrick, J. L., Hodgson, W. C., Trapnell, D. W., Parker, A. J., & Kuzoff, R. K. (2007). Genetic consequences of pre-Columbian cultivation for *Agave murpheyi* and *A. delamateri* (Agavaceae). *American Journal of Botany*, 94(9), 1479-1490.

Parker, K. C., Trapnell, D. W., Hamrick, J. L., Hodgson, W. C., & Parker, A. J. (2010). Inferring ancient *Agave* cultivation practices from contemporary genetic patterns. *Molecular Ecology*, 19(8), 1622-1637.

Pérez-Rangel (2021). Efecto de la luz y los fitorreguladores en la respuesta del clon órgano-embriogénico de *Agave victoriae-reginae*. Tesis de licenciatura. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, México.

Petolino, J. F., Roberts, J. L., & Jayakumar, P. (2003). Plant Cell Culture. In *Handbook of Industrial Cell Culture* (pp. 243-258). Humana Press, Totowa, N. J.

Ray, T., Dutta, I., Saha, P., Das, S., & Roy, S. C. (2006). Genetic stability of three economically important micropropagated banana (*Musa* spp.) cultivars of lower Indo-Gangetic plains, as assessed by RAPD and ISSR markers. *Plant cell, tissue and organ culture*, 85(1), 11-21.

Reuveni, O., & Israeli, Y. (1989). Measures to reduce somaclonal variation *in vitro* propagated bananas. In *International Symposium on the Culture of Subtropical and Tropical Fruits and Crops 275* (pp. 307-314).

Reyes-Zambrano, S. J., Lecona-Guzmán, C. A., Gutiérrez-Miceli, F. A., Ruiz-

---

Valdiviezo, V. M., & Vargas-Díaz, A. A. (2021). Selection and Analysis of Polymorphisms in Somaclonal Variants of *Agave americana* Resistant to *Fusarium oxysporum* via an Ethyl Methanesulphonate Treatment. *Phyton*, 90(6), 1727.

Rocha, M. (2006). *Ecología evolutiva comparada en cinco especies de Agave* (Doctoral dissertation, Tesis de doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México. México, DF, México).

Rodrigues, P. H. V., Tulmann N. A., Cassieri N. P. & Mendes, B. M. J. (1998). Influence of the number of subcultures on somaclonal variation in micropropagated nanicao (*Musa* spp., AAA Group). In *II International Symposium on Banana: I International Symposium on Banana in the Subtropics* 490, 469-474.

Ryu, J., Kim, W. J., Im, J., Kang, K. W., Kim, S. H., Jo, Y. D., Kang, S. Y., Lee, J. H., & Ha, B. K. (2019). Single nucleotide polymorphism (SNP) discovery through genotyping-by-sequencing (GBS) and genetic characterization of *Dendrobium* mutants and cultivars. *Scientia horticultrae*, 244, 225-233.

Sánchez-Teyer, F., Moreno-Salazar, S., Esqueda, M., Barraza, A., & Robert, M. L. (2009). Genetic variability of wild *Agave angustifolia* populations based on AFLP: A basic study for conservation. *Journal of Arid Environments*, 73(6-7), 611-616.

Sandoval-Rodríguez, A. S., Montes, A. M. S., & Mejía, Ó. G. B. (2016). Biología molecular del deporte. In *Biología molecular: fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud* (pp. 329-339). McGraw-Hill Interamericana Editores.

Sanger, F., & Coulson, A. R. (1975). A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of Molecular Cell Biology*, 94(3), 441-448.

Sarwar, M. B., Ahmad, Z., Rashid, B., Hassan, S., Gregersen, P. L., Leyva, M. D. L. O., Nagy, I., Asp, T., & Husnain, T. (2019). El ensamblaje de novo del

transcriptoma de *Agave sisalana* en respuesta al estrés por sequía proporciona información sobre los mecanismos de tolerancia. *Informes científicos*, 9 (1), 1-14.

Scheinvar, G. E. (2008). *Genética de poblaciones y biología reproductiva en especies mezcaleras* (Doctoral dissertation, Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas, Instituto de Ecología, UNAM. Mexico. DF, México).

Shepherd, K., & Dos Santos, J. (1996). Mitotic instability in banana varieties. I-Plants from callus and shoot tip cultures. *Fruits*, 51(1), 5-11.

Shoemaker, R. C., Amberger, L. A., Palmer, R. G., Oglesby, L., & Ranch, J. P. (1991). Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid concentration on somatic embryogenesis and heritable variation in soybean [*Glycine max* (L) Merr.]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 27(2), 84-88.

Silva-Montellano, J. A. (2001). *Ecología reproductiva y genética de poblaciones de Agave lechuguilla (Torr.) en un gradiente latitudinal* (Doctoral dissertation, Tesis Doctoral, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, Distrito Federal, México).

Smýkal, P., Valledor, L., Rodriguez, R., & Griga, M. (2007). Assessment of genetic and epigenetic stability in long-term *in vitro* shoot culture of pea (*Pisum sativum* L.). *Plant cell reports*, 26(11), 1985-1998.

Soltis, P. S., & Soltis, D. E. (2003). Applying the bootstrap in phylogeny reconstruction. *Statistical Science*, 256-267.

Song, Y. (2014). Insight into the mode of action of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) as an herbicide. *Journal of Integrative Plant Biology*. 56(2), 106-113.

Tamura, K., Filipski, A., Biling-Ross, P., Murillo, O., Kumar, S. (2015). Phylogenetic placement of metagenomic reads using the minimum evolution principle. *BMC Genomics*, 16, 1-9.

Torres, C. P. (2010). Variación somaclonal y selección *in vitro* con toxinas como

---

herramienta en la búsqueda de resistencia a enfermedades en plantas: Revisión. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 1(1), 7-15.

Torres-Morán, M. I., Escoto-Delgadillo, M., Molina-Moret, S., Rivera-Rodríguez, D. M., Velasco-Ramírez, A. P., Infante, D., & Portillo, L. (2010). Assessment of genetic fidelity among *Agave tequilana* plants propagated asexually via rhizomes versus in vitro culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 103(3), 403-409.

Trejo, L. (2006). Genética de poblaciones de *Agave striata* Zucc. *Maestría en Ciencias Biológicas, UNAM, DF, México*.

Trujillo, I. (1999). Técnicas de clonación en *Eucalyptus grandis*. *INIA Serie Actividades de Difusión*.

Valentini, A., Miquel, C., Nawaz, M. A., Bellemain, E. V. A., Coissac, E., Pompanon, F., Gielly, L., Cruaud, C., Swenson, J. E., & Taberlet, P. (2009). New perspectives in diet analysis based on DNA barcoding and parallel pyrosequencing: the trnL approach. *Molecular ecology resources*, 9(1), 51-60.

Van Dam, J., Kooman, P. L., & Struik, P. C. (1996). Effects of temperature and photoperiod on early growth and final number of tubers in potato (*Solanum tuberosum* L.). *Potato Research*, 39(1), 51-62.

van der Krieken, W. M., Breteler, H., Visser, M. H., & Jordi, W. (1992). Effect of light and riboflavin on indolebutyric acid-induced root formation on apple *in vitro*. *Physiologia Plantarum*, 85(4), 589-594.

Vargas-Ponce, O., Zizumbo-Villarreal, D., Martínez-Castillo, J., Coello-Coello, J., & Colunga-GarcíaMarín, P. (2009). Diversity and structure of landraces of *Agave* grown for spirits under traditional agriculture: a comparison with wild populations of *A. angustifolia* (Agavaceae) and commercial plantations of *A. tequilana*. *American Journal of Botany*, 96(2), 448-457.

Varshney, R. K., Mahendar, T., Aggarwal, R. K., & Börner, A. (2007). Genic molecular

markers in plants: development and applications. *Genomics-assisted crop improvement*, 13-29.

Vollenweider, P., & Günthardt-Goerg, M. S. (2005). Diagnosis of abiotic and biotic stress factors using the visible symptoms in foliage. *Environmental Pollution*, 137(3), 455-465.

Yang, J., Wu, S., & Li, C. (2013). High efficiency secondary somatic embryogenesis in *Hovenia dulcis* Thunb. through solid and liquid cultures. *The Scientific World Journal*, 2013.

Yao, H., Song, J. Y., Ma, X. Y., Liu, C., Li, Y., Xu, H. X., Han, J. P., Duan, L. S., & Chen, S. L. (2009). Identification of *Dendrobium* species by a candidate DNA barcode sequence: the chloroplast psbA-trnH intergenic region. *Planta medica*, 75(06), 667-669.

Zakhlenyuk, O. V., & Kunakh, V. A. (1987). Cytophysiological and cytogenetic effects of adenine derivatives in *Haplopappus gracilis* tissue culture. *Soviet plant physiology*, 34(3), 475-483.