

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA**  
**INSTITUTO DE INGENIERÍA**  
**MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA**



**“SELECCIÓN DE LINEAS CLONALES DE *Agave marmorata*  
ROEHL A PARTIR DE SEMILLAS Y SU COMPATIBILIDAD CON  
BACTERIAS ENDÓFITAS INOCULADAS PARA FINES DE  
RESTAURACIÓN Y CONSERVACIÓN DE SU ECOSISTEMA”**

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS**

**PRESENTA**

***América Martínez Rodríguez***

**DIRECTOR:**

***Dr. Benjamín Valdez Salas***

**CODIRECTOR:**

***Dr. Miguel Juan Beltrán García***

***Mexicali, B. C.***

***Junio, 2019***

**AGRADEZCO A CONACYT POR EL FINANCIAMIENTO OTORGADO PARA REALIZAR ESTA TESIS, MEDIANTE EL APOYO DE LOS SIGUIENTES PROYECTOS:**

Fortalecimiento y ampliación de las capacidades analíticas de quipo de espectrometría de masas **MALDI-TOF a MALDI-IMAGING** para su uso en grupos de investigación de las áreas agro-biotecnológicas, microbiológicas y de biotecnología farmacéutica. Apoyo al fortalecimiento y desarrollo de la infraestructura científica y tecnológica. **CONVOCATORIA 2016-269607.**

Por la beca otorgada para el programa de posgrado **Maestría en Ciencias**, del Instituto de Ingeniería, en la Universidad Autónoma de Baja California, Campus Mexicali. Durante el periodo de 2017-2019, CVU: **720754**

## AGRADECIMIENTOS

Al **Dr. Miguel Juan Beltrán García** por la oportunidad que me brinda para seguir con este proyecto que tanto amo, las enseñanzas y todo el conocimiento que me brinda día a día. La mentalidad de tener que superarse para lograr lo que uno ama, buscando siempre la excelencia, calidad, amor y emoción. Gracias por inspirarme a seguir a delante, para llegar a ser una persona de ciencia, por la participación para generar el laboratorio de micropropagación, apoyar conmigo la conservación y restauración del ecosistema de México. Siempre será mi ejemplo para seguir como profesionista y como persona.

Al **Dr. Benjamín Valdés Salas** quien me abrió las puertas para continuar con mi preparación, me apoyo en este proyecto y me inspiró para continuar con mi preparación, se volvió un pilar de mi formación, admiro su disciplina, conocimiento y su gran trayectoria, ha fortalecido mis ganas de continuar por este camino.

A **Guillermo Martínez López, Patricia Rodríguez López y Edgar G. Martínez Rodríguez**, padre, madre y hermano. Quienes me apoyaron en tiempos de estrés, alegría, entusiasmos, aquellos que vieron en mi la capacidad para seguir adelante con lo que me propusiera, emocionarse conmigo por lo que estoy logrando y siempre brindarme su mano.

A mis colegas del laboratorio 28 por todas las alegrías, risas, emociones, llanto, enojo y aprendizaje que cada uno de ustedes me proporciona. Así como tengo su apoyo, lo tienen de parte mía para sobresalir y lograr aquello por lo cual lucharán: **Jhovana Lozano, Luis Kong, Luis Castañeda, Nicolás Montes, Ileana Olmos, Itzel Zaizar, Aranza Rivera, Carolina Castillo, Carla Pineda, Alexa Zepeda, Carlos Lizárraga, Yareli Abundis.**

Mis **Maestros** que tuve el honor de conocer, gracias por el conocimiento adquirido. Que desde secundaria y hasta el posgrado han puesto su apoyo y confianza en que puedo conseguir lo que me proponga, siempre avanzare siguiendo su ejemplo.

**“Agradezco pongan sus esperanzas en mí”**

La inspiración para luchar por lo que amamos, lo encontramos de personas que luchan a nuestro costado, y el amor por lo que lo hacemos, lo tomamos de aquello que buscamos proteger para restaurar y conservar.

**M. R. América, 2019.**

El maguey era, para los mexicanos, alimento, bebida, vestido y material para escribir. Seguramente la naturaleza jamás ha reunido en una planta tantos elementos con que satisfacer lo que exige la necesidad, la comunidad y la civilización.

**W.H. Prescott, 1843.**

# ÍNDICE DE CONTENIDO

|                                                                                                                                                 |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| ÍNDICE DE CONTENIDO .....                                                                                                                       | ii        |
| ÍNDICE DE FIGURAS.....                                                                                                                          | iv        |
| ÍNDICE DE CUADROS.....                                                                                                                          | vi        |
| 1. RESUMEN.....                                                                                                                                 | 1         |
| 2. ABSTRACT.....                                                                                                                                | 1         |
| 3. INTRODUCCIÓN.....                                                                                                                            | 3         |
| 4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....                                                                                                             | 6         |
| 5. JUSTIFICACIÓN.....                                                                                                                           | 8         |
| 6. OBJETIVOS.....                                                                                                                               | 9         |
| <b>6.1. OBJETIVO GENERAL .....</b>                                                                                                              | <b>9</b>  |
| <b>6.2. OBJETIVOS PARTICULARES.....</b>                                                                                                         | <b>9</b>  |
| 7. ANTECEDENTES.....                                                                                                                            | 10        |
| <b>7.1. El género <i>Agave</i>: importancia ecológica.....</b>                                                                                  | <b>10</b> |
| <b>7.2. ¿Por qué es ecológicamente importante la propagación del <i>Agave</i>? .....</b>                                                        | <b>14</b> |
| <b>7.3. Microorganismos de las semillas .....</b>                                                                                               | <b>16</b> |
| <b>7.4. Funciones mutualistas de los endófitos en las semillas.....</b>                                                                         | <b>18</b> |
| <b>7.5. ¿Cuál es el microbioma del <i>Agave</i> y su efecto sobre la planta? .....</b>                                                          | <b>19</b> |
| <b>7.6. Microbioma de las semillas de <i>Agave</i>, ¿Cuál es su función? .....</b>                                                              | <b>21</b> |
| <b>7.7. Microbioma de las semillas de <i>A. marmorata</i> y su dinámica.....</b>                                                                | <b>23</b> |
| <b>7.8. La micropropagación como una alternativa para la restauración y conservación genética.....</b>                                          | <b>25</b> |
| <b>7.9. Requerimientos básicos para una propagación efectiva.....</b>                                                                           | <b>26</b> |
| <b>7.10. Micropropagación de especies de <i>Agave</i>.....</b>                                                                                  | <b>27</b> |
| 8. MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPO.....                                                                                                          | 30        |
| <b>8.1. Material biológico.....</b>                                                                                                             | <b>30</b> |
| <b>8.2. Cepas bacterianas endófitas.....</b>                                                                                                    | <b>31</b> |
| 9. MATERIALES .....                                                                                                                             | 32        |
| 10. REACTIVOS .....                                                                                                                             | 33        |
| 11. METODOLOGÍA .....                                                                                                                           | 35        |
| <b>11.1. Objetivo 1. Selección y establecimiento de líneas clonales de <i>Agave marmorata</i> Roezl derivadas de un banco de semillas. ....</b> | <b>35</b> |
| <b>11.2. Objetivo 2. Cuantificación del índice de brotación por planta y análisis morfológico de <i>A. marmorata</i>.....</b>                   | <b>38</b> |
| <b>11.3. Aclimatación de plantas obtenidas <i>in vitro</i> de <i>Agave marmorata</i> y plantas de <i>Agave tequilana</i>. ....</b>              | <b>40</b> |

|                                                                                                                                                          |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 11.4. Objetivo 3. Evaluación efectos de crecimiento de las líneas clonales seleccionadas de <i>A. marmorata</i> inoculadas con bacterias endófitas. .... | 41 |
| 11.5. Evaluación del crecimiento, biomasa producida en las plantas por inoculación de bacterias en <i>A. marmorata</i> .....                             | 43 |
| 11.6. Análisis de la estructura (arquitectura) de la raíz en plantas de <i>A. marmorata</i> y <i>A. tequilana</i> inoculadas con bacterias. ....         | 43 |
| 12. RESULTADOS .....                                                                                                                                     | 45 |
| 12.1. Clasificación de líneas clonales e índice brotación.....                                                                                           | 50 |
| 12.2. Determinación del índice de brotación de cuatro líneas clonales en la especie <i>Agave marmorata</i> .....                                         | 53 |
| 13. DISCUSIÓN.....                                                                                                                                       | 63 |
| 14. CONCLUSIONES .....                                                                                                                                   | 73 |
| 15. LITERATURA CITADA.....                                                                                                                               | 74 |
| 16. ANEXO .....                                                                                                                                          | 86 |
| Medio MS modificado.....                                                                                                                                 | 86 |

# ÍNDICE DE FIGURAS

**Figura 1.** Morfología de las plantas de Agave. Hojas con espinas en el margen y dispuestas en roseta del tallo (Paniculadas). Estructuras de reproducción: inflorescencia generada a partir del meristemo apical. Se reproduce sexualmente por la producción de flores, que al ser polinizadas generan un fruto tipo cápsula y sus semillas fértiles son de color negro. Su reproducción asexual es por medio de bulbillos en la inflorescencia o hijuelo desde el rizoma. .... 12

**Figura 2.** *Choeronycteris mexicana* quiróptero nocturno polinizando inflorescencias de Agave. Imagen obtenida de la Lista roja-Unidad Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN, 2016). .... 15

**Figura 3.** Diagrama de Venn de la abundancia relativa de los filos presentes en las semillas de cuatro especies de Agave. Uno domesticado (*A. tequilana*), 2 Semi-domesticados (*A. maximiliana* y *A. angustifolia*) y 1 silvestre (*A. marmorata*). .... 23

**Figura 4.** Semillas fértiles de *A. marmorata* de 0.5 cm de ancho x 0.5 cm de longitud, su testa negra brillante, colectadas directamente de los frutos en un quiote de 5.5 m de planta de 20 años con una gran número de frutos. Se colectaron más de 5000 semillas. Las semillas fueron colectadas por el Biol. Francisco Echaide Aquino. .... 30

**Figura 5.** Representación estructural de la raíz, esquema a seguir para el conteo de pelos radiculares, altura y presencia de raíces secundarias en 1 cm bajo hoja milimétrica. .... 44

**Figura 6.** Cinética de germinación de 3 sub-lotes de semillas de *A. marmorata*. .... 47

**Figura 7.** Aspectos macroscópicos de la cinética de germinación de las semillas de *A. marmorata*. En la parte superior se observa el aspecto de las cajas en Agar Phytigel desde el tiempo hasta el día 15. Abajo un acercamiento de algunas de las plantas formadas resaltando la aparición de la radícula, la extensión de la hoja embrionaria, los pelos radiculares y la aparición de la hoja verdadera (día 15). .... 48

**Figura 8.** Selección de líneas clonales a partir de 10 semillas germinadas ..... 49

**Figura 9.** Fisiología de brotes de las líneas clonales. A) Brotes completos (definidos); B) brotes indefinidos-cristalinos; C) brotes completos y cristalinos; D) tejido con coloración verde; E) coloración púrpura; F) coloración blanca-muerte; G) presencia de oxidación

en tejido vegetal; H) crecimiento de raíces en brotes y I) presencia alta de tejido muerto (hojas). ..... 52

**Figura 10.** Análisis de la formación de brotes in vitro en *A. marmorata* de las líneas AM20, AM31, AM32 y AM33 derivadas de semilla de *A. marmorata*, experimento realizado en medio MS adicionado con 5 mg/L (22.2  $\mu$ m) de BAP, A) número de brotes adventicios producidos por explante en un periodo de 60 días; B) altura media de los brotes adventicios producidos en centímetros y C) densidad de tejido cristalino (brotes no diferenciados). ..... 54

**Figura 11.** Individualización. A) Líneas AM31, AM32 y AM33 sometidas a multiplicación en medio MS, suplementado con 5 mg/L de 6-Benzylaminopurina; B) individualización de los propágulos, cultivados en medio MS con 0.025 mg/L de Kin y 2 g/L de carbón activado para inducir producción de raíces, C) plantas individualizadas con crecimiento de 91 días y D) plantas promedio seleccionadas para uso en experimento de inoculación bacteriana. .... 57

**Figura 12.** Valores relativos del efecto de la inoculación de las bacterias endófitas (continuación siguiente página)... ..... 61  
A) producción de hojas nuevas, B) generación de raíces nuevas, C) longitud de raíces nuevas, D) peso húmedo diferencial. De las líneas AM31, AM32 y AM33 por cada grupo de inoculación..... 62

**Figura 13.** Análisis estadístico de la Mortalidad de las líneas clonales por tratamientos. A) análisis por grupos de bacterias inoculadas, B) análisis por líneas clonales de *A. marmorata* (AM31, AM32, AM33). ..... 69

## ÍNDICE DE CUADROS

|                                                                                                                                                                         |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Cuadro 1.</b> Géneros bacterianos identificados en las diferentes etapas de la semilla (0 días) y durante el desarrollo de la plántula (10, 20, 60, 365 días). ..... | 25 |
| <b>Cuadro 2.</b> Especies de bacterias endófitas utilizadas en este estudio, origen y propiedades agronómicas.....                                                      | 31 |
| <b>Cuadro 3.</b> Criterios de selección del explante de planta derivada de semilla inducido para brotación.....                                                         | 39 |



## 1. RESUMEN

Nuestro principal objetivo en esta investigación es restaurar y conservar los agaves silvestres en peligro de extinción, utilizando herramientas de biotecnología vegetal y microbiana incluyendo estrategias de nanotecnología y química. Elegimos al *Agave marmorata* como modelo de estudio, debido a su bajo índice de germinación, ciclos reproductivos más altos (hasta 15 años) y actualmente por su importancia económica como fuente de producción de mezcal. La selección y establecimiento de líneas clonales comenzó con la germinación de varios sub-lotes de 400 semillas durante 2 períodos de tiempo en 2016 y 2017. Las plántulas con la tasa de germinación más alta se presentaron en los primeros 5 días y se establecieron en el medio Murashige y Skoog (MS) adicionado con 5 mg/L (22.2  $\mu$ mol) de 6-Benzylaminopurina (BAP) para inducir brotes adventicios. A partir de 10 líneas clonales, la AM20, AM31, AM32 y AM33 tuvieron la capacidad de producir 30 a 80 brotes adventicios en un período de 2 meses. Este experimento fue analizado estadísticamente usando una ANOVA multifactorial (Prueba de Tukey,  $p=0.05$ ), que demostró que la línea AM32, es la mejor para el manejo futuro en un invernadero. Por otro lado, las plantas de cada línea fueron inoculadas con 6 bacterias endófitas. *Achromobacter xylosoxidans* y *Curtobacterium flaccumfaciens* mostraron la mejor compatibilidad con AM32, y tienen una gran influencia para la producción de nuevas hojas, mejorar tanto el número de raíces y su longitud, Además, aumentar la biomasa vegetal bajo una limitación nutricional.

## 2. ABSTRACT

Our main objective in this research is to restore and conservation of wild Agaves that are endangered, using tools of plant and microbial biotechnology including nanotechnology and chemical strategies. We choose the *Agave marmorata* as the plant model, because of its low germination index, higher reproductive cycles (up to 15 years) and currently by their economic importance as mescal production source. The selection and establishment of clonal lines started with the germination of several sub-lots of 400 seeds during 2 periods of time in 2016 and 2017. Seedlings with the highest germination rate occurred in the first 5 days were established in Murashige and Skoog (MS) medium added with 5 mg/L (22.2  $\mu$ mol) of 6-benzylaminopurine (BAP) to induce adventitious shoots. From 10 clonal lines, only the AM20, AM31, AM32 and AM33 have the ability to produce 30 to 80 adventitious shoots in a period of 2 months. This experiment analyzed statistically with a Multifactor ANOVA (Tukey test,  $p= 0.05$ ), showed that AM32 line as the best for future management in a greenhouse. On the other hand, the plants of each line were inoculated with 6 endophytic bacteria. *Achromobacter xylosoxidans* and *Curtobacterium flaccumfaciens* showed compatibility with AM32, and having great influence for the production of new leaves, enhance both number of roots and their length, in addition to the increase of plant biomass under nutritional limitation.

### **3. INTRODUCCIÓN**

Las plantas evolucionaron en la presencia de microorganismos, y las funciones claves para el éxito evolutivo y persistencia de ambos organismos en la tierra son atribuidos a la simbiosis. A través de los milenios que conllevó la domesticación, los cultivos y sus semillas se sometieron a diferentes tendencias de adaptación que permitieron una rápida especiación y divergencia que fenotípica y genotípicamente distingue a sus antecesores silvestres. Promovidos por estos procesos dinámicos también los microbiomas han co-evolucionando con las plantas. Una gran cantidad de estudios revelan una inesperada diversidad microbiana y abundancia dentro de las semillas con endófitos bacterianos como componentes simbióticos principales. Es claro que el clima, la geografía y el genotipo del microbioma de las semillas, además de la domesticación y el manejo agrícola intensivo han modificado la microbiota de las semillas, originando una pérdida de la diversidad de los microorganismos simbióticos, que en consecuencia han generado problemas en la salud, adaptación y resistencia de las plantas a los cambios climáticos. En orden de mejorar la adaptabilidad, sobrevivencia y productividad de los cultivos a los nuevos efectos del cambio climático, la utilización de los simbioses de las semillas son ahora una alternativa a la mitigación y resiliencia al estrés ambiental.

Como simbioses microbianos, los “endófitos” son importantes componentes del micro-ecosistema de las plantas (Beltrán-García et al., 2014; Macedo-Raygoza et al., 2019). Los microbios endófitos residen en el interior de los tejidos y se asocian a una vasta mayoría de especies de plantas encontradas en ecosistemas naturales y manejados por el hombre. Esta asociación con las

plantas contribuye en muchos aspectos del funcionamiento, tales como la germinación de las semillas, suplir y/o asimilar eficientemente nutrimentos, resistencia contra patógenos y contra factores abióticos (calor, frío, sequía, excesos de radiaciones electromagnéticas, entre otros) y en la producción de metabolitos activos (Prieto et al., 2017). En ambientes áridos y semiáridos, la presencia de microorganismos colonizadores de las semillas son esenciales para el establecimiento de las plantas. Sin embargo, poco sabemos acerca de la funcionalidad de las bacterias endófitas transmitidas por las semillas en especial en los agaves.

Los *Agaves* son parte del panorama árido y semiárido del centro y norte de México y del suroeste de los Estados Unidos. Tienen un metabolismo especializado (CAM, o metabolismo del ácido crasuláceo), el cual es un modo fotosintético especializado que evoluciona de la fotosíntesis  $C_3$  en respuesta a la limitación de agua y  $CO_2$  y que ha permitido la colonización de los ambientes semiáridos en ausencia de agua y a temperaturas de  $60^{\circ}C$  (Abraham et al., 2016). La naturaleza de las hojas en composición y estructura permite la fijación de  $CO_2$ , y otras reacciones bioquímicas vitales durante periodos extendidos de sequía hasta por más de 7 años. La domesticación y propagación extensiva de las especies de agave se hace estrictamente con fines comerciales. La utilización de los hijos derivados del rizoma como vehículos de propagación, ha causado la pérdida de variabilidad genética y esto ha hecho susceptible a los cultivos a enfermedades causadas por bacterias y hongos, que reducen el número de plantas utilizables para la elaboración de bebidas destiladas (Vega-Ramos et al., 2013; Ramírez-Ramírez et al., 2017). Otro punto importante para resaltar como parte de la pérdida de los agaves como recursos bióticos es la

explotación excesiva de especies silvestres que las ha condenado a la extinción. *Agave marmorata* (Roetzl), es una especie que pudiera ser extinguida por su explotación como materia prima para la producción de mezcal. La planta se reproduce sexualmente cada 20-25 años, las flores y sus semillas se forman en una estructura aérea denominada “quiote”. Las semillas tienen un alto índice de germinación comparadas por ejemplo con *A. tequilana*, que no es superior al 30%. Sin embargo, para la producción de los destilados, no se permite la formación del quiote, por lo que esta opción de reproducción se ve disminuida.

Consideramos a este trabajo de investigación de Maestría como la continuación de un proyecto que comenzó en 2016, donde se busca la restauración y conservación de *A. marmorata*. Primeramente, hemos estudiado el microbioma de las semillas (Martínez-Rodríguez, 2017) y ahora tenemos una colección de bacterias para ser reintroducidas en las plantas. Pretendemos fortalecer la adaptación y sobrevivencia en su ecosistema. Sin embargo, se deben crear líneas clonales que mantengan una diversidad genética, y que al enriquecerlas con las bacterias se evalúen los efectos de dichos microorganismos en la resistencia a estrés biótico y abiótico. Por lo que este trabajo explora la obtención y selección de líneas clonales derivadas de semillas de *A. marmorata* usando herramientas de biotecnología vegetal y cultivo de tejidos. En los estudios de micropropagación clásicos, siempre evalúan a partir de un explante, las respuestas del tejido la adición de diferentes hormonas; en este caso no se añadieron fitohormonas al inicio si no hasta el momento de inducir la brotación. También se evaluó el efecto de algunas bacterias endófitas derivadas de las semillas tanto de *A. marmorata* como de *A. tequilana*. Estos resultados nos ayudaron a seleccionar las líneas potenciales y su compatibilidad con las

bacterias endófitas que usariamos en una inoculación futura en presencia de nanopartículas de plata, oro y zinc, con fines una colonización efectiva y rápida.

#### **4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

El *Agave marmorata* Roezl sufre de sobreexplotación debido a la gran demanda para la producción de mezcal “tepextate”, lo que ha disminuído a las poblaciones de plantas silvestres por extracción de su hábitat y por el manejo que se da al cultivo para evitar la disminución de azúcares fermentables, ya que para esto se debe eliminar el quiote, lo que limita que la planta se reproduzca de forma sexual. La disminución de las poblaciones de plantas alteran el ecosistema, incluyendo a polinizadores y otros organismos asociados a las plantas. Por otra parte, *Agave tequilana* Weber *var.* Azul, quien ahora es una planta extinta en estado silvestre, por lo que en la actualidad únicamente se tienen monocultivos, que son afectados por enfermedades y plagas debido a su pérdida de variabilidad genética. En consecuencia, el ecosistema se degrada y se compromete la biodiversidad del País. Por otra parte, la pérdida de la planta limitará el desarrollo socio-económico de la región, generando problemas económicos serios y la migración del campo a las ciudades o a otros países como los Estados Unidos.

Hasta ahora no existen estudios que apoyen la conservación y la restauración de un ecosistema mediante estrategias biotecnológicas que soporten la producción de plantas que se adapten y sobrevivan al estrés medioambiental. Por lo que en este proyecto buscamos la conservación del *A. marmorata* Roetzl como un modelo que nos ayude a establecer las estrategias y la metodología para la selección y reproducción *in vitro* y su posterior re-introducción al ecosistema. Así como la búsqueda de la restauración genética y mejoramiento

del cultivo de *A. tequilana* Weber mediante la inoculación con sus microorganismos endófitos (Martínez-Rodríguez, 2017 tesis de licenciatura).

Los conocimientos que se generen en este proyecto apoyaran programas de restauración y conservación de otras especies de importancia ecológica y económica, plantas del desierto y de otros ambientes que son explotadas con fines medicinales o para la obtención de biocombustibles. Estas podrían desaparecer en algunos años si no se manejan adecuadamente. Así también la reintroducción de las plantas apoyará la alimentación de las especies animales (polinizadores entre otros), así como el sostén de la diversidad que se tiene en flora.

Para lograr nuestro objetivo principal, debemos reintroducir al ambiente líneas clonales de plantas producidas por micropropagación “sin modificaciones genéticas” y enriquecidas con sus propios microorganismos. El conocimiento de la ecología microbiana endófito en las semillas, y la dinámica de sucesión de las bacterias endófitas de la semilla a la planta, nos dio la información necesaria para entender el proceso de implantación y adaptación de la planta a su ambiente, ya que la pérdida de los microorganismos limitó el desarrollo. Por otra parte, esperamos que a través de técnicas de cultivo *in vitro* seleccionar el tejido vegetal derivado de la semilla que sirva para la generación de clones con características fenotípicas únicas como el desarrollo, formación de hojas y crecimiento de la raíz. Una vez propagadas las líneas clonales aplicaremos bacterias endófitas para determinar los efectos en el crecimiento de la planta.

## **5. JUSTIFICACIÓN**

Los agaves tienen su centro de origen en México, el 75% de las especies se encuentran distribuidas en las zonas áridas y semiáridas del país, incluyendo el sur de los Estados Unidos. Algunas de estas especies silvestres están siendo sobreexplotadas con fines industriales, especialmente en la producción de bebidas alcohólicas como el mezcal, llegando a la extinción. Desde el punto de vista ecológico la pérdida de estas poblaciones alteran las interacciones de los organismos, la diversidad de especies vegetales y animales, así como la sustentabilidad del área, con impactos medioambientales y económicos negativos. Por otra parte, hemos domesticado a las plantas por la demanda y se han masificado territorialmente en un monocultivo. En consecuencia hay pérdida genética y susceptibilidad a enfermedades, baja viabilidad del polen y por consiguiente una baja germinación. Para atender esta problemática se deben desarrollar estrategias que combinen de biotecnología vegetal y química para evitar la extinción de especies utilizadas por el hombre.

Esperamos con este trabajo en un sentido de investigación básica entender el papel que juega la microbiota endófitas en la resistencia a estrés biótico y la adaptabilidad de las líneas clonales a condiciones adversas y en un sentido práctico desarrollar la metodología que servirá para restaurar y conservar el ambiente donde se desarrolle el género agave, extrapolando este modelo a otras especies de plantas. En consecuencia podrán generarse patentes de los procesos, estrategias y una cultura sustentable del tequila, el mezcal y otro producto derivado de los agaves



## 6. OBJETIVOS

### 6.1. OBJETIVO GENERAL

Seleccionar líneas clonales de *Agave marmorata* Roezl para la propagación de tejido vegetal con fines de restauración de un ecosistema y su evaluación sobre los efectos de la planta, a partir de la inoculación de bacterias endófitas.

### 6.2. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Seleccionar y establecer líneas clonales de *A. marmorata* derivadas de un banco de semillas bajo criterios de porcentaje y velocidad de germinación mediante un comparativo múltiple de medias y el vigor determinado por longitud de la plántula y número de hojas verdaderas.
2. Determinar índice de brotación de las líneas seleccionadas en el objetivo 1 en un periodo de inducción por dos meses usando un análisis estadístico multifactorial.
3. Evaluar el efecto de compatibilidad y en el crecimiento de las líneas clonales seleccionadas de *A. marmorata* inoculadas con las bacterias endófitas como: *Achromobacter xylosoxidans*, *Alcaligenes faecalis*, *Bacillus tequilensis* *Curtobacterium flaccumfaciens*, *Enterobacter cloacae*, y *Pseudomonas aeruginosa* evaluando parámetros de peso, generación de hojas nuevas y efecto sobre la raíz.

## 7. ANTECEDENTES

### 7.1. El género *Agave*: importancia ecológica

El *Agave* comprende 211 especies pertenecientes al orden Asparagales, de las cuales en México se encuentran el 75% de las especies totales reportadas a nivel mundial, correspondientes a 159 especies endémicas en el país (García-Mendoza, 2011). Es probable que este linaje surgió hace 10 millones de años en el territorio del Altiplano Mexicano (Narváez y Sánchez, 2009).

Este género presenta grandes adaptaciones evolutivas permitiendo una adaptación y aclimatación efectiva en ambientes áridos y semiáridos (desiertos), bosques, selvas, desde el nivel del mar (*A. colimana*), hasta en la montaña a altitudes de 3,400 metros, ambas pueden desarrollarse en suelos escasos de nutrientes (Huerta-Lovera *et al.*, 2018). Las plantas tienen una alta capacidad de sobrevivir en condiciones extremas u hostiles como sequía, fluctuación de altas temperaturas y condiciones de iluminación, así como la eficiente toma de CO<sub>2</sub> y el manejo de la evapotranspiración a través del metabolismo del ácido de crasuláceo (CAM por sus siglas en inglés), una alternativa fotosintética en la vegetación desértica donde las temperaturas llegan a los 60°C (Abraham *et al.*, 2015).

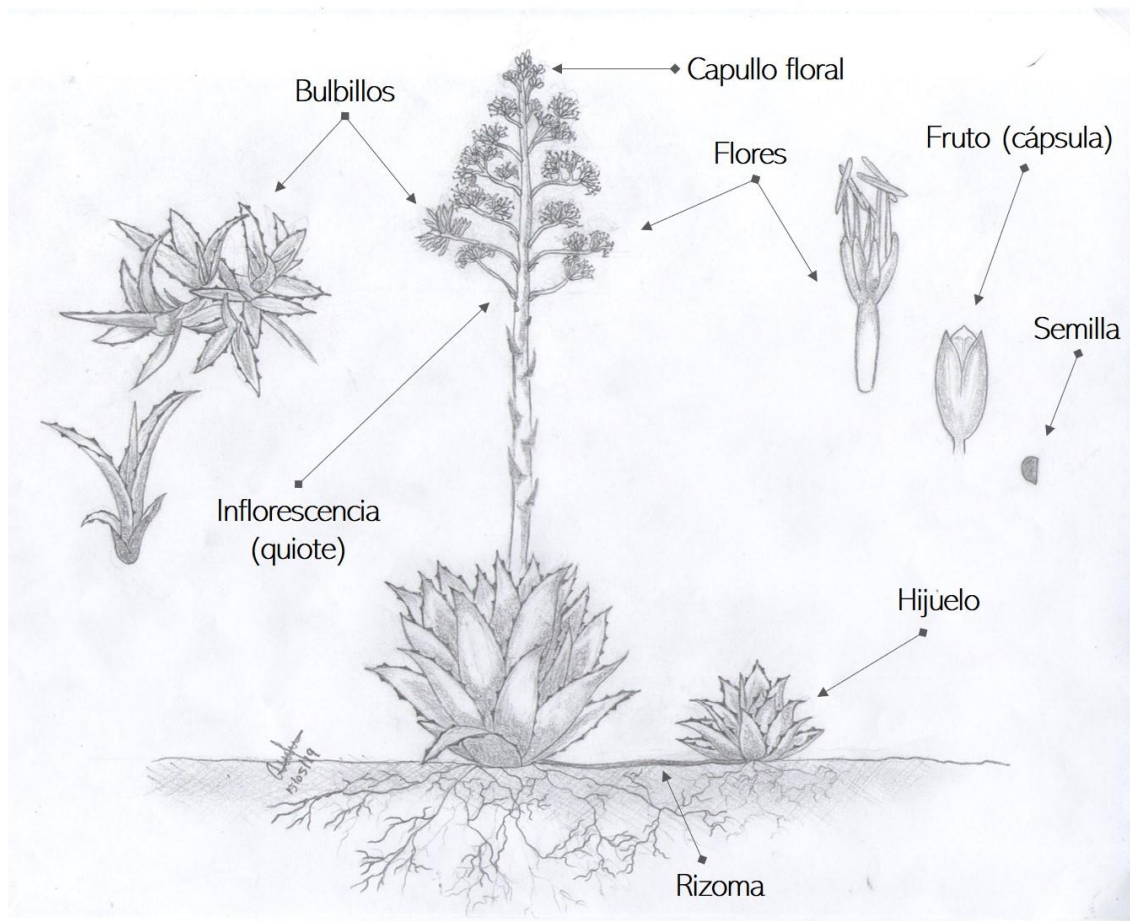
Las raíces de los agaves llegan a penetrar hasta aproximadamente 30 cm en el suelo, sin embargo, sus raíces son finas y superficiales y pocas en número, lo cual facilita la absorción de agua de lluvia, ya que en su hábitat natural no se tiene una gran densidad de agua que llegue al subsuelo (Martínez-Salvador *et al.*, 2005, Campos *et al.*, 2014). La epidermis de sus hojas varía según las diferentes especies, generando diversos tamaños de células alargadas y con

diferente número de estomas, así como las cámaras de los estomas, cada una de las adaptaciones en beneficio de la sobrevivencia (Monja-Mio *et al*, 2015).

En México desde hace siglos las plantaciones de *Agave* han sido establecidas por los brotes que se forman desde su rizoma, mejor conocidos como “hijuelos” mediante reproducción asexual (Figura 1). A este tipo de reproducción se le conoce por la eficiencia y rapidez para el establecimiento de las plantas. Hoy en día se sigue usando, especialmente por el beneficio económico; sin embargo, la planta tiene más variantes de esta reproducción, por ejemplo produce brotes (bulbillos) en la inflorescencia de la planta, cuando no fue exitosamente polinizada. Esto asegura su propagación, colonización y sobrevivencia como una especie competitiva.

Sin embargo, estos tipos de propagación ponen en riesgo la diversidad de las especies por que hace propensa a la planta a la susceptibilidad de plagas y enfermedades de las poblaciones clonales comerciales, como es el caso del *Agave tequilana*, además de ser afectado por factores climáticos (García-Mendoza, 2007, Huerta-Lovera *et al*, 2018).

La reproducción sexual, debido a que las plantas son semélparas (que llegan a florecer solo una vez en su vida), producen una inflorescencia mejor conocida como “quiate” el cual marca el fin de su ciclo de vida (Figura 1). Esta estructura puede aparecer entre 4 y 25 años, dependiendo de la especie de *Agave*. Durante el crecimiento de la planta se almacenan azúcares en su pseudotallo (piña), una vez que la planta llega a su maduración son utilizados para el desarrollo del quiate partiendo del meristemo apical del *agave*.



**Figura 1.** Morfología de las plantas de Agave. Hojas con espinas en el margen y dispuestas en roseta del tallo (Paniculadas). Estructuras de reproducción: inflorescencia generada a partir del meristemo apical. Se reproduce sexualmente por la producción de flores, que al ser polinizadas generan un fruto tipo cápsula y sus semillas fértiles son de color negro. Su reproducción asexual es por medio de bulbillos en la inflorescencia o hijuelo desde el rizoma.

El “quie” puede llegar a alcanzar los 6 metros de altura. Las flores tienen diferentes grados de succulencia, son bisexuales, tubulares y con el ovario ínfero, tienen 6 tépalos los cuales pueden ser de color verdoso-amarillo, amarillo o incluso rojizos dependiendo de la especie, posee 6 estambres y el estilo muy largo debido a que sobre pasan los tépalos. En la base del tubo se encuentran 3

nectarios, una vez que son polinizadas las flores se genera un fruto con forma de cápsula, trilocular donde las semillas se encuentran dispuestas en dos hileras por lóculo, de color negras las fértiles, son aplanadas y están rodeadas por un ala corta en la parte distal (García-Mendoza, 2007; Martínez-Rodríguez, 2017 tesis de licenciatura).

La multiplicación a través de las semillas aumenta la variabilidad genética y puede llegar a disminuir el daño que puede ser ocasionado por plagas y enfermedades (Valenzuela-Zapata y Nabhan, 2003). El 46.3% del territorio de México mantiene numerosos endemismos gracias a la plasticidad genética del agave y las relaciones bióticas con otros organismos, tales como sus polinizadores (García-Mendoza, 2007).

Estudios realizados en las flores de los Agaves sugieren una adaptación a la polinización de murciélagos o quiropterofilia. Estas llegan a producir un polen rico en proteínas y abundante néctar, por lo cual las flores en la noche huelen a fruta madura y amoníaco, un olor atractivo para abejas, colibríes y murciélagos (Slauson, 2000; Trejo-Salazar *et al.*, 2015; Bonbón-Palomares *et al.*, 2018).

Sin embargo, la eliminación de diferentes estructuras de las plantas antes y durante la floración, como la eliminación del quilete no permiten la generación del fruto, por lo que no se producen semillas con la variación genética que influya en una mayor adaptación a condiciones climáticas, obteniendo una baja en sus poblaciones silvestres (García-Moya *et al.*, 2011; Huerta-Lovera *et al.*, 2018). Esto es de gran importancia ya que afecta a terceros con la destrucción de hábitats naturales de las especies que son polinizadores y cuya supervivencia depende del consumo de néctar de agave.

Además de estas pérdidas por factores abióticos, encontramos: el uso excesivo de fertilizantes que debido al manejo no ayudan a la planta, así como el uso de fungicidas e insecticidas que resultan en la degradación de los suelos, erosión, pérdida de la microbiota del suelo (bacterias y hongos), la contaminación de los mantos acuíferos, saturación de metales pesados, alteración de ciclos biológicos de insectos, aves y mamíferos lo cual provoca un desequilibrio ecológico en el ambiente donde esta planta se desarrolla.

## **7.2. ¿Por qué es ecológicamente importante la propagación del *Agave*?**

El cultivo de *Agave* es importante para la producción de bebidas alcohólicas. La comercialización de los destilados de *agave* aumentó la demanda y la necesidad de abarcar grandes áreas para el cultivo, como ha sucedido con las especies *A. inaequidens*, *A. maximiliana*, *A. tequilana*, *A. potatorum*, *A. salmiana*, por medio de la propagación asexual de los hijuelos, dejando las plantas susceptibles a enfermedades fúngicas (*Fusarium oxysporum*) y bacterias (*Pectobacterium carotovora*) lo cual reduce el número de plantas útiles para producción (Vega-Ramos *et al.*, 2013; Ramírez-Ramírez *et al.*, 2017). Por otro lado, se tiene las especies con aprovechamiento económico que no han sido domesticadas, con una sobreexplotación en su ambiente silvestre. Como hemos mencionado antes, el *Agave marmorata* Roezl está en peligro de extinción por su uso en la producción de Mezcal en Oaxaca.

La extinción de poblaciones de origen silvestre (*Agave tequilana*) alteran el ecosistema que incluye a algunas especies animales (Vargas-Ponce, *et al.*, 2007), entre estos los **murciélagos** *Leptonycteris nivalis*, *L. yerbabuenae* y *Choeronycteris mexicana*, **insectos** *Apis mellifera* y *Lasioglossum lasioglossum*,

**colibrís** *Lampornis clemenciae* y **aves** del orden passeriformes *Mimus polyglottos* de la propia región (Medellín, 2016; Ornelas *et al.*, 2002).

Muchas de las especies de murciélagos son migratorios y están bajo protección en dos categorías: amenazadas y en peligro. Lo cual, hace que el alimento que se obtenga en la zona de México sea primordial para su viaje y polinicen el *Agave* (Trejo-Salazar *et al.*, 2016). Estudios de Ornelas *et al.*, 2002 comprueban un proceso co-evolutivo entre los agaves y los murciélagos, adaptando la morfología de su lengua a la estructura floral, proporcionando alimento y facilitando la polinización (Figura 2).

**Figura 2.** *Choeronycteris mexicana* quiróptero nocturno polinizando



inflorescencias de *Agave*. Imagen obtenida de la Lista roja-Unidad Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN, 2016).

Debido a la migración de las especies ayudan a mantener un espectro amplio en la conectividad genética de las especies de *Agave*. Como estrategia para proteger a los murciélagos, los productores de mezcal con *A. cupreata* adoptaron la práctica de permitir que el 10% de las plantas en un cultivo florezcan, de modo

que se mantenga el alimento de los polinizadores y se de origen a una nueva generación de agaves a partir de semillas (Trejo-Salazar *et al.*, 2016). El proyecto Programa de Conservación de los Murciélagos de México (PCMM) ha sido exitoso, se dejó florecer el 2% (7,000 inflorescencias) de *A. tequilana*, logrando rescatar a la especie *Leptonycteris yerbabuenae* con la cual tiene una estrecha relación. En 1994, esta especie se encontraba en categoría de amenazada por la NOM-059, en el 2008 se consideró como vulnerable, para finalmente en el 2013 su nombre fue sacado de la Norma por descubrimientos de poblaciones estables y en crecimiento (National Geographic, 2015).

Publicaciones recientes han evaluado las comunidades microbianas de los murciélagos nectarívoros y otros (Galicia *et al.*, 2014; Carrillo-Araujo *et al.*, 2015; Banskar<sup>a</sup> *et al.*, 2016, Banskar<sup>b</sup> *et al.*, 2016). Análisis hechos por nuestro grupo de investigación encontró un vínculo con comunidades bacterianas endófitas que residen en las semillas de *Agave* (Beltrán-García comunicación personal). Esto sugiere que la pérdida de la interacción agave-murciélago afecta la estructura de los microbiomas de semillas directa o indirectamente a las plantas en función de su resistencia a diversos tipos de estrés abiótico y biótico en ambientes semiáridos, además de la baja viabilidad del polen por aberraciones cromosómicas ante la pérdida de esta interacción (Beltrán-García, resultados no publicados; Ruvalcaba-Ruiz y Rodríguez-Garay, 2002; Martínez-Rodríguez *et al.*, 2019).

### **7.3. Microorganismos de las semillas**

Las plantas evolucionaron en presencia de microorganismos y el establecimiento de una simbiosis influyó en la permanencia y desarrollo de estos organismos en la tierra. Los microorganismos benéficos fueron seleccionados por las plantas



para mejorar su adaptación y salud. Algunos de esos microorganismos benéficos pueden ser transmitidos verticalmente vía las semillas por muchas generaciones, como microbios permanentes. Sin embargo, los microbios transportados por las semillas pueden ser transitorios y originados de la transmisión horizontal (principalmente por el suelo). Las comunidades microbianas sobre o dentro de las semillas han sido detectados desde principios de 1840. Muchos de esos estudios se enfocaron en determinar el potencial patogénico de los microbios transportados, que sean capaces de promover la dispersión de enfermedades entre los cultivos (Munvold, 2009). Hoy, estamos conscientes que las plantas son colonizadas por una diversidad de comunidades microbianas que incluyen bacterias, hongos, arqueas y protistas como epifitos (sobre) o endófitos (dentro) de las semillas. Las mismas especies microbianas son capaces de colonizar la episfera (superficie externa) y la endosfera (tejido interno) de las plantas, indicando que existe un patrón continuo de colonización que es acompañado desde afuera hacia adentro de los tejidos o viceversa. El primer manuscrito que hace referencia a la presencia de endófitos fue en semillas comerciales de frijol (*Phaseolus vulgaris*). Se identificaron 23 bacterias, que fueron confirmadas como no patogénicas. El autor sugirió que estas bacterias son estrictamente comensales o mutualistas. A través de los años muchos estudios han sido realizados para descifrar la diversidad y el tipo de estructura de la comunidad microbiana endófito de las semillas de 62 especies de plantas reportadas en más de 50 estudios donde predominantemente se han caracterizado los phylum y clases *Gammaproteobacteria*, *Bacillus* y *Actinobacteria* (Shazad et al., 2018). Actualmente hay 155 géneros bacterianos detectados dentro de las semillas de varias plantas; sin embargo, muchas de esas bacterias han sido detectadas

esporádicamente, y solo una pequeña fracción de esas especies han sido consideradas parte del núcleo del bacterioma de las semillas. Algunas de esas bacterias no han sido detectadas en algún otro tejido de la planta, lo que sugiere que el ensamblaje del bacterioma de las semillas y su estructura son una combinación de transmisión vertical y horizontal concomitante. Las especies de bacterias de los géneros *Bacillus*, *Curtobacterium*, *Methylobacterium*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Paenibacillus*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Sphingomonas*, *Staphylococcus*, y *Xanthomonas* son los más prominentes. Seguidos de *Acidovorax*, *Acinetobacter*, *Brevibacillus*, *Burkholderia*, *Corynebacterium*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Erwinia*, *Flavobacterium* y *Stenotrophomonas*, con más de 5 cepas aisladas por cada género (Hardoim, 2019).

#### **7.4. Funciones mutualistas de los endófitos en las semillas.**

Durante la germinación y el desarrollo, las plántulas están en una etapa vulnerable y todas las interacciones con los microbios tienen un impacto drástico en la composición y diversidad en los sistemas naturales. En los sistemas agrícolas, el acondicionamiento de las semillas es un proceso estandarizado para las semillas comerciales. Esto incluye un tratamiento de las semillas que activa el metabolismo de pre-germinación para asegurarse la preservación de la integridad del genoma, una uniformidad en la germinación y un desarrollo rápido de la plántula (Paparella *et al.*, 2015). Sumado al tratamiento de acondicionamiento se usan desinfectantes convencionales, productos naturales bactericidas, fungicidas y pesticidas son añadidos para disminuir las infecciones en las semillas y en la plántula recién desarrollada. Estos tratamientos incrementan la calidad y el rendimiento en los cultivos; sin embargo, los

tratamientos también reducen la población de microbios benéficos dentro y fuera de la semilla. La planta cuando interactúa con los microbios mutualistas mejoran la germinación, el tamaño y peso de las raíces y las partes aéreas de las plantas, la toma de nutrientes, el contenido de clorofila y la tolerancia a la tensión biótica y abiótica y el incremento del rendimiento. Las propiedades benéficas de los microbios a la planta incluyen la fijación de nitrógeno (Macedo-Raygoza *et al.*, 2019), la biosíntesis y modulación de fitohormonas incluyendo las auxinas, giberelinas, citocininas, etileno y poliaminas (Celador-Lera *et al.*, 2018; Shazad *et al.*, 2016; Jorge *et al.*, 2019; Tavares *et al.*, 2018; Kampfer *et al.*, 2014). Por otra parte, las bacterias favorecen la asimilación de nutrientes del suelo como por ejemplo: la solubilización de hierro, fósforo orgánico e inorgánico (López *et al.*, 2018); mejoramiento de la tolerancia a metales (Sánchez-López *et al.*, 2018) y actividades antimicrobianas, incluyendo la síntesis de antibióticos (Verma y White, 2018; López *et al.*, 2018).

#### **7.5. ¿Cuál es el microbioma del *Agave* y su efecto sobre la planta?**

La gran capacidad para crecer en ambientes extremos han hecho al agave de interés científico y nos hace preguntarnos, ¿cómo es que logran tal resiliencia? Ya que se desarrollan bajo condiciones de sequía, exposición alta de radiación UV, cambios abruptos de temperatura (4°C–60°C), crecimiento en suelos rocosos carentes de nutrientes y bajo condiciones ambientales hostiles. La supervivencia del *Agave*, lo convierte en la principal fuente biótica en los ambientes áridos. \*Resiliencia, ha sido definida como la capacidad de los organismos en absorber el estrés ambiental y mantener las funciones, adaptarse, reorganizarse y evolucionar, de tal forma que se mejore la

sustentabilidad del organismo, de tal forma que este quede preparado o sus generaciones futuras para los futuros cambios.

Usando metagenómica y el análisis funcional *in silico* se ha analizado la composición y diversidad de las comunidades microbianas en especies de agave silvestres y domesticadas (Fonseca-García *et al.*, 2018). Las bacterias dominantes pertenecen al filo *Proteobacteria*, *Actinobacteria* y *Acidobacteria*, y su diversidad es modificada en suelos con bajo contenido de nitrógeno (Desgarenes *et al.*, 2014). Miembros del filo *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* y *Bacteroides* comprenden más del 80% de las comunidades asociadas a las plantas. Las bacterias se encuentran en prácticamente todos los compartimentos de los tejidos de la planta. Por ejemplo, Martínez-Rodríguez *et al.*, 2014 encontraron poblaciones de hasta 3 millones de UFC/g de tejido fresco en plantas de *A. tequilana*. Sin embargo, el proceso de domesticación de esta planta con fines de producción masiva ha influido en su diversidad microbiana, con mayor densidad de bacterias y arqueas que de hongos. La clase predominante en los tejidos de *A. tequilana* son los *Enterobacteriales* (filo *Proteobacteria*, grupo  $\gamma$ -proteobacteria) representando el 43% de la rizosfera y el 27.6% de los Flavobacteriales (Desgarenes *et al.*, 2014, Coleman-Derr *et al.*, 2015). La sequía aparentemente no altera la composición de las comunidades microbianas, ya que son similares entre especies, lo que sugiere que esos microorganismos participan en el acondicionamiento de la planta. Por lo que la adaptación de los agaves a las áreas áridas, ambientes extremos y suelo nutricionalmente limitados pueden ser mediados no solo por el metabolismo CAM o la morfología de la planta, sí no también por sus microorganismos simbióticos.

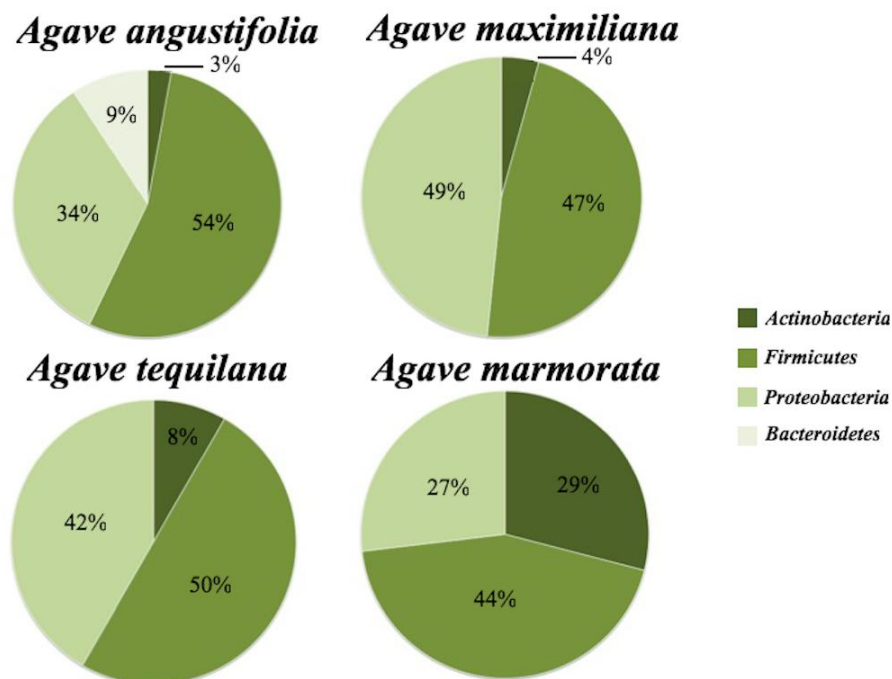
### 7.6. Microbioma de las semillas de Agave, ¿Cuál es su función?

El microbioma central de una planta es definido como el grupo de miembros microbianos que son compartidos entre las especies de las plantas. Poco se sabe del microbioma de las semillas en plantas mexicanas. Nuestro grupo de investigación se ha esforzado en conocer a los microorganismos asociados a las semillas de especies de agaves. La diversidad y densidad poblacional encontrada en las semillas de *A. marmorata*, *A. tequilana*, *A. americana*, *A. salmiana*, *A. maximiliana*, tienen una correlación por géneros que comparten en el microbioma de semillas: *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter* y *Stenotrophomonas* (Martínez-Rodríguez, 2017; Martínez-Rodríguez et al., 2019). Sin embargo, poblacionalmente *A. tequilana* es quien menos bacterias tiene comparado con *A. angustifolia* y *A. marmorata*. Un total de 500 aislados bacterianos fueron identificados. Los aislados de *A. maximiliana* fueron agrupados en 8 géneros, 16 géneros en *A. angustifolia*, 14 géneros en *A. tequilana* y 19 géneros en *A. marmorata*. El filo más común entre las especies fue el *Firmicutes* que constituye entre el 44%-54% del total de especies en los *Agaves* estudiados. *Proteobacteria* fue el segundo filo más abundante y contiene 28 especies repartidas entre los agaves estudiados (Figura 4).

De manera interesante, el patrón de distribución de los aislados de las semillas muestra que 14 especies de bacterias comprenden el 40% de los aislados totales, siendo las bacterias más abundantes *Bacillus pumilus*, *B. subtilis*, *Alcaligenes faecalis* y *Enterobacter cloacae*. *Sphingobacterium thalpophilum* del filo Bacteroidetes fue la segunda más abundante. *Pseudomonas aeruginosa*, *E. cowanni* y *Stenotrophomonas maltophilia* fueron proteobacterias abundantes en las semillas. El tercer grupo incluye a *Kocuria marina*, *B. thuringiensis*, *B.*

*sonorensis* y *B. tequilensis* con 7 cepas aisladas. En la figura 3 se presenta la abundancia relativa de los endófitos transmitidos por las semillas de las 4 especies de Agave.

Algunos de estos microorganismos endófitos han sido reportados como promotores del crecimiento de las plántulas, favorecen la ingesta de nutrientes y la resistencia al estrés biótico y abiótico, en algunos casos pueden ser usados como alimento para las plantas (Beltrán-García *et al.*, 2014). Por ejemplo, la funcionalidad de los taxones de *Bacillus* y *Pseudomonas* va desde la promoción de crecimiento de las plantas, hasta la protección de enfermedades. Se ha reportado la capacidad de *Enterobacter* para aumentar la germinación de las semillas y el crecimiento de las plántulas (Shazad *et al.*, 2018).



**Figura 3.** Diagrama de Venn de la abundancia relativa de los filos presentes en las semillas de cuatro especies de Agave. Uno domesticado (*A. tequilana*), 2 Semi-domesticados (*A. maximiliana* y *A. angustifolia*) y 1 silvestre (*A. marmorata*).

Beltrán-García *et al.*, 2014 y García Ochoa, 2017 fundamentan que *Enterobacter cloacae* y *Bacillus tequilensis* mantienen el crecimiento de las plantas por medio de la transferencia de nitrógeno orgánico a través de un fenómeno que llaman atrapamiento oxidativo de nitrógeno, utilizando peróxido de hidrogeno producido por las plantas.

#### **7.7. Microbioma de las semillas de *A. marmorata* y su dinámica.**

La dinámica de la comunidad microbiana de *A. marmorata* desde la semilla hasta la plántula fue analizada previamente (Martínez-Rodríguez, 2017). Existe una variabilidad significativa en las semillas y en los subsecuentes estados de emergencia a los 10, 20 y 60 días, incluyendo el desarrollo de la plántula hasta un año. En el estado “0 o de semilla intacta”, 95 cepas fueron aisladas y agrupadas en 20 géneros y 35 especies. El filo Firmicutes (44%) domino el número total de aislados de la semilla, seguido por el filo *Actinobacteria* (30%) y el *Proteobacteria* (26%). El mayor número de aislados correspondió a los generos *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Kocuria*, *Stenotrophomonas* y *Micrococcus*, reconocidos como benéficos. Una pregunta interesante que debe ser contestada, es porque las semillas de los agaves ¿almacenan *Firmicutes* y

*Actinobacteria*? Sabemos que los *Firmicutes* incluyen bacterias que resisten la desecación y la radiación ultravioleta y puede proveer una ventaja en su capacidad para sobrevivir en las semillas. Las especies de *Bacillus* pueden regular la expresión génica de las plantas, desde la remodelación de la pared celular, la síntesis de fitohormonas, incluyendo auxinas hasta los transportadores de nitrógeno orgánico. Un miembro del filo *Actinobacteria*, *Micrococcus luteus* fue identificado repetitivamente como endófito de semillas en los agaves; esta bacteria produce una proteína que funciona como un factor de resucitación, que facilita la división celular y remodela la envoltura celular en bacterias viables, pero no cultivables. La liberación de esta proteína influye en activar células vecinas que están en estado de dormancia. La abundancia de los *Firmicutes* y *Actinobacteria* en el estado “0”, crea un posible escenario de la función de esos microbios en el agave y quizás en algunas otras plantas de ambientes áridos. En el cuadro 1 se presentan géneros bacterianos aislados en distintas etapas.



**Cuadro 1.** Géneros bacterianos identificados en las diferentes etapas de la semilla (0 días) y durante el desarrollo de la plántula (10, 20, 60, 365 días).

| ETAPA<br>DE<br>SEMILLA<br>(DÍAS) | GÉNERO BACTERIANOS IDENTIFICADOS                                                                                                                                                                                                                                                                |
|----------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 0                                | <i>Acinetobacter, Arthrobacter, Bacillus, Brevibacterium, Brevundimonas, Curtobacterium, Enterobacter, Kocuria, Kosakonia, Klebsiella, Kytococcus, Lysinibacillus, Micrococcus, Pantoea, Pseudomonas, Rhodococcus, Salmonella, Solibacillus, Staphylococcus, Stenotrophomonas, Tsukamorella</i> |
| 10                               | <i>Achromobacter, Arthrobacter, Bacillus, Brevibacterium, Kytococcus, Micrococcus, Ochrobactrum, Pseudomonas, Staphylococcus, Stenotrophomonas</i>                                                                                                                                              |
| 20                               | <i>Achromobacter, Aeromonas, Arthrobacter, Bacillus, Brevibacterium, Micrococcus, Ochrobactrum, Pseudomonas, Sphingomonas, Staphylococcus, Stenotrophomonas</i>                                                                                                                                 |
| 60                               | <i>Bacillus, Alcaligenes, Arthrobacter, Burkholderia, Brevibacterium, Kocuria, Micrococcus, Ochrobactrum, Pseudomonas, Staphylococcus</i>                                                                                                                                                       |
| 365                              | <i>Burkholderia, Lysinibacillus, Staphylococcus, Stenotrophomonas</i>                                                                                                                                                                                                                           |

#### 7.8. La micropropagación como una alternativa para la restauración y conservación genética.

La técnica de cultivo de tejidos *in vitro* de plantas usa células, tejidos, órganos o plantas completas libres de microorganismos patógenos, bajo condiciones

nutricionales y ambientales controlados (Thorpe, 2007). Es ampliamente utilizada para producir clones de los tejidos y multiplicarlos. La técnica depende de la totipotencia que tengan las células vegetales para expresar el genoma completo (Haberlandt 1902). La multiplicación del tejido resulta de inducir continuas divisiones celulares mitóticas y la organogénesis ocurre a partir de tejidos somáticos, yemas o meristemos (Miguel-Luna *et al.*, 2014).

Una alternativa de uso de la micropropagación se enfoca a multiplicar plantas *in vitro* de importancia económica (Martínez-Palacios *et al.*, 2003) y para la conservación de germoplasma (Pedrosa-Manrique *et al.*, 2008), debido a que varias especies están disminuyendo por su explotación no planificada (Semarnat, 2010). La micropropagación presenta cuatro etapas principales: 1) establecimiento del cultivo, 2) desarrollo y multiplicación, 3) enraizamiento y 4) aclimatación d las plántulas. A estas se añade una etapa previa, considerada como la etapa “0” que implica la preparación de los explantes para el establecimiento, desde eliminar las contaminaciones que el tejido pueda contener y la selección de su calidad: buscando el tipo del órgano, edad ontogénica y fisiológica del mismo, el tamaño y el estado sanitario general de la planta donante.

#### **7.8.1. Requerimientos básicos para una propagación efectiva.**

**El medio de cultivo.** - Este debe contener todos los nutrientes necesarios para el crecimiento y desarrollo normal de las plantas. Está compuesto principalmente de macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, otros componentes orgánicos,

reguladores de crecimiento como auxinas, citoquininas y giberelinas, fuentes de carbono y agentes gelificantes como el agar para medios sólidos. El medio de Murashige y Skoog (MS) es el más usado para la propagación vegetativa de diversas especies de plantas. Este es considerado la base para la propagación de una infinidad de plantas, donde las modificaciones principalmente esta relacionadas con las concentraciones de hormonas y otros estimulantes del crecimiento.

**Los reguladores del crecimiento de las plantas (PGR's).** - Este tipo de moléculas juegan un rol esencial en este tipo de ensayos, ya que determinan la vía de crecimiento de las células y tejidos vegetales que son inducidos mediante el medio de cultivo. Por ejemplo, las citoquininas promueven la división celular e induce la formación de raíz, incluyendo la proliferación de brotes axilares, en este grupo de PGR's se encuentran moléculas ampliamente usadas en los cultivos vegetales, entre estas: 2,4-D (Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético), BAP (6-Bencilaminopurina), NAA (Ácido 1-Naftalenacético), BA (6-Benciladenina), KIN (Kinetin), ZEA (Zeatina), 2iP (6- $\gamma$ ,  $\gamma$ -dimetilaminopurina), TDZ (Thidiazurón). Las auxinas son utilizadas para la formación de tejido radicular y crecimiento las más utilizadas son: ANA (Ácido 1-naftalenacético), 2,4-D (Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético), AIA (Ácido indol-3-acético), AIB (Ácido 4-indol-3-butírico), NOA (Ácido naftoxi-2-acético), Dicamba y el Picloram mayormente usadas. En el grupo de las giberelinas se utiliza GA3 (Ácido giberélico 3) para amentar el crecimiento y para promover el alargamiento de las células (Hussain *et al.*, 2012).

#### **7.9. Micropropagación de especies de Agave.**

Se han establecido diversas metodologías para la micropropagación del género *Agave*, considerando así el cultivo de tejidos, la tecnología más eficiente para la mejora continua de la agricultura, ante la eliminación de enfermedades y producción de metabolitos secundarios, generando variantes somaclonales y gametoclonales, a través de semillas, cortes, injertos o estratificaciones libres de virus (García-González *et al.*, 2010). Puede realizarse a través de tres vías de regeneración: brotación de yemas adventicias preexistentes, producción de yemas de *novo* y embriogénesis somática. Sin embargo, la gran controversia es que se generan plantas iguales (clones) que suelen ser más susceptibles a enfermedades ya que en esas plantas no existe variabilidad genética, dando la oportunidad de ser más frágiles y las especies sin variaciones genéticas propensa a que no se mejore la especie poblacional, provocando su extinción.

La proliferación a través de brotes axilares es una garantía de estabilidad genética (debido a la presencia de tejido meristemático); sin embargo, su rendimiento es limitado debido a la necesidad de utilizar explantes meristemáticos. La organogénesis adventicia es mucho más eficiente, ya que se puede usar para producir brotes de cualquier explante (pétalos, raíz, hojas, etc).

La embriogénesis somática, es un proceso durante el cual las células vegetales no cigóticas, incluidas las células haploides, forman embriones, y en la última estancia plantas fértiles. Dado que las plantas presentan millones de células somáticas que pueden adquirir competencia para realizar la embriogénesis, el rendimiento de la técnica es enorme. Ante los resultados, se cree que la embriogénesis somática es el método de propagación más eficiente (Lema-Ruminska and Kulus, 2012). Se han desarrollado protocolos eficientes con respecto a la micropropagación de *Agave tequilana* mediante técnicas de

embriogénesis somática, así como la producción de individuos haploides, triploides y trisómicos útiles para los diversos procesos de mejoramiento, de estudios genéticos y de totipotencia de las células y tejidos en el género agave (Rodríguez-Garay y Rodríguez-Domínguez, 2018).

Dado que las condiciones *in vitro* son muy diferentes de las condiciones en la naturaleza, algunas plantas muestran problemas de aclimatación a condiciones *ex vitro*. Sin embargo, para *A. victoria-reginae*, el 90% de los brotes axilares sobrevivieron a la aclimatación y se convirtieron en plantas sanas (Martínez-Palacios *et al.*, 2003). Otras especies de agave han sido micropropagadas exitosamente, aunque no están aún amenazadas de la extinción, entre estas: *Agave parrasana* Berger (Santacruz *et al.*, 1999). En otras especies de agave que aún no se encuentran amenazadas o en peligro de extinción como: *A. cantala* Rob. (Binh *et al.*, 1990), *A. sisalana* Perrine (Bihn *et al.*, 1990), *A. victoria-reginae* Moore (Rodríguez-Garay *et al.*, 1996), *A. salmiana* Otto ex. Sal (Ramírez *et al.*, 2010), *A. mapisaga* Trel (Melda y Ruíz, 2004) utilizando como explante semillas y rizomas, *A. tequilana* Weber (Portillo *et al.*, 2007), *A. inaequidens* Koch (Aureoles-Rodríguez *et al.*, 2008), *A. americana* (Chen *et al.*, 2014), *A. angustifolia* Haw (Moja-Mio *et al.*, 2015), *A. potatorum* Zucc (Luna-Luna *et al.*, 2017) y *A. marmorata* (Aguilar y Rodríguez, 2018).

## 8. MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPO

### 8.1. Material biológico

#### Semillas

Las semillas de *Agave marmorata* (Figura 4) que fueron utilizadas para este proyecto se obtuvieron de Tlacolula de Matamoros en el Valle de Oaxaca, México en las coordenadas 16° 57' 15" N, 96° 28' 45" W.



**Figura 4.** Semillas fértiles de *A. marmorata* de 0.5 cm de ancho x 0.5 cm de longitud, su testa negra brillante, colectadas directamente de los frutos en un quito de 5.5 m de planta de 20 años con una gran número de frutos. Se colectaron más de 5000 semillas. Las semillas fueron colectadas por el Biol. Francisco Echaide Aquino.

## 8.2. Cepas bacterianas endófitas

En el cuadro 2 se presentan las cepas de bacterias endófitas utilizadas en este trabajo.

**Cuadro 2.** Especies de bacterias endófitas utilizadas en este estudio, origen y propiedades agronómicas.

| Origen | Especie de planta origen | Cepa                            | Especie                              | NFB | N-BRIP | ACC |
|--------|--------------------------|---------------------------------|--------------------------------------|-----|--------|-----|
| P      | <i>A. marmorata</i>      | N                               | <i>Achromobacter xylosoxidans</i>    | +   | -      | +   |
| P      | <i>A. marmorata</i>      | EP <sub>60</sub> A <sub>3</sub> | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>        | +   | -      | +   |
| S      | <i>A. tequilana</i>      | Cep 10                          | <i>Bacillus tequilensis</i>          | +   | +      | +   |
| S      | <i>A. tequilana</i>      | SEA01                           | <i>Enterobacter cloacae</i>          | +   | +      | +   |
| S      | <i>A. angustifolia</i>   | K5A                             | <i>Alcaligenes faecalis</i>          | +   | +      | +   |
| S      | <i>A. angustifolia</i>   | K1                              | <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> | +   | -      | +   |

\*Bacterias endófitas obtenidas de las semillas de *A. marmorata*, *A. tequilana* y *A. angustifolia*. Tejido: P =plántula, S= semilla

\*\*Nombre de la cepa bacteria endófitas y especie Identificada por análisis de perfil ribosomal y caracterizada por el software Biotyper<sup>R</sup> (Bruker, Bremen, Alemania) y secuenciación del producto de PCR del ARNr 16S.

Las propiedades agronómicas fueron: fijación de nitrógeno (NFB), solubilización de fosfatos (N-BRIP) y ACC deaminasa. (+) Positivo, (-) Negativo.

*Achromobacter xylosoxidans* y *Pseudomonas aeruginosa* Fueron aisladas de plántulas con un desarrollo de 10 y 60 días. *Bacillus tequilensis* y *Enterobacter cloacae* de la semilla (tiempo 0) *Alcaligenes faecalis* y *Curtobacterium flaccumfaciens* de semilla (tiempo 0) de *A. angustifolia*.

## 9. MATERIALES

- Agitador magnético
- Algodón
- Aluminio
- Arena de desierto
- Bisturí
- Cajas Petri plástico
- Cajas Petri de cristal
- Cajas de policarbonato Magenta GA-7
- Celdas de cuarzo de 1 ml
- Charola para pesado
- Espátula
- Frascos vidrio de 125 ml
- Frascos de vidrio 255 ml
- Infusores de té
- Matraz Erlenmeyer 1 L
- Matraz Erlenmeyer 500 ml
- Matraz volumétrico de 1 L
- Matraz volumétrico de 500 ml
- Matraz volumétrico de 250 ml
- Mechero de alcohol
- Papel absorbente
- Pinzas de disección sin dientes
- Porta objetos y cubre objetos
- Probetas
- Puntas de pipeta de 200  $\mu$ l
- Puntas de pipeta de 5 ml
- Tapas de polipropileno
- Vasos de precipitado



## 10. REACTIVOS

|                                                            |                                                       |
|------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
| (3',3') Diaminobencidina tabletas<br>(Sigma-Aldrich, USA)  | Fosfato de Potasio monobásico<br>(Probiotek, México)  |
| 6-aminopurina (Sigma-Aldrich)                              | Glucosa (HYCEL, México)                               |
| Ácido $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico<br>(Sigma-Aldrich) | Hidróxido de Sodio (Golden Bell,<br>México)           |
| Ácido Bórico (Merck, Darmstat,<br>Germany)                 | KINETIN (Sigma-Aldrich)                               |
| Ácido Clorhídrico (Baker Analyzed,<br>México)              | Metanol grado HPLC (Golden Bell,<br>Anaheim, CA, USA) |
| Agar Bacteriológico (Bioxon, México)                       | Molibdato de Sodio dihidratado<br>(Fermont, México)   |
| Agar Soya Trypticaseína (Bioxon,<br>México)                | Nitrato de Amonio (Fermont, México)                   |
| Agarosa (IBI Scientific, México)                           | Nitrato de Potasio (Analytyka,<br>México)             |
| Agua milliq (Merck, Darmstat,<br>Germany)                  | Phytigel (Sigma-Aldrich, USA)                         |
| Azul de anilina (Sigma-Aldrich,<br>Germany)                | Sacarosa (HYCELL, México)                             |

Buffer H 7 (Golden Bell, México)

Sulfato Ferroso heptahidratado

(Producto Químicos

Monterrey, México)

Buffer pH 10 (JT Baker, USA)

Sulfato de Magnesio heptahidratado

(Golden Bell, Mexico)

Caldo Soya Trypticaseína (Bioxon,  
México)

Sulfato de Manganeso

monohidratado (Merck, México)

Carbón activado (Merck, México)

Sulfato de Potasio monobásico

(Merck, México)

## 11. METODOLOGÍA

### 11.1. Selección y establecimiento de líneas clonales de *Agave marmorata* Roezl derivadas de un banco de semillas.

Debido a la diversidad genética de las semillas y a la necesidad de tener varias líneas de plantas, se usaron los siguientes criterios para obtener una plántula que potencialmente pueda ser micropropagada.

**Índice de germinación de las semillas:** El inicio de la germinación se considera el día en el que las semillas fueron sembradas en el agar Phytigel; la aparición de la radícula es el parámetro-criterio que distingue la germinación. Las plántulas derivadas de germinación en los primeros 5 días se consideran óptimas para selección, sin embargo, algunas plántulas a pesar de su rápida germinación no logran sobrevivir tiempo después.

**Tamaño de la plántula:** este criterio fue realizado con mediciones del tamaño de las plántulas en el medio Phytigel a los 12 días en crecimiento a partir de la brotación de radícula, se seleccionaron aquellas que fueran de una longitud mayor a 3 cm. Para el grosor, se midió con regla la base de la planta (entre la hoja y la raíz), seleccionando aquellas que tuvieran entre 0.3 mm–0.5 mm.

**Formación de hojas verdaderas:** aquellas plántulas que sobrevivieron y cumplen los requisitos anteriores, se traspasaron a Cajas Petri con agar Phytigel en grupos de 5-7 plántulas por caja para facilitar y el desarrollo de las hojas verdaderas. Se dejaron crecer de dos a tres semanas en condiciones de 12 hora luz y 12 horas oscuridad. Se seleccionaron plántulas con dos hojas de 0.6 mm de ancho. Además, se analizó la coloración y la presencia de espinas marginales.

**Arquitectura de la raíz:** en paralelo se midió la elongación de la raíz, estimando un promedio para selección de 4 cm. El conteo de las raíces secundarias generadas con un promedio de dos por plántula y una densidad alta de pelos radiculares observada a perspectiva propia. Las raíces se tiñeron con DAB y azul de anilina para evaluar presencia de bacterias u hongos en el material vegetal que se selecciona para propagación.

## ***Procedimientos***

### **a) Desinfección de las semillas**

Para eliminar microorganismos epifitos alojados en la superficie de las semillas de *A. marmorata* se realizó un lavado con detergente Extran al 20% y agua corriente en agitación constante hasta eliminar los restos del detergente. Bajo una campana de flujo laminar se desinfectaron las semillas usando un infusor de té, que es sumergido en una solución de hipoclorito de sodio al 3% durante 20 minutos con agitación constante (Nota: asegurarse que el agitador magnético no golpee el infusor). Para el segundo lavado el infusor fue sumergido en una solución de etanol al 80% durante 20 minutos con agitación constante. El tercer lavado se hizo con agua destilada estéril a una temperatura de 75°C durante 15 minutos. El cuarto lavado fue con agua destilada estéril a temperatura ambiente durante 20 minutos cada uno. Este lavado se repetirá dos veces, para quitar los residuos de hipoclorito y etanol que pudieran tener las semillas.

Posterior a los lavados, las semillas se tomaron del infusor de té con pinzas de disección cuidadosamente y se colocaron de forma esparcida sobre papel absorbente estéril para su secado. El agua destilada del ultimo lavado fue

plaqueado en una caja petri con Agar Soya Trypticaseína (Casoy) para determinar el efecto del lavado y desinfección de la semilla.

Una vez secas las semillas estas fueron colocadas en cajas Petri de plástico estériles adicionadas con medio Phytigel al 2%. Por cada caja fueron sembradas de 12 a 20 semillas esparcidas, de forma que la parte plana de la semilla quedará en contacto con el medio ya que es punto de salida de radícula. Se sellaron individualmente con plástico para conservar esterilidad y aislar de futuras contaminaciones.

#### **b) Índice de germinación**

Para determinar el índice de germinación de *A. marmorata* se realizaron ensayos durante los años 2016 y 2017. Para el año 2016 se germinaron 2 sub lotes de 200 semillas con una repetición en los meses de mayo y noviembre (800 semillas totales). Para el año 2017, solo se puso en germinación un sub-lote con 200 semillas en el mes de enero. Esto con fines de valorar el efecto del tiempo sobre la viabilidad de la semilla y el vigor de las plantas para una posible selección.

Las semillas desinfectadas fueron colocadas en cajas Petri de plástico de 90 mm estériles adicionadas con medio phytigel al 2% (Sigma-Aldrich) para germinación. En cada caja se sembraron 12 semillas espaciadas aproximadamente 1 cm, de forma que la parte plana de la semilla quedará en contacto con el medio ya que es punto de salida de radícula. Se sellaron individualmente con plástico para conservar esterilidad y aislar de futuras contaminaciones. Las semillas fueron incubadas en una cámara bioclimática a temperatura constante de 27°C en periodos de 12 horas luz y 12 horas.

Una vez incubadas se determinó porcentaje de germinación y la germinación diaria, en relación con el tiempo de emergencia de la radícula. Los datos obtenidos se siguió la siguiente fórmula para sacar porcentaje:

$$\text{Porcentaje de germinación (\%)} = \frac{\text{Número de semillas germinadas} \times 100}{\text{Número de semillas totales}}$$

### **11.2. Cuantificación del índice de brotación por planta y análisis morfológico de *A. marmorata*.**

A partir de la selección, cada planta fue asignada con una clave de carácter arbitrario, por **AM** por *Agave marmorata* y el número de planta (Ej: **AM32**).

*Explantos y multiplicación in vitro.* Para la propagación clonal, a las plantas les fue removida la testa y la raíz en un corte longitudinal y les fue cortada la parte distal de las hojas. El medio de cultivo utilizado fue MS (Murashige y Skoog, 1962, Martínez-Rodríguez, 2017 modificado y carente de vitaminas), adicionado con 5 mg/L de BAP (6-Bencilaminopurina-citoquinina). Fueron añadidos 25 ml del medio en frascos de vidrio (capacidad de 125 ml) con tapas de polipropileno. Las plántulas fueron colocadas en los frascos y tuvieron un fotoperiodo de 12 horas luz y 12 horas oscuridad a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 2 meses. A partir del tejido multiplicado se acordaron nuevos criterios de evaluación morfológica para los brotes, los cuales se presentan en el cuadro 3.

**Cuadro 3.** Criterios de selección del explante de planta derivada de semilla inducido para brotación.

| Nº | Criterios                   | Descripción                                                                                                       |                                                                                                       | Abreviación |
|----|-----------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| 1  | <b>Estado del tejido</b>    |  Tejido con oxidación abundante  |                                                                                                       | OX          |
|    |                             |  Formación de brotes cristalinos |                                                                                                       | CT          |
|    |                             |  Presencia de raíces             |                                                                                                       | RT          |
|    |                             |  Senescencia de hojas            |                                                                                                       | TM          |
| 2  | <b>Coloración</b>           |  Verde                           |                                                                                                       | VE          |
|    |                             |  Púrpura                         |                                                                                                       | PU          |
|    |                             |  Blanco                          |                                                                                                       | BL          |
| 3  | <b>Número de brotes</b>     | Cuantificación aproximada de brotes nuevos producidos por el tiempo de cultivo.                                   |                                                                                                       | Número      |
| 4  | <b>Morfología de brotes</b> | <b>Plantas completas</b>                                                                                          | Aquellas plantas con hojas desarrolladas, tamaño mayor a 1.5 cm, diferenciación entre tejido          | COM         |
|    |                             | <b>Brotes</b>                                                                                                     | Plantas con una mala o lenta diferenciación, gran producción de masa vegetal, hojas menores a 1.5 cm. | BRO         |

El índice de brotación se realizó en las líneas clonales con 5 réplicas cada una efectuándose un análisis de experimentos multifactorial. Los propágulos obtenidos se cortaron en un grupo de 5 a 10 brotes adventicios con una altura de 0.8 mm, colocándolos al centro en frascos añadidos con 25 ml de medio de cultivo MS al 100%, suplementado con 30 g/L sacarosa, 7.5 g/L agar y 5 mg/L (22.2  $\mu$ m) de BAP esterilizado en autoclave 121°C durante 20 minutos. El cultivo de los explantes a brotación se realizó en un fotoperiodo de 12/12 horas luz/oscuridad con lámparas de LED a una temperatura de 25  $\pm$  2°C en un periodo

de dos meses, cada línea fue evaluada por el número de brotes adventicios producidos mediante un conteo por frasco y línea, de igual forma se midió con regla la longitud en centímetros de cada uno de los brotes y al final se saca un promedio. También se evaluó presencia de tejido muerto y tejido cristalizado con un valor máximo de 1 como abundante.

### **11.3. Aclimatación de plantas obtenidas *in vitro* de *Agave marmorata* y plantas de *Agave tequilana*.**

Para la especie de *A. marmorata* estas plantas fueron derivadas de las líneas clonales propagadas en el Laboratorio 314 ICET (E) de la Universidad Autónoma de Guadalajara. Las plantas de *A. tequilana* se obtuvieron de la empresa Nature Source Improved Plants de Mexico S.A de C.V., ubicada en Tapachula, Chiapas.

Las líneas clonales seleccionadas para el proceso de individualización son separadas y colocadas en cajas de policarbonato Magenta GA-7 añadidas con 120 ml de medio MS modificado al 100% adicionado con 0.025 mg/L de Kin (KINETIN-utilizado como auxina, Sigma-Aldrich), 30 g/L de Sacarosa y 2 g/L de carbón activado, el ajuste de pH se realizó con carbón activado debido a que acidifica el medio. Se dejaron en crecimiento y proliferación de raíces durante 100 días en un fotoperiodo de 12/12 horas luz/oscuridad con lámparas de LED a una temperatura de  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , alcanzando un tamaño considerado de 3 a 4 cm, cada una de las plantas se sacaron del medio de cultivo para ser pesadas en un promedio de 2 g. A cada planta se le marcaron 3 raíces nuevas, con un palillo de madera se colocó esmalte rosa, la marca se después de la medición de 1 cm



a partir de la punta de la raíz, dejaron secar completamente antes de pasar al sustrato que fue arena del desierto lavada y esterilizada por tres horas.

Las plantas seleccionadas de *A. marmorata* fueron colocadas en frascos de vidrio a los cuales se les agrego arena de desierto/vermiculita como sustrato en una relación 50/5 y para *A. tequilana* fueron frascos con una relación 150/15 con tapones de algodón que les permite el intercambio de gases más aluminio. Los microcosmos fueron esterilizados durante 3 horas a 121°C. Por cada frasco se plantaron de seis a ocho plantas dando un total de 7 grupos de inoculación para las dos especies de plantas.

El riego se realizó con 2.5 ml por planta de una solución de MS (carente de hormonas y vitaminas) con fines de nutrición y ayudar en el establecimiento de las plantas en un sustrato compuesto por arena de desierto/vermiculita. Los riegos posteriores fueron con 2.5 ml de agua destilada estéril en un periodo de 14 días. Las plantas fueron aclimatadas por 11 días en un fotoperiodo de 12/12 horas luz/oscuridad con lámparas de LED a una temperatura de  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

#### **11.4. Evaluación efectos de crecimiento de las líneas clonales seleccionadas de *A. marmorata* inoculadas con bacterias endófitas.**

Seis plantas fueron seleccionadas para cada uno de los 7 grupos para la inoculación con las siguientes bacterias endófitas: *Alcaligenes faecalis* (G2) y *Curtobacterium flaccumfaciens* (G3) como endófitas de *A. angustifolia*; *Bacillus tequilensis* (G4), *Enterobacter cloacae* (G5) cepas endófitas de *A. tequilana* y

*Acrhomobacter xylosoxidans* (G6) y *Pseudomonas aeruginosa* (G7) endófitas de *A. marmorata*. El G1 fue irrigado con agua como el control negativo.

**Cultivo de las bacterias.**- Las bacterias se incubaron en 50 ml de Caldo Casoy (Trypticaseína de soya) a 32°C durante 20 horas. En 10 tubos Eppendorf se agregó a cada uno 2 ml del caldo con crecimiento bacteriano, estos se centrifugaron a 10,000 rpm por 5 minutos, se colocaron en hielo mientras se decantó el sobrenadante, se colocaron nuevamente 2 ml a cada tubo para centrifugación, esto con el fin de concentrar la bacteria obtenida en el caldo se decantó el sobrenadante, a los tubos con el pellet de bacteria se les agregó 1 ml de solución glucosa al 0.1%, se agitaron vigorosamente en un vortex hasta que se re-suspendiera la pastilla, se centrifugó a 10,000 rpm por 5 minutos, este paso se llevó a cabo tres veces. Una vez lavada la bacteria se prosiguió a re-suspender en 5 ml de solución de glucosa al 0.1% en un matraz de 250 ml para ser ajustada a 1 abs (Espectro UV-VIS, Lambda 25). Durante el ajuste la bacteria en todo momento se encontró en hielo.

Se hicieron 5 inoculaciones a los grupos en un periodo de 14 días, cada planta se irrigó con 2.5 ml de bacteria los días 23, 25 y 27 de mayo del 2018, en las dos inoculaciones finales del día 01 y 05 de junio del 2018. La cantidad inoculada de bacteria aumentó a 5 ml por planta. Para el grupo de plantas correspondientes a *A. tequilana* se les dio una sexta inoculación el día 15 de junio 2018 con 5 ml por planta. El número de unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml) a una absorbencia de 1 a 600 nm fue de: *A. faecalis*  $52 \times 10^4$ , *C. flaccumfaciens*  $5 \times 10^4$ , *B. tequilensis*  $70 \times 10^6$ , *E. cloacae*  $176.5 \times 10^5$ , *A. xylosoxidans*  $15 \times 10^5$  y *P. aeruginosa*  $34 \times 10^4$ .

**11.4.1. Evaluación del crecimiento, biomasa producida en las plantas por inoculación de bacterias en *A. marmorata*.**

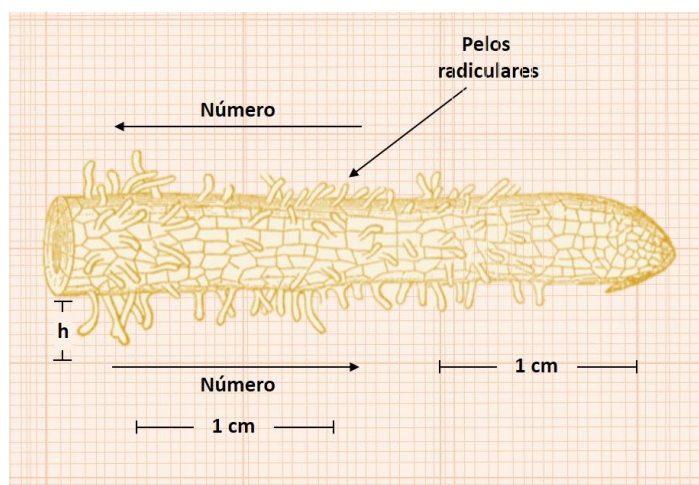
A cada planta se les midió como parámetros de crecimiento, la altura de la planta y las raíces usando una regla en los ejes “X” y “Y” sobre hojas blancas estériles, se contó el número de hojas presentes y se tomó el peso húmedo con una balanza granataria digital (OHAUS).

**11.4.2. Análisis de la estructura (arquitectura) de la raíz en plantas de *A. marmorata* y *A. tequilana* inoculadas con bacterias.**

Previo a la inoculación de las bacterias, las raíces fueron marcadas con un esmalte de uñas de color blanco. Después de 30 días post-inoculación con las bacterias, las raíces que fueron marcadas antes de colocarlas en aclimatación, fueron cortadas alrededor de 2 cm cada una, se disolvió una pastilla de DAB (3,3-diminobencidina) (Sigma-Aldrich) en 15 ml de agua destilada estéril, se agregó 5 ml de la solución en viales de vidrio junto con las raíces de G3, G4, G6 y G7, se dejaron en contacto con la solución durante 24 horas. Cumpliendo el tiempo fueron lavadas con agua corriente para quitar el exceso de tinción, las raíces se colocaron 2 ml de una solución azul de anilina durante 15 minutos.

Posteriormente fueron lavadas con agua corriente y se analizaron al microscopio. Se evaluó el promedio de número de pelos radiculares en 1 cm de raíz, contando en sentido arriba y debajo del fragmento, para su longitud se colocó una hoja milimétrica bajo el portaobjetos y a nivel de microscopio se registró la altura de 50 pelos radiculares en cada sentido para obtener un

promedio. Además, se determinó el número de raíces secundarias presentes en 1 cm el esquema a seguir se muestra en la figura 5.



**Figura 5.** Representación estructural de la raíz, esquema a seguir para el conteo de pelos radiculares, altura y presencia de raíces secundarias en 1 cm bajo hoja milimétrica.

### 11.5. Análisis Estadístico

Los datos se analizaron utilizando el programa estadístico STATGRAPHICS versión centurión XVI I.I (Statpoint Technologies Inc., Plains Virginia, USA.). Los parámetros brotación y de crecimiento de las plantas se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) multifactorial, con prueba de rango múltiple para la comparación de las medias del índice de brotación, número de hojas, producción de raíces nuevas, elongación de raíces y peso húmedo. La diferencia entre los tratamientos se consideró significativas a un nivel de probabilidad de  $P < 0,05$  (Tukey). Los datos de valor relativo entre los tratamientos de líneas y la evaluación de inoculación de bacterias en plantas se realizaron en Microsoft Excel 2013.

## 12. RESULTADOS

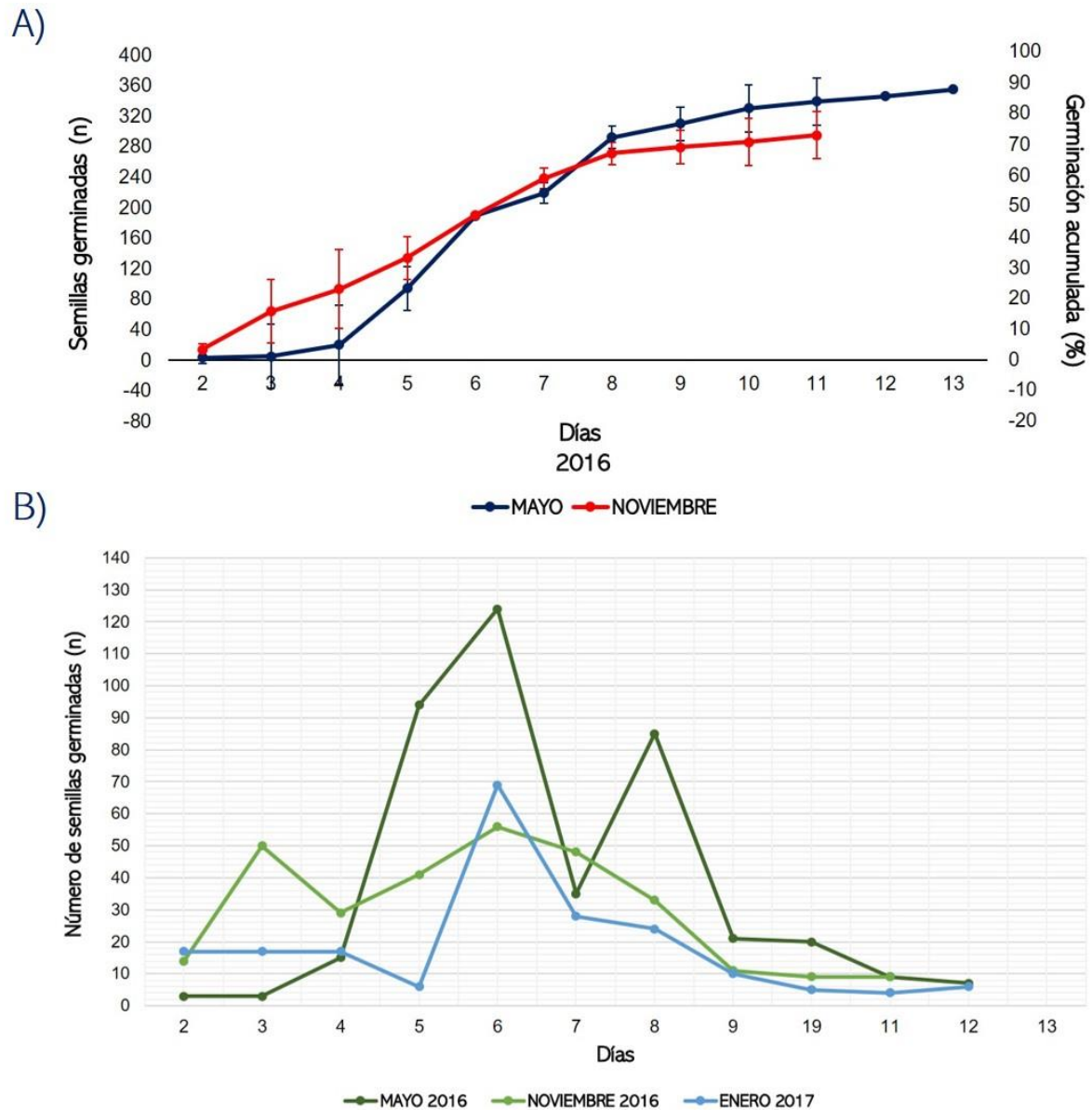
En la figura 6, se presentan los datos de porcentaje de germinación acumulada y la velocidad de germinación también nombrada germinación diaria ocurrido en los sub-lotes analizados en los años 2016 y 2017. La figura 6A muestra el comportamiento de germinación de los sub-lotes de mayo y noviembre de 2016, que derivaron las plantas llevadas hasta la micropropagación.

La germinación en el sub-lote de noviembre es más rápida, esta se manifiesta de manera acumulada en los primeros 4 días, prácticamente en dos días se alcanza un 30% de germinación, mientras que el sub-lote de mayo no supera el 10%. La pendiente del lote de mayo tiene un fuerte incremento a partir del día 4 hasta el día 6, específicamente un incremento del 10% hasta casi 50%, equivalentes a un diferencial de 140 semillas. La pendiente de germinación del sub-lote del mes de noviembre es constante desde el día 2 hasta el día 7, esta tiende a estabilizarse a partir del día 8. También, ambos sub-lotes tienen un mismo comportamiento aparente en el número de semillas germinadas en el día 8 de aproximadamente 270 semillas. Aunque no se observan diferencias significativas entre sub-lotes en el transcurso de la cinética de germinación, el sub-lote de 400 semillas del mes de mayo alcanza casi el 90% de germinación a los 13 días, mientras que el sub-lote de noviembre detiene la germinación en el día 11 con un 70% de germinación, después de ese tiempo no hay modificación en el número de semillas germinadas.

En la figura 6B, se presentan los datos de velocidad de germinación o germinación diaria, donde además se incluye un sub-lote de 400 semillas activadas en 2017. En general la germinación no se presenta de forma

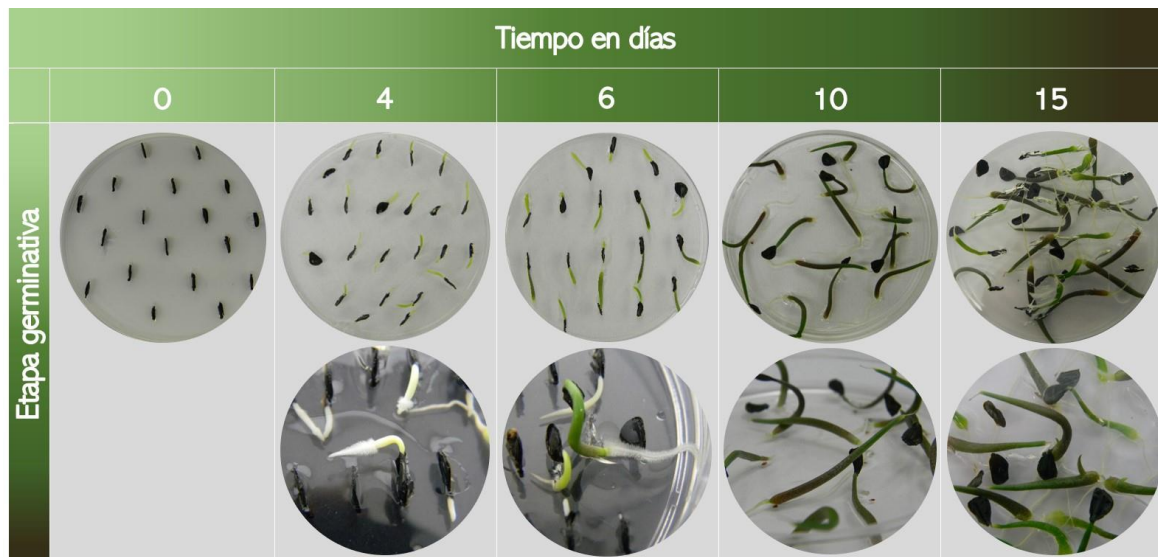
homogénea, es oscilante y variable con tendencia a estabilizarse. En esta figura, se observa que existe un pico de germinación en el sub-lote de mayo de 2016, comprendido entre el día 4 y 5, que es el mayor entre los tres sub-lotes. Se observa una fuerte pendiente del día 4 al 6 que decae al día 7 y se mantiene de forma oscilante hasta el día 9 y después se detiene o vuelve constante. El sub-lote de noviembre alcanza un pico del número de semillas germinadas (50) en el tercer día con un pico de 56 semillas como máximo en el día 6. Después el número de semillas germinadas por día decae de forma constante hasta el día 9, hasta que no se observan cambios en el número de semillas hasta el día 11, donde se para totalmente la germinación. El lote de 2017 aparentemente inicia con una mejor germinación (17 semillas) al día 2, pero esta tasa se mantiene constante hasta el día 4, decae y aumenta abruptamente entre el día 5 y 6. El material vegetal que se selecciono fue aquel en el que las semillas emergieron la radícula entre los primeros 2-3 días.

La figura 7, muestra los aspectos macroscópicos de la germinación de las semillas con respecto a los días de crecimiento y la apariencia morfológica de las plántulas formadas. Se resalta la aparición de la radícula desde el segundo día, formación de la hoja cotiledónea o embrionaria y el número de pelos radiculares, así como el tamaño de la raíz. Los agaves tienen sola una hoja embrionaria característico de las plantas monocotiledóneas.



**Figura 6.** Cinética de germinación de 3 sub-lotes de semillas de *A. marmorata*.

A) Porcentaje acumulado de germinación. B) Germinación diaria. No se observan diferencias significativas entre sub-lotes del 2016. El sub-lote de semillas con mayor vigor de germinación es el correspondiente al mes de mayo. La disminución en la tasa de germinación del sub-lote 2017, indica envejecimiento de la semilla. Medio agar Phytigel sin nutrientes; n=400 semillas por sub-lote.

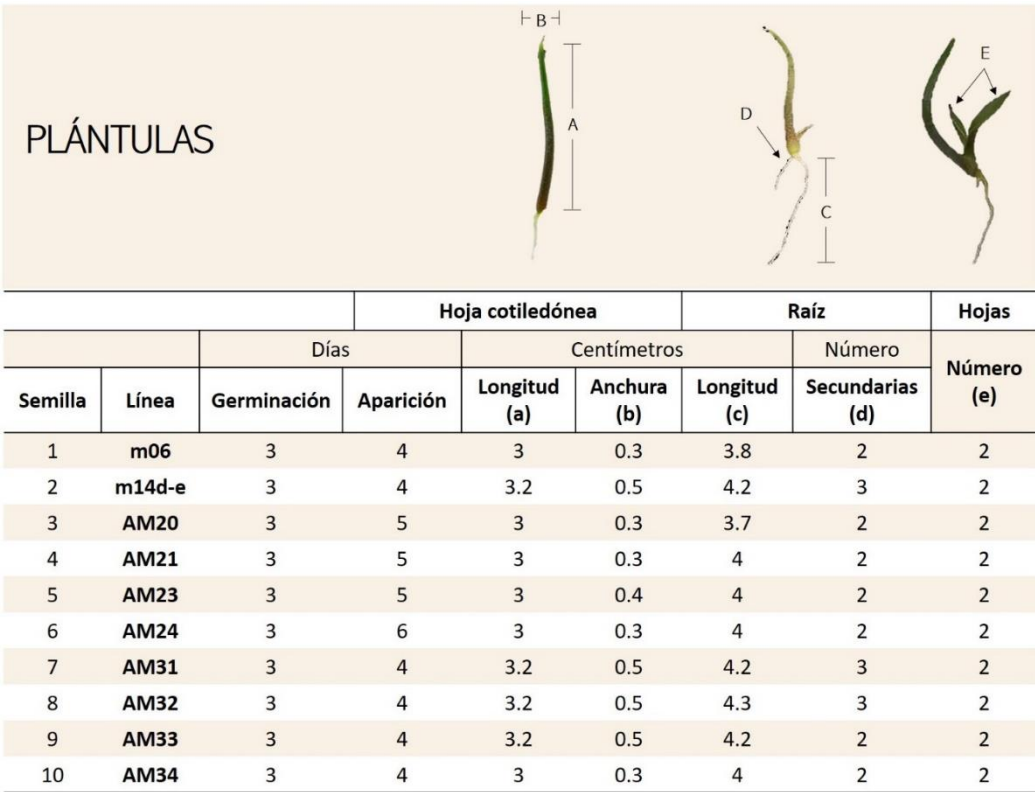


**Figura 7.** Aspectos macroscópicos de la cinética de germinación de las semillas de *A. marmorata*. En la parte superior se observa el aspecto de las cajas en Agar Phytigel desde el tiempo hasta el día 15. Abajo un acercamiento de algunas de las plantas formadas resaltando la aparición de la radícula, la extensión de la hoja embrionaria, los pelos radiculares y la aparición de la hoja verdadera (día 15).

Los criterios después de la germinación a consideración, fueron el tamaño de la plántula, la formación de la hoja verdadera y la raíz. Al principio se seleccionaron 30 semillas-líneas, sin embargo, con el paso del tiempo las plántulas desarrollaron hoja embrionaria cloróticas, y algunas fueron cristalinas por lo que se descartaron 20 líneas. Diez líneas sobrevivieron a la siguiente fase de seguimiento y para la brotación. En la figura 8, podemos observar que las hojas cotiledóneas u hojas embrionarias aparecieron entre los 4 y 6 días. Solo 6 líneas clonales formaron la hoja embrionaria a los 4 días. La longitud fue variable y solo las hojas de 4 líneas superaron los 3 cm de longitud con ancho de 0.5 cm. Con respecto a la arquitectura de la raíz, las mismas 4 líneas también sobresalieron



por tener un tamaño de raíz (longitud) superior a los 4 centímetros y tener en promedio 3 raíces secundarias. Las raíces secundarias aparecen después de los 20 días a partir de la germinación. Las hojas verdaderas aparecen a los 60 días post-germinación y en su totalidad las plantas formaron 2 hojas. Estas líneas fueron nombradas como m14d-e, AM31, AM32, AM33. Sin embargo, las 10 líneas mencionadas en la figura 7 fueron llevadas a evaluación del índice de brotación. En general las plántulas se observaron vigorosas, turgentes y de un color verde brillante.



**Figura 8.** Selección de líneas clonales a partir de 10 semillas germinadas. Se presentan datos de germinación, elongación de raíz; raíces secundarias, producción de pelos radiculares (densidad) y la aparición de hojas verdaderas.

### 12.1. Clasificación de líneas clonales e índice brotación.

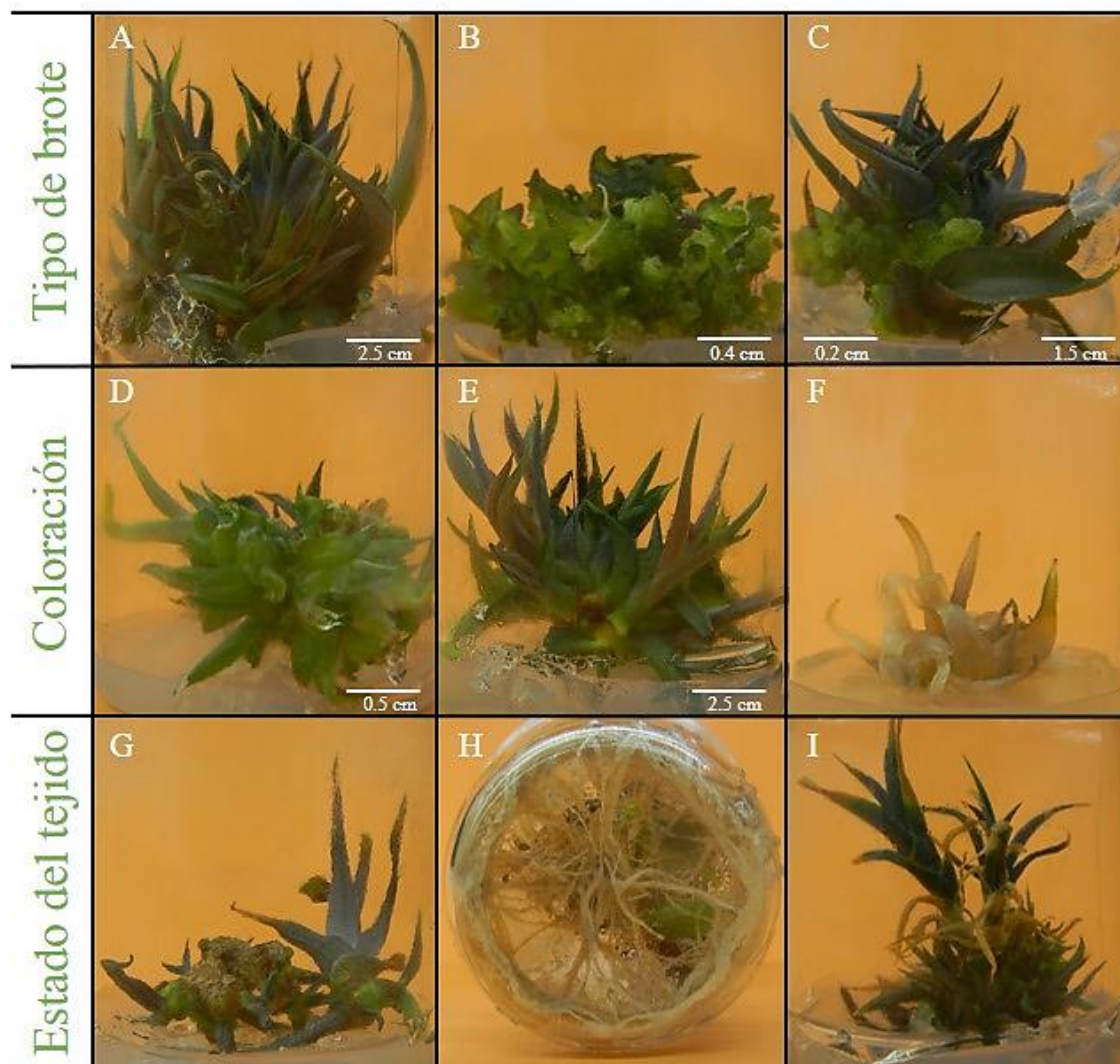
Los métodos de propagación *in vitro* de agaves usan citocininas en altas concentraciones para inducir la formación de brotes adventicios en la base de las plántulas cultivadas *in vitro*. El medio MS a 5 mg/L de 6-Benzylaminopurina (BAP) que induce la brotación a esta concentración, ya que una mayor induce enraizamiento. Las plántulas tuvieron un fotoperiodo de 12 horas luz y 12 horas oscuridad.

La figura 9 muestra los criterios fisiológicos que nos llevaron a seleccionar 4 líneas clonales de todas las semillas germinadas *in vitro*. Sin embargo, se analizaron las 10 líneas generadas, las cuales mostraron una amplia variación en la eficiencia de multiplicación. Al medir la característica de **brotes completos** se observó que el tamaño de los brotes promedia hasta 1.81 cm de altura, tienen hojas definidas y producen separaciones entre cada propágulo lo cual hace fácil su separación para la individualización, tienen coloración por lo general púrpura y no tiene una alta presencia de oxidación o tejido muerto como se observar en la figura 9A, esta característica la encontramos predominante en las líneas AM32 y AM33. Algunas líneas tienen **brotes indefinidos** cristalinos, llegan a medir menos de 0.4 cm de altura y producen rápidamente raíces, estas características se presenta en la línea AM31 (Figura 9B). Algunas líneas presentan brotes cristalinos y brotes totalmente diferenciados, a esto le llamamos combinación. Las líneas AM20 y AM31 presentan brotes de tamaño pequeño, poco tejido muerto y en algunas ocasiones raíces (Figura 9C). La coloración de los brotes adventicios varía de verde en la línea AM32 (figura 9D), púrpura-verde en las líneas AM31, AM33, AM34, AM36, m14d-e (Figura 9E) y aquellos que no

desarrollaron color como los que se muestran en la figura 9F, pertenecientes a las líneas AM50 hasta la AM58.

El grado o susceptibilidad a la **oxidación** es un factor importante en la micropropagación. Es una condicionante de muerte del tejido o la emergencia de hongos endófitos que termina por matar al brote. La línea AM32 (Figura 9G) presenta signos de oxidación, sin embargo, esto no merma el desarrollo de la planta. La presencia de **raíces** en los puntos de crecimiento del tejido vegetal puede estar influenciado por la forma del corte, por las hormonas e incluso por el tipo de tejido. Si el tejido cristalino se deja este llega a producir rápidamente raíces, el tejido viejo y aquellos que no son capaces de producir brotes. Estas son inconvenientes debido a la intromisión por los puntos esenciales para la brotación (figura 9B y 9H). Algunas líneas presentan un rápido deterioro o **muerte del tejido**. En este sentido, las líneas AM36, AM38, m06 no tienen una buena producción de brotes, sus hojas producidas son de muerte rápida, y los propágulos iniciales para la brotación llegan a crecer y se individualizan, lo cual no es bueno para la propagación de la línea. El tejido es difícilmente removido ya que los brotes que crecer llegan a envolverlo (figura 9I).

En resumen, las líneas seleccionadas para la determinación del índice de brotación fueron: AM20, AM31, AM32 y AM33



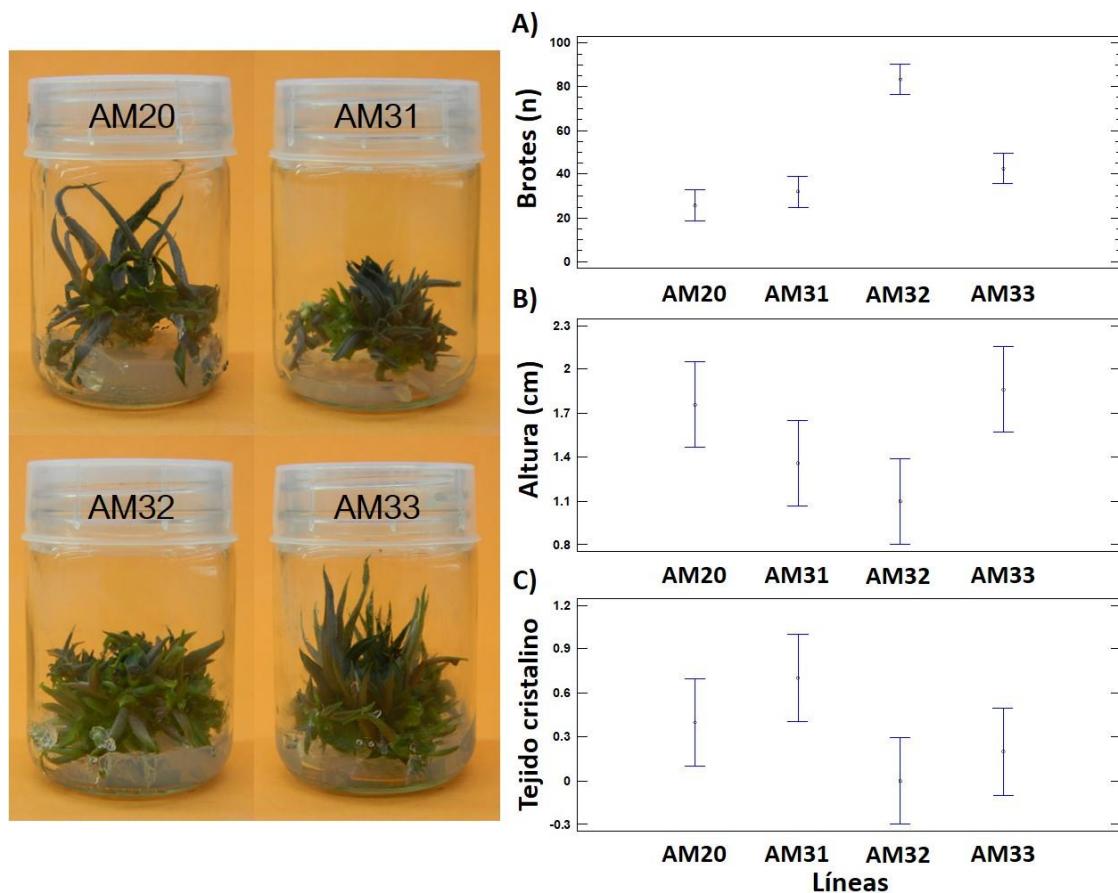
**Figura 9.** Fisiología de brotes de las líneas clonales. A) Brotes completos (definidos); B) brotes indefinidos-cristalinos; C) brotes completos y cristalinos; D) tejido con coloración verde; E) coloración púrpura; F) coloración blanca-muerte; G) presencia de oxidación en tejido vegetal; H) crecimiento de raíces en brotes y I) presencia alta de tejido muerto (hojas).

## **12.2. Determinación del índice de brotación de cuatro líneas clonales en la especie *Agave marmorata***

Los brotes adventicios fueron obtenidos directamente de la plántula sin la formación de callo. En 4 líneas analizamos el índice de brotación, la altura de los propágulos producidos y la densidad de tejido vitrificado-cristalino mediante un análisis estadístico multifactorial. La proliferación de brotes se mostró de forma heterogénea. En la figura 10, se presenta el tipo de tejido producido por cada una de las líneas. Solo la línea AM31 llegó a producir callo de forma indirecta y AM20 presenta una gran cantidad de hojas con puntas secas de sus brotes.

La generación de brotes adventicios tuvo una media de  $25.8 \pm 6.50$  y  $32.0 \pm 7.45$  brotes por explante en las líneas AM20 y AM31, mostrando brotes estadísticamente similares (homogéneos) (Tukey,  $p=0.05$ ); las líneas AM32 y AM33 son grupos heterogéneos en una comparación múltiple, con  $83.4 \pm 4.56$  y  $42.6 \pm 12.18$  brotes producidos por explante como se muestra en la figura 9A. De acuerdo con el análisis, solo la línea AM32 es diferente estadísticamente hablando. La altura de los propágulos en las líneas AM20 y AM31 fue de  $1.76 \pm 0.33$  cm y  $1.36 \pm 0.59$  cm respectivamente, sin mostrar una diferencia significativa. Aparentemente la línea clonal AM33 es la que mayor altura de propágulos presenta, es significativamente diferente con respecto AM32. Estas líneas tuvieron  $1.86 \pm 0.47$  cm y  $1.1 \pm 0.22$  cm de altura. Sin embargo, entre las cuatro líneas no existe diferencia significativa (Figura 10B). La figura 10C, presenta a las líneas AM31 y AM32 son diferentes entre sí, con una media de  $0.7 \pm 0.29$  y 0. Las líneas AM20 y AM33 no son significativamente diferentes, ya que sus medias van de  $0.4 \pm 0.55$  y  $0.2 \pm 0.44$  volviéndose grupos similares (homogéneos). El análisis estadístico muestra que sus resultados se pueden

sobreponer, la diferencia significativa nos habla únicamente que esta característica es representativa de dos líneas, con un valor alto y nulo.



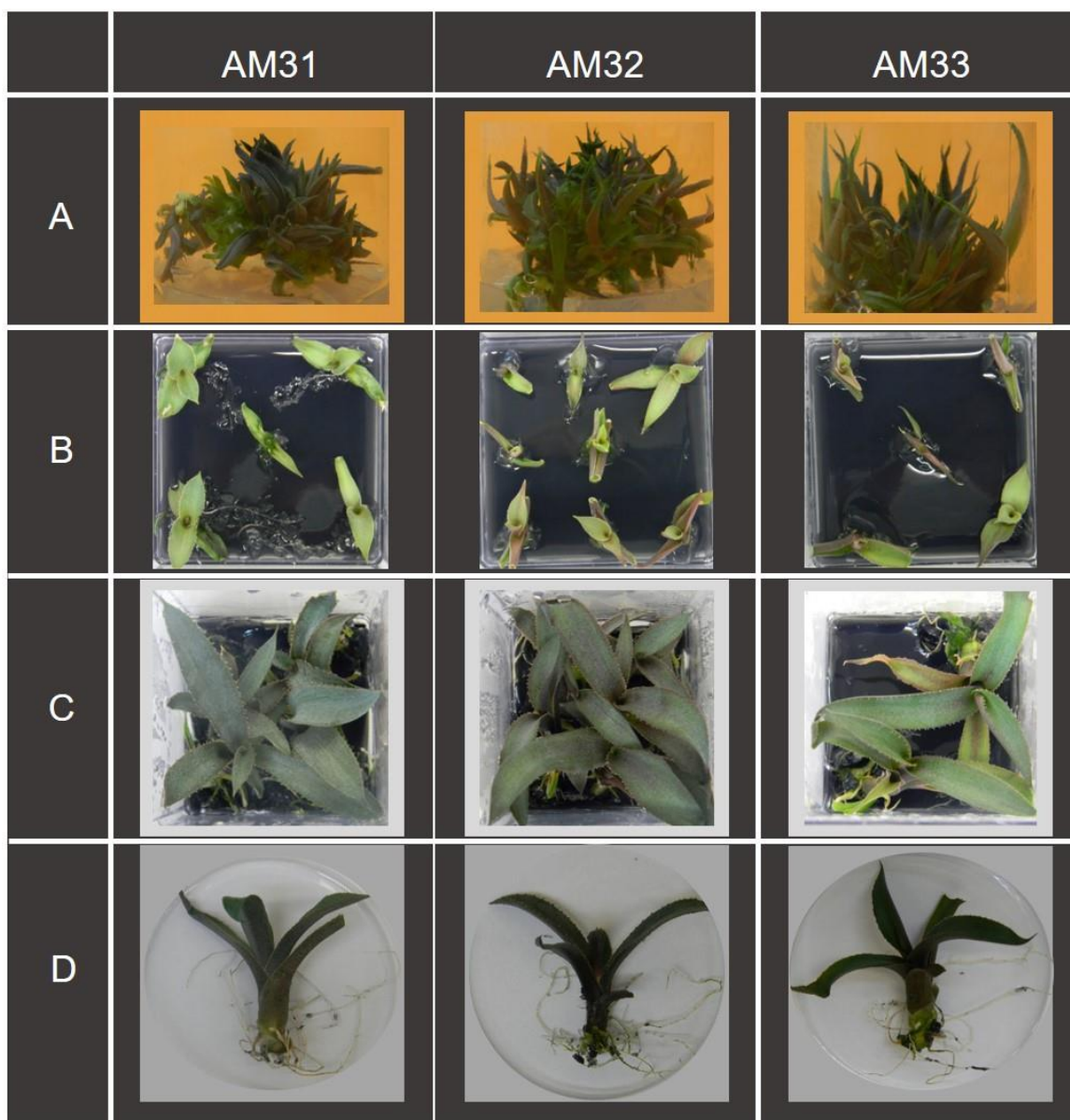
**Figura 10.** Análisis de la formación de brotes *in vitro* en *A. marmorata* de las líneas AM20, AM31, AM32 y AM33 derivadas de semilla de *A. marmorata*, experimento realizado en medio MS adicionado con 5 mg/L (22.2  $\mu$ m) de BAP, A) número de brotes adventicios producidos por explante en un periodo de 60 días; B) altura media de los brotes adventicios producidos en centímetros y C) densidad de tejido cristalino (brotes no diferenciados).

En resumen, podemos considerar a las cuatro líneas seleccionadas como potencialmente útiles para ser micropropagadas, sin embargo, pensamos que las condiciones de número de brotes y menor desarrollo de tejido no diferenciado, vuelven a la línea AM32 como la mejor línea para ser propagada.

### **12.3. Individualización de plantas derivadas de las líneas clonales.**

Cada una de las líneas en su crecimiento mostraron características diferentes en cuanto a su morfología, para la línea AM31 las plantas generadas son de coloración verde en el haz y del envés púrpura-grisáceo de hoja ancha, sus espinas no son pronunciadas. La línea AM32 tiene una planta de coloración púrpura-grisácea en forma de motas por el envés y el haz verde limón. Tiene poca presencia de sus espinas en la periferia de las hojas. AM33 tiene un envés púrpura rojizo y verde con tonos purpuras del haz y sus espinas son pequeñas, hojas delgadas y largas, tal y como se muestra en la figura 11.





**Figura 11.** Individualización. A) Líneas AM31, AM32 y AM33 sometidas a multiplicación en medio MS, suplementado con 5 mg/L de 6-Benzylaminopurina; B) individualización de los propágulos, cultivados en medio MS con 0.025 mg/L de Kin y 2 g/L de carbón activado para inducir producción de raíces, C) plantas individualizadas con crecimiento de 91 días y D) plantas promedio seleccionadas para uso en experimento de inoculación bacteriana.



#### **12.4. Compatibilidad y desarrollo por inoculación de bacterias endófitas en líneas clonales de *A. marmorata***

Las plantas de las líneas clonales AM31, AM32 Y AM33 de *A. marmorata* fueron inoculadas con bacterias endófitas 5 veces en un lapso de 14 días, y se agruparon de la siguiente manera: (G1) Control de agua, (G2) inoculado con *C. flaccumfaciens*, (G3) *A. faecalis*, (G4) *B. tequilensis*, (G5) *E. cloacae*, (G6) *A. xylosoxidans* y (G7) *P. aeruginosa*.

La compatibilidad de las bacterias con las plantas se evaluó en función del crecimiento y la “no” aparición de síntomas de enfermedad. Como se discutirá más adelante, por las condiciones del experimento y el sustrato donde se mantiene la planta no podemos distinguir si *E. cloacae* del grupo 5 indujo la muerte de las líneas AM31 y AM33 o la bacteria no soporto el crecimiento de la planta como una posible fuente de nutrición.

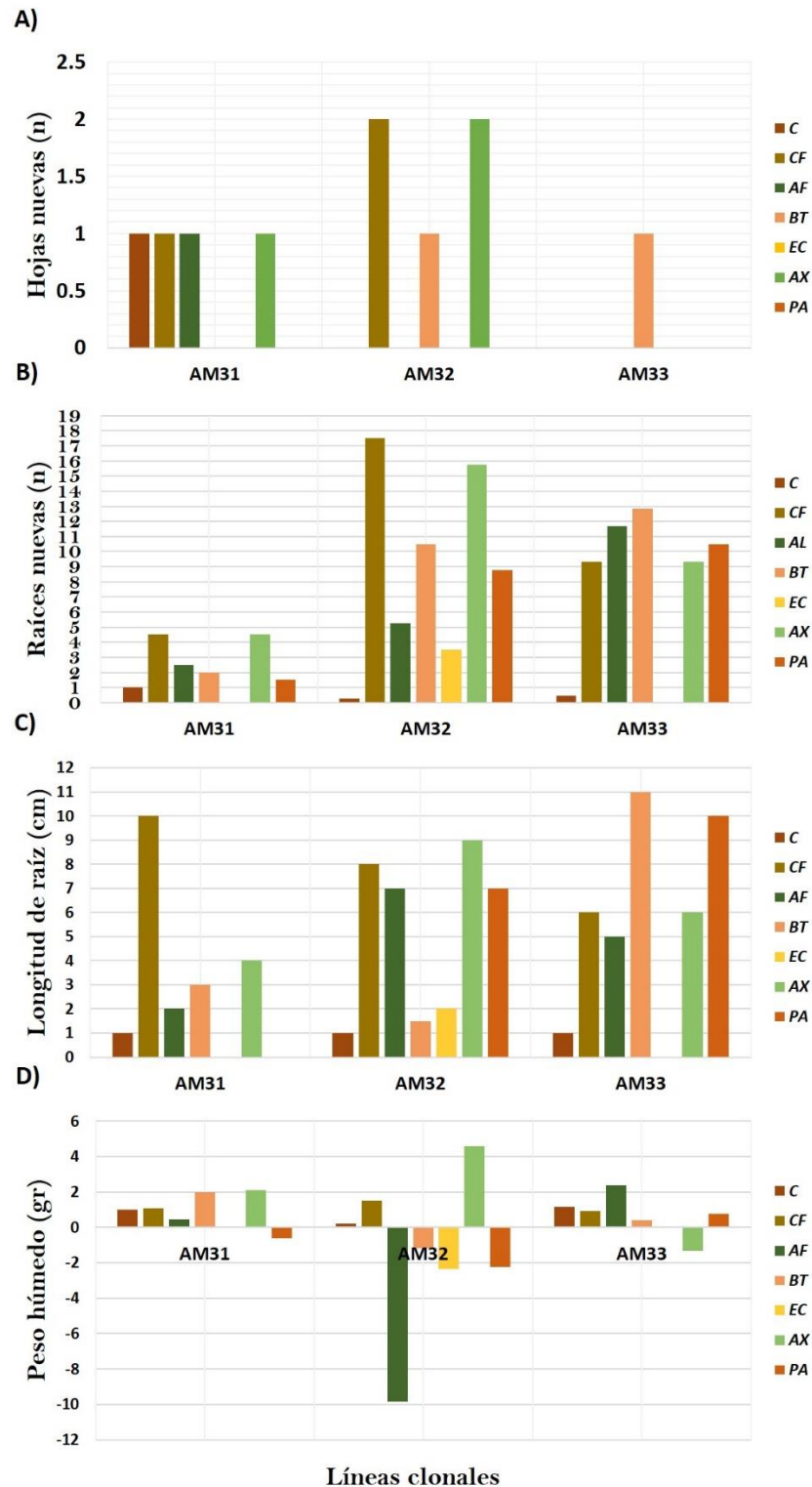
La Figura 12 muestra el crecimiento inducido por las bacterias en algunos parámetros de crecimiento como el número de hojas nuevas, raíces nuevas y su longitud y el peso ganado durante el ensayo. En el panel 12A con respecto a las hojas nuevas se presenta compatibilidad en 2 líneas clonales. La Línea AM31 muestra una baja respuesta a la inoculación de las bacterias. No se observan diferencias entre el control y los grupos inoculados con *C. flaccumfaciens* (G3), *B. tequilensis* (G4) y *P. aeruginosa* (G7). La inoculación de las otras bacterias no presentó efecto sobre la generación de hojas nuevas. La línea clonal AM32, muestra un efecto de inducción en la formación de hojas en 3 cepas en el G2, G4 y G7 con

hasta 2 hojas nuevas inducidas con respecto al control. Entre bacterias en esta línea se observan diferencias significativas, sin embargo, cuando se compara con las otras líneas estas se pierden. La línea AM33, solo tiene respuesta a la inoculación al G4 (*B. tequilensis*).

La formación de raíces nuevas, la inoculación tiene efecto en todas las bacterias y en las tres líneas, sin embargo, el efecto inductor es mayor en las plantas de la línea AM32. El mayor efecto se observa en el G2 (*C. flaccumfaciens*), G4 (*B. tequilensis*) y G6 (*A. xylosoxidans*) con 19, 11 y 15 raíces nuevas respectivamente. Incluso la cepa de *E. cloacae* (G5) tuvo un efecto en la inducción de raíces de AM32. En este parámetro *B. tequilensis* fue quien mayor número de raíces nuevas indujo con 13 raíces, seguido del G3 (*A. faecalis*), con 11 raíces y el grupo de *P. aeruginosa* con 10 raíces. Las líneas AM31 en este parámetro tuvo una mayor repuesta, destacando el grupo 2 y el grupo 6. La longitud de las raíces fue variable, sin embargo, en las tres líneas de plantas hubo respuesta a la inoculación de las bacterias destacando G2 en AM31 (10 cm en promedio), *A. xylosoxidans* (G6) en AM32 con 9 cm de longitud en promedio y la G4 en la línea AM33 con 11 centímetros promedio seguida del grupo 7 con 10 cm (Figura 12C). Con respecto al peso ganado aparentemente no se observan diferencias significativas en la inducción del crecimiento general de las plantas (Figura 12D). En la línea AM31 el efecto de las bacterias *B. tequilensis* y *A. xylosoxidans* ganaron 1.98 g y 2.095 g. El único valor negativo presente corresponde al grupo inoculado con *P. aeruginosa* con una pérdida de -0.62 g (Figura 12D). En la línea AM32 la mayor acumulación de peso en general ganado ocurre por la inoculación de *A. xylosoxidans* (G6) con 4.60 g y 1.52 g en las plantas

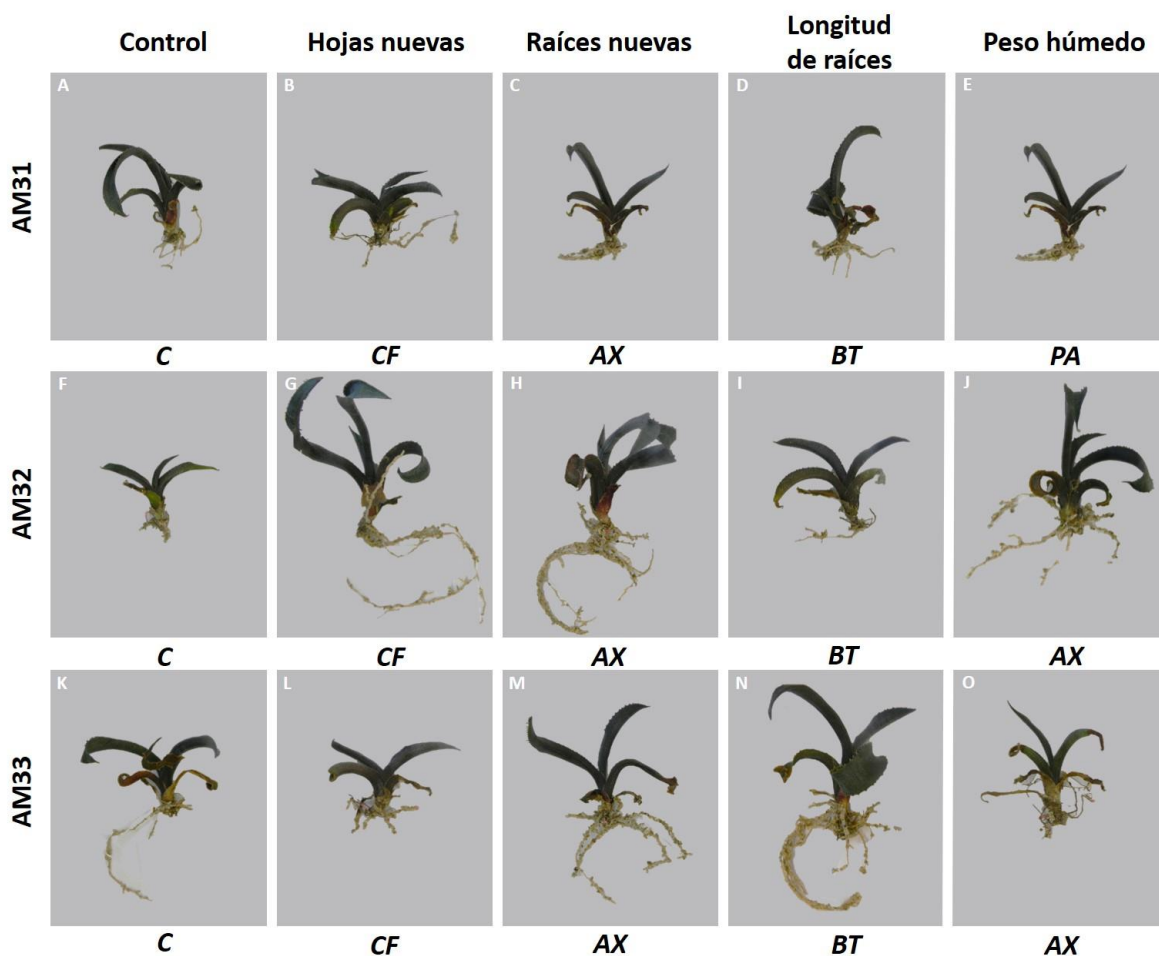
inoculadas con *C. flaccumfaciens*. En esta misma línea, la mayor pérdida de peso ocurre con la inoculación de *A. faecalis* con -9.83 g, seguidas de *B. tequilensis* con -1.17 g. El mayor valor ganado en peso para la línea AM33 ocurre cuando se inoculo con *A. faecalis* 2.37 g los grupos restantes presentan pesos de 0.93 g, 0.42 g y 0.78 g cuando fueron inoculados con *C. flaccumfaciens*, *B. tequilensis* y *P. aeruginosa* respectivamente. Nuestro único valor negativo encontrado en la línea se acredita a *A. xyloxydans* obteniendo un peso de -1.34 g.

La figura 13 muestra aspectos fenotípicos de las plantas de las tres líneas en ausencia de bacterias y aquellas plantas que fueron inoculadas con las bacterias, resaltando aquellos parámetros donde notoriamente se observa un efecto de la adición de la bacteria comparada entre las tres líneas. Por ejemplo, se muestra que la bacteria *C. flaccumfaciens* es la de mayor influencia en la generación de hojas nuevas en la línea AM32. También en la línea AM32, *Achromobacter xyloxydans* es uno de los mayores inductores de raíces nuevas después de *C. flaccumfaciens*, como también se observa en la fotografía reportada para hojas nuevas. La cepa de *B. tequilensis* es la cepa que mayor crecimiento (longitud) de las raíces induce en la línea AM33. Por último, la cepa de *A. xyloxydans* es la que influye en la ganancia biomasa de forma general, donde el mayor efecto fue en la línea AM32.



**Figura 12.** Valores relativos del efecto de la inoculación de las bacterias endófitas en las líneas de *A. marmorata*. (continua en la siguiente página)...

A) producción de hojas nuevas, B) generación de raíces nuevas, C) longitud de raíces nuevas, D) peso húmedo diferencial. De las líneas AM31, AM32 y AM33 por cada grupo de inoculación.



**Figura 13.** Aspectos morfológicos de las plantas inoculadas de las 3 líneas de *Agave marmorata*. C) control de agua, CF) *Curtobacterium flaccumfaciens*, AX) *A. xylosoxidans*, BT) *Bacillus tequilensis*. En esta figura se resalta la bacteria con mayor efecto en la inducción del parámetro de crecimiento medida.

### 13. DISCUSIÓN

La especie silvestre *Agave marmorata* es una planta que se encuentra en peligro de extinción por el potencial uso económico para la producción de mezcal. A diferencia de otras especies de agave de uso comercial, *A. marmorata* no tiene cultivos establecidos; por lo que la desaparición afecta a los integrantes del ecosistema donde la planta se desarrolla, especialmente a los polinizadores, flora asociada y también a las comunidades microbianas del suelo. Nuestro trabajo esté basado en analizar y usar el material vegetal derivado de las semillas, seleccionando características óptimas, como el vigor de la plántula formada a través de la germinación, talla, adaptabilidad y velocidad de propagación en sistemas *in vitro*. A diferencia de otros trabajos donde usan al cultivo de tejidos vegetales como estrategia de propagación de material vegetal, las semillas que nosotros usamos no utilizaron medios adicionados con fito-estimulantes o nutrientes, porque lo buscamos es seleccionar al mejor material vegetal para concretar el establecimiento de líneas de plantas que puedan ser reintroducidas en el campo.

Se usaron más de 1000 semillas, que fueron germinadas en lotes en distintos tiempos durante 2 años, primero con fines de explorar el efecto del almacenamiento y envejecimiento de la semilla en condiciones de laboratorio y segundo para obtener la mejor plántula con capacidades de adaptación innatas, pero sobretodo por el potencial de sobrevivencia o aquellas semillas que puedan tener un crecimiento rápido. Como se presentó en la figura 8B, las semillas almacenadas por un año mas no modifican su velocidad de germinación, pero si el rendimiento de germinación,

es decir el numero de semillas por sub-lote que alcanzan la formación de la radícula. Los tres sub-lotes germinan en su mayoría entre el día 4 y 6, pero en el sub-lote del 2017 solo germina el 30% comparado con las semillas del 2016. En el lote de 2016, la mayor velocidad de germinación ocurre en el mes de mayo, a los 6 días se alcanzan hasta 250 semillas germinadas de 400 (Figura 8B). El 89.82% de la germinación se alcanza en el día 13. En el año 2018 se realizaron nuevos ensayos de germinación en el cual se tuvo 0% de germinación en los dos casos (datos no presentados). Como se mencionó anteriormente, la germinación de las semillas en un medio carente de nutrientes evaluamos el verdadero porcentaje de germinación al forzar a la semilla que su metabolismo inicie por los nutrientes contenidos en el endospermo de la misma.

Otros trabajos reportan valores de germinación de *A. marmorata* reportados por Jiménez-Valdés y colaboradores en el 2010, donde las semillas encontradas en lugares de depredación y plantas nodriza tienen la probabilidad de germinar el 0.42%, además, al final del experimento solo sobrevivieron 3 plantas de 200 en condiciones ambientales 12:12 h a 23°C. Por otra parte, en un ensayo de embriones somáticos encapsulados de *A. angustifolia*, generando un sistema de semillas sintéticas, obteniendo el 100% de germinación en condiciones de alginato de sodio al 3% y MS al 100% pero adicionado con 4.4  $\mu\text{mol}$  de BAP (Arzate-Fernández *et al.*, 2016). En resumen, nuestro porcentaje de germinación es alto en el laboratorio al compararlo con los otros experimentos en ausencia y presencia de citocininas. En el establecimiento y selección de material para propagación el potencial germinativo

de las semillas es un indicador de la viabilidad y de la posible supervivencia de la plántula formada.

Durante los ensayos de germinación observamos que las semillas que eran colocadas en una cantidad mayor a 20 semillas mostraban una germinación alta y que la disminución del número de semillas a 12 en el medio provocaba una germinación efectiva pero muy lenta, sin embargo cada uno de los ensayos tuvo un comportamiento heterogéneo en bajo rango. La estimulación de la germinación puede deberse a un efecto por producción de etileno (Huang et al., 2019). El etileno está involucrado en el crecimiento y la respuesta a estrés en las plantas. Esta molécula hace una comunicación cruzada con la giberelina aumentando la tolerancia al estrés. Sin embargo está claramente establecido que la formación de especies de oxígeno reactivas durante la germinación en especial el  $H_2O_2$  influyen en la supervivencia de la plántula y en la misma germinación, al inducir una acumulación de enzimas antioxidantes (El-Maarouf-Bouteau et al., 2015). En base a estos datos y comportamiento el material vegetal fue seleccionado especialmente aquel que alcanzó la germinación en los primeros tres días.

Las plántulas que tuvieron un mayor desarrollo de sus estructuras como la hoja embrionaria y raíz fueron cambiadas a nuevo agar-agua cuando estas tuvieran mayor vigor, ya que al momento de que emerge su raíz y son cambiadas se desprende de la testa (Figura 9), causando la muerte de la plántula que estaba por desarrollarse. Las plántulas generadas presentaron una morfología constante, con coloración verde-púrpura en su hoja embrionaria, esta característica es importante para la especie de *A. mamorata*. Hubo algunas plántulas que en el proceso de



desarrollo presentaron una hoja embrionaria cristalina, lo cual tiene influencia en la capacidad fotosintética del por lo que fueron descartadas como tejido potencial para inducción de brotación (Figura 10). Para la selección, las características morfológicas como el desarrollo de la hoja cotiledonea nos ayudaron a determinar la rapidez de crecimiento, el ancho de hoja verdadera también es una característica importante que ayuda a la captura de luz de forma más eficiente y la producción de fotosíntatos adecuada que influye en el crecimiento de la planta. Todas las plantas se estandarizaron con dos hojas verdaderas, por lo cual efecto siguiente en adaptaciones de la planta se basaran en sistema radicular (Figura 10).

En este proceso de multiplicación durante 3 años, sobrevivieron las 10 líneas clonales mencionadas en la figura 10. Las primeras brotaciones fueron heterogéneas, por lo cual se esperó a que tuviera mayor inducción para ir estandarizando las líneas y continuar con las selecciones. El índice de brotación de las plántulas derivadas de las semillas, es de gran importancia para cumplir nuestro objetivo. Existe tejido vegetal que no producen brotes o el tiempo de generación son en largos lapsos. La brotación se encuentra influenciada por los genes LEC/FUS esenciales en la embriogénesis somática (Gaj *et al.*, 2005). Sin embargo en esta parte del trabajo analizamos el índice de brotación y la morfología que estos presentan. Los tejidos vegetales bajo condiciones *in vitro* responden de diferente manera al tipo y cantidad de citocinina proporcionada, y por supuesto la especie de planta con la que se trabaja. En nuestro trabajo, la generación de brotes fue de un máximo de 83.4 brotes adventicios nuevos para la línea AM32 a una concentración de 6 mg/L de BAP, la línea AM33 llegó a generar 43 brotes adventicios (Figura 10).

Las dos líneas difieren en cantidad y el tamaño del brote, ya que esta línea alcanza en promedio el 1.83 cm en comparación con la línea AM32 que únicamente alcanza el 1.10 cm (Figura 10B). El material vegetal mantiene una morfología deseada de la planta y a la producción masiva de plantas (Figura 9). Otros trabajos publicados muestran registros de brotación para *A. marmorata* de hasta  $41 \pm 3.2$  brotes nuevos en concentraciones de AIA y BA 10 mg/L (Aguilar-Jiménez y Rodríguez De la O, 2018). En *A. americana* los resultados obtenidos por Miguel Luna *et al.*, 2014 muestran que la concentración de 6 y 8 mg/L de BA induce un promedio de 11.8 y 11.7 nuevos brotes, además si el medio es suplementado con sacarosa 40 g/L obteniendo se pueden obtener hasta 11.0 nuevos brotes. Reportes de Reyes-Zambrano *et al.*, 2016 con la misma especie menciona la obtención de 74 plantas por callo mediante el uso de 0.5 mg/L de 2,4-D y 8.6 mg/L de BA. Para la especie *A. cupreata* con 1.5 mg/L de BA, con un promedio de 10.5 brotes por explante y en *A. karwinskii* de 6.1 brotes con la concentración de 1 mg/L (Domínguez-Rosales *et al.*, 2008).

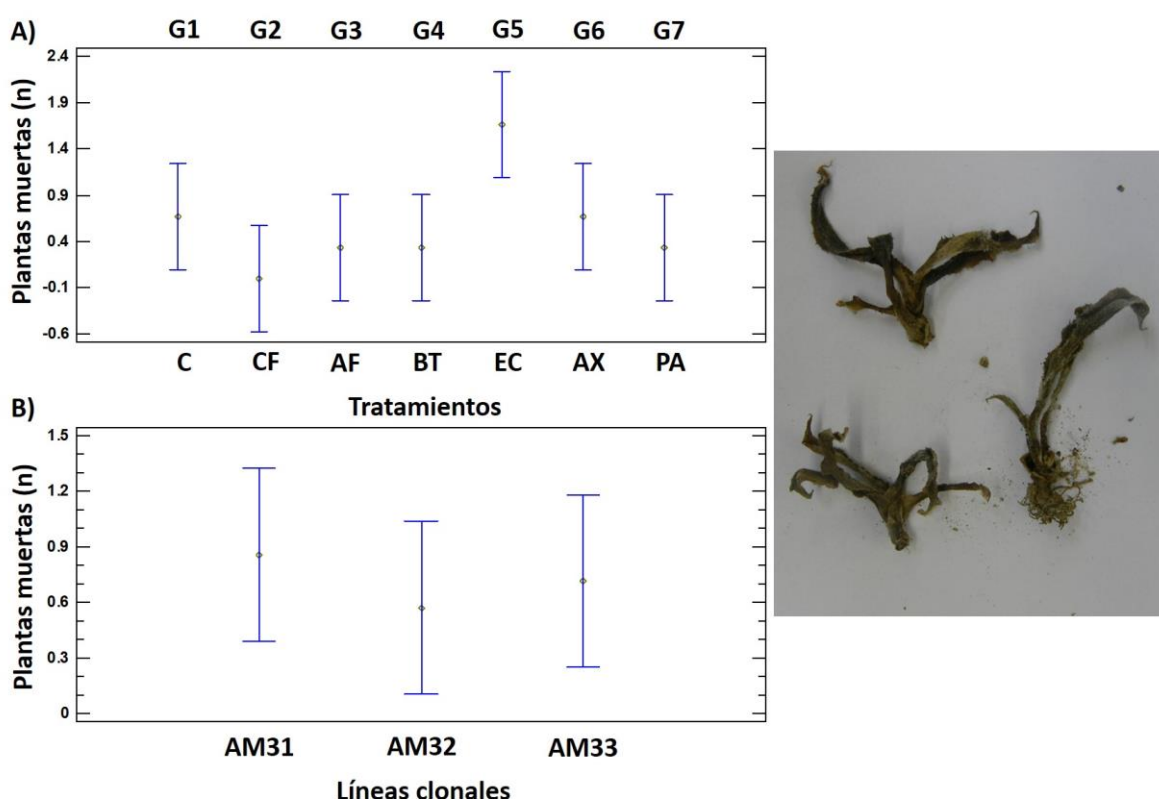
Algunas otras líneas se mantienen en el laboratorio, sin embargo, estas no tienen una buena producción de brotes, las hojas producidas son de muerte rápida, y los propágulos iniciales para la brotación llegan a crecer y se individualizar (Las líneas AM36, AM38, M06). Como se mencionó, los brotes promedian hasta 1.81 cm de altura, con hojas definidas y con separaciones entre cada propágulo lo cual hace fácil su separación para la individualización (Figura 11), tienen coloración púrpura y no tiene una alta presencia de oxidación o tejido muerto como se observa en la figura 9A, esta característica la encontramos en las líneas AM32 y AM33. Además,

cada una de las líneas tuvo una sobrevivencia en sustrato de arena de desierto/vermiculita del 100%.

Las plantas de las líneas seleccionadas fueron evaluadas en función de la compatibilidad y el efecto sobre el crecimiento de bacterias. Tres líneas clonales, AM31, AM32 y AM33, fueron usadas. Los resultados obtenidos para la producción de hojas en la línea AM32 fueron sobresalientes con un valor igual a 2 hojas nuevas producidas. Los grupos inoculados con las bacterias *Curtobacterium flaccumfaciens* tuvieron una buena respuesta aun cuando es una bacteria endófito de *A. angustifolia* y *Achromobacter xylosoxidans* bacteria endófito de *A. marmorata*. Para *Bacillus tequilensis* proveniente de las semillas de *A. tequilana* en la línea AM33 y AM32 mantuvo el número de hojas similar al control. El grupo inoculado con *Enterobacter cloacae* sufrieron de muerte en las tres líneas, de las cuales únicamente sobrevivió un individuo (16.6%) de la Línea AM32. De forma contraria, estudios realizados en la planta de *A. tequilana* por García-Ochoa, en el 2017 mostraron que *E. cloacae* aporta N y nutrientes para su crecimiento y el aumento de biomasa, además de mantener viable a la planta ante una situación de estrés. Sin embargo, *E. cloacae* está catalogada como un agente influyente en la entrada y colonización de las plantas de otras bacterias (Macedo-Raygoza *et al.*, 2019), no funciona en *A. marmorata*, por lo que es probable que el efecto sea bacteria-especifico. En la Figura 13, se muestra este análisis a discusión.

El índice de muerte de los tratamientos se muestra en la figura 13A. Las líneas inoculadas con la bacteria *E. cloacae* (G5) son las que mayor tasa de muerte experimentan comparadas con las otras bacterias en función de las tres líneas de

plantas. Aunque no hay una diferencia estadística, es claro que esta bacteria no soporta el crecimiento de las plantas, más allá de pensar que provocan una enfermedad que causa la muerte del tejido vegetal, ya que las plantas no mostraron indicios de pudrición o enfermedad durante la adaptación al sustrato de arena libre de materia orgánica. En promedio para la línea AM31 y AM33 hay una mortalidad de hasta 5 plantas.



**Figura 13.** Análisis estadístico de la Mortalidad de las líneas clonales por tratamientos. A) análisis por grupos de bacterias inoculadas, B) análisis por líneas clonales de *A. marmorata* (AM31, AM32, AM33).

Sin embargo, este tratamiento microbiano en las plantas es diferente estadísticamente hablando a los tratamientos con las bacterias *C. flaccumfaciens*, *A. faecalis* y *B. tequilensis* que tuvieron desde 0 hasta 2 plantas muertas. El panel

B de la figura 13, muestra el análisis de muerte entre líneas de plantas englobando la presencia de todas las bacterias, aunque no se muestra una diferencia significativa en los valores, definitivamente se puede concluir que la línea AM32 es un candidato potencial para ser usada en la primera etapa de propagación y acondicionamiento en el invernadero.

En la producción de raíces nuevas hubo buena respuesta de las siete bacterias inoculadas especialmente en la línea AM32, de las cuales *Curtobacterium flaccumfaciens* y *Achromobacter xylosoxidans*, inducen la mayor cantidad de raíces nuevas (Figura 12A). la menor respuesta en esta línea es de *Alcaligenes faecalis*, sin embargo, esta llega a tener una respuesta mayor en la línea AM33, así mismo las plantas inoculadas con *Bacillus tequilensis*. El número de raíces es muy importante para este modelo de planta, ya que el soporte y la absorción de nutrientes llega a ser fundamental en sistemas erosionados, con escasos de nutrientes y agua, además de soportar condiciones ambientales extremas. Nuestros niveles más bajos en producción de raíz se dieron en la línea AM31, por lo cual no tiene una buena respuesta ante la inoculación de estas bacterias. Para la elongación de raíz la mayor respuesta de las bacterias inoculadas fue en la línea AM32, teniendo respuesta a la inoculación de *C. flaccumfaciens* y *A. xylosoxidans* seguida de *Alcaligenes faecalis* y *P. aeruginosa*, aun así, no son los valores promedio más altos obtenidos, ya que estos ocurren con *Bacillus tequilensis* en AM33.

Es claro que la respuesta de la bacteria influye en la línea clonal inoculada. En esta serie de ensayos podemos ver un efecto claro inducido por la bacteria que interactúa de diferente manera con la línea de planta establecida. Una elongación de raíz

estándar en *A. inaequidens* bajo condiciones óptimas, cultivada en medio MS al 100% sin hormonas da un valor máximo de 6 cm producidos por planta (Auroles-Rodríguez *et al.*, 2008); en *A. marmorata* se obtiene una producción mayor de  $8.2 \pm 0.6$  cm y  $9.3 \pm 0.7$  cm bajo un medio adicionado con 3.0 y 10 mg/L de AIA (Aguilar-Jiménez y Rodríguez De la O, 2018). Comparando las plantas que se encuentran bajo inoculación superan la elongación de sus raíces en un medio de adaptación confrontadas con un control y medio adicionados con hormonas, la planta se ve influenciada por la bacteria.

El peso húmedo de las líneas AM32 y AM33 fue las que tuvieron la mayor cantidad de peso diferencial perdido. Nuestro valor más inferior por la pérdida de peso se da por la inoculación de *A. faecalis* que únicamente se da en la línea AM32. El valor de peso ganado más alto se da en AM32 con el grupo inoculado por *A. xylosoxidans*, esta bacteria se aisló de las semillas que se germinaron y se desarrollaron durante 10 días (Martínez-Rodríguez, A., 2017). Por lo cual pensamos que podría tener un efecto en el metabolismo central de la planta para ayudar a su desarrollo y crecimiento.

En estos ensayos buscamos determinar: el efecto de la bacteria sobre el crecimiento de la planta y cual la línea clonal es más afin a las bacterias. Al combinar esto, haremos más efectivo el soporte y crecimiento de la planta. Lo cual para una reforestación es primordial. La selección de material vegetal óptimo es importante, por lo cual no se debe proliferar una sola línea establecida. Debemos probar varias líneas, para determinar las variantes genéticas y preservar la población de *Agave*

*marmorata*, estas beneficiadas por sus bacterias endófitas en un ambiente sometido a estrés y escases.

El estudio va en ese camino. Para completar este ensayo y en la búsqueda de más información que consolide una publicación, haremos el análisis de microsátélites ISSR, para determinar si existe variabilidad genética entre estas líneas y otras que aún no han sido probadas. Buscaremos marcadores moleculares que midan la velocidad y comportamiento de brotación, así mismo probaremos algunas otras bacterias endófitas que influyan en el desarrollo de las plantas para su rápida adaptación al invernadero. Por último, pensamos utilizar nanotecnología aplicada a este ensayo al usar nanopartículas metálicas que influyan en la colonización de las bacterias como fue visto en las plantas de banano (Macedo-Raygoza, datos sin publicar).

## 14. CONCLUSIONES

La capacidad germinativa de las semillas de *Agave marmorata* se ve influenciada por el envejecimiento, entrando a un modo de dormancia, que en consecuencia provoca una baja tasa de germinación en un corto plazo.

Se seleccionaron 4 líneas, pero la línea clonal AM32 destacó por la producción de brotes adventicios bajo condiciones excluyentes de vitaminas y a una concentración de 22.2  $\mu\text{mol}$  de BAP, superando incluso a otros reportes que midieron la brotación en especies del mismo género, por lo que se considera un tejido óptimo para producción de plantas.

Las bacterias *Curtobacterium flaccumfaciens* endófito de la semilla de *Agave angustifolia* y *Achromobacter xylosoxidans* endófito del *Agave marmorata* tuvieron compatibilidad con la línea AM32, generando una producción alta en hojas nuevas, número de raíces y su elongación, así como una ganancia de peso en la planta bajo condiciones de estrés nutricional. Por lo que también estas bacterias se vuelven bioinoculantes potenciales para uso en el campo.



## 15. LITERATURA CITADA

- Abraham-Juárez, M., Hernández-Cárdenas, R., Santyo-Villa, J., O'Connor, D., Sluis, A., Hake, S., Ordaz-Ortiz, J., Terry, L., and Simpson, J. (2015). Functionally different PIN proteins control auxin flux during bulbin development in *Agave tequilana*. *J Exp Bot*, 66 (13): 3893-3905. doi: 10.1093/jxb/erv191.
- Abraham, P., Yin, H., Borland, A., Weighill, D., Lim, S. D., De Paoli, H. C., Jones, P. C., Agh, R., Weston, D. J., Wulschleger S. D., Tschaplinski, T., Jacobson, D., Suchman J. C., Hettich, R. L., Tuskan G. a., and Yang, X. (2016). Transcript, protein and metabolite temporal dynamics in the CAM plant *Agave*. *Nat, Plants*, 21(2): 16178. doi: 10.1038/nplants.2016.178.
- Aguilar-Jiménez, D., y Rodríguez De la O, J. L. (2018). Micropropagación y aclimatación de Maguey Potzometl (*Agave marmorata* Roezl) en la Mixteca Poblana. *Rev Colomb Biotechnol*, 124-131. doi: 10.15446/rev.colomb.biote.v20n277084.
- Abraham-Juárez, M., Hernández-Cárdenas, R., Santyo-Villa, J., O'Connor, D., Sluis, A., Hake, S., Ordaz-Ortiz, J., Terry, L., and Simpson, J. (2015). Functionally different PIN proteins control auxin flux during bulbin development in *Agave tequilana*. *J Exp Bot*, 66 (13): 3893-3905. doi: 10.1093/jxb/erv191.
- Abraham, P., Yin, H., Borland, A., Weighill, D., Lim, S. D., De Paoli, H. C., Jones, P. C., Agh, R., Weston, D. J., Wulschleger S. D., Tschaplinski, T., Jacobson, D., Suchman J. C., Hettich, R. L., Tuskan G. a., and Yang, X.

- (2016). Transcript, protein and metabolite temporal dynamics in the CAM plant *Agave*. *Nat, Plants*, 21(2): 16178. doi: 10.1038/nplants.2016.178.
- Aguilar-Jiménez, D., y Rodríguez De la O, J. L. (2018). Micropropagación y aclimatación de Maguey Potzometl (*Agave marmorata* Roezl) en la Mixteca Poblana. *Rev Colomb Biotechnol*, 124-131. doi: 10.15446/rev.colomb.biote.v20n277084.
  - Aureoles-Rodríguez, F., Rodríguez de la O, J. L., Legaria-Solano, J. P., Sahágún-Castellanos, J., y Peña-Ortega, M. G. (2008). Propagación *in vitro* del maguey bruto (*Agave inaequidens* Koch), una especie amenazada de interés económico. *Revista Chapingo. Serie Horticultura*, 14 (3): 263-269.
  - Banskar, S., Mourya, D., Shouche, Y. (2016). Bacterial diversity indicates dietary overlap among bats of different feeding habits. *Microbiol Res*, 182: 99-109. doi: 10.1016/j.micres.2015.10.006.
  - Banskar, S., Bhute, S., Suryavanshi, M., Puneekar, S., and Shouche, Y. (2016). Microbiome analysis reveals the abundance of bacterial pathogens in *Rousettus leschenaultia* guano. *Sci Rep*, 6: 36948. doi: 10.1038/srep36948.
  - Beltrán-García, M. J., White, Jr, J. F., Prado, F. M., Prieto, K. R., Yamaguchi, L. F., Torres, M. S., Kato, M. J., Medeiros, M. H. G., Di Mascio, P. (2014). Nitrogen acquisition in *Agave tequilana* from degradation of endophytic bacteria. *Sci. Rep.* 4, 6938.
  - Bihn, L. T., Muoi, L. T., Oanh, H. T. K., Thang, T. D., Phong, D. T. (1990). Rapid propagation of agave by *in vitro* tissue culture. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 23: 67-70.

- Bonbón-Palomares, D., Laborin-Siriviriam, F., Tinoco-Ojanguren, C., Peñalba, M., Reyes-Ortega, I., and Molina-Freaner, F. (2018). Reproductive ecology of *Agave colorata*: the importance of nectar-feeding bats and the germination consequences of self-pollination. *Plant Ecol*, 219: 927-939. doi: 10.1007/s11258-018-0847-x.
- Campos, H., Trejo, C., Peña-Valdivia, C., García-Nava, R., Conde-Martínez, V., and Cruz-Ortega, M. (2014). Photosynthetic acclimation to drought stress in *Agave salmiana* otto ex Salm-Dyck seedlings is largely dependent on thermal dissipation and enhanced electron flux to photosystem I. *Photosynth Res*, 122(1): 23-39. doi: 10.1007/s11120-014-0008-6.
- Carillo-Araujo, M., Tas, N., Alcántara-Hernández R., Gaona, O., Schondube, J., Medellín, R., Jansson, J., and Falcon, L. (2015). Phyllostomid bat microbiome composition is associated to host phylogeny and feeding strategies. *Front Microbiol*, 6: 447. doi: 10.3389/fmicb.2015.00447.
- Celador-Lera, L., Jiménez-Gómez, A., Menéndez, E, and Rivas, R. (2018). Chapter 7: Biofertilizers based on bacterial endophytes isolated from cereals: potential solution to enhance these crops. *Role of Rhizospheric Microbes in Soil: Stress Management and Agricultural Sustainability*, 1; 175-203.
- Chen, Y., Chen, X., Hua, Y., Yue, L., Trigiano, R., and Chen, Z. M. (2014). Micropropagation of *Agave americana*. *Hort Sci*, 49 (3): 320-327. doi: 10.21273/HORTSCI.49.3.320.
- Coleman-Derr, D., Desgarennes, D., Fonseca-García, C., Gross, S., Clingenpeel, S., Woyke, T., North, G., Visel, A., Partida-Martinez, L. P., and

- Tringe, S. G. (2016). Plant compartment and biogeography affect microbiome composition in cultivated and native *Agave* species. *New Phytologist*, 209 (2): 798-811. doi: 10.1111/nph.13697.
- Desgarennnes, D., Garrido, E., Torres-Gomez, M., Peña-Cabriales, J., and Partida-Martínez, L. (2014). Diazotrophic potential among bacterial communities associated with wild and cultivated *Agave* species. *FEMS Microbiol Ecol*, 1-14. doi: 10.1111/1574-6941.12438.
  - El-Maarouf-Bouteau, H., Sajjad, Y., Bazin, J., Langlade, N., Cristescu, S. M., Balzerque, S., Baudouin, E., and Bailly, C. (2015). Reactive oxygen species, abscisic acid and ethylene interact to regulate sunflower seed germination. *Plant Cell Environ*, 38 (2): 364-374. doi: 10.1111/pce.12371.
  - Gaj, M. D., Zhang, S., Harada, J. J., and Lemaux P. G. (2005). Leafy cotyledon genes are essential for induction of somatic embryogenesis of *Arabidopsis*. *Planta* 222: 977-988. doi: 10.1007/s00425-005-0041-y.
  - Galicia, M., Buenrostro, A., and García, J. (2014). Specific bacterial diversity in bats of different food guilds in Southern Sierra Oaxaca, Mexico. *Rev Biol Trop*, 62 (4): 1673-1681. doi: 10.15517/rbt.v62i4.13076.
  - García-González, R., Quiroz, K., Carrasco, B., Caligari, P. (2010). Plant tissue culture: current status, opportunities and challenges. *Cien Inv Agr*, 37(3): 5-30. doi: 10.4067/S0718-16202010000300001.
  - García-Mendoza, A. (2011). Agavaceae. Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. (Flora from the Tehuacán-Cuicatlán Valley). First Edition, Instituto

de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), D.F. México. Fascículo 88, 95 p.

- García-Mendoza, A. (2007). Los Agaves de México. *Ciencias*, 87: 71-23.
- García-Moya, E., Romero-Manzanares, A., and Nobel, P. S. (2011). Highlights for *Agave* productivity. *GCB Bioenergy*, 3, 4-14. doi: 10.1111/j.1757-1707.2010.01078.x.
- García-Ochoa, E. Y. (2017). Evaluación de la colonización y del incremento de biomasa en plántulas y bulbillos de *Agave tequilana* WEBER por bacterias endófitas de la semilla bajo condiciones de limitación de nutrientes. Universidad Autónoma de Guadalajara, Tesis professional para obtener el título de Ing. Biotecnólogo.
- Haberlandt, G. (1902). Kulturversuche mit isolierten pflanzenzellen. Book: Plant Tissue Culture, 69-93. doi: 10.1007/978-3-7091-6040-4\_1.
- Hardoim, P. (2019). Chapter book: 6: The ecology of seed microbiota, 103-125. Seed endophytes, Springer Nature Switzerland, ISBN 978-3-030-10504-4. doi: 10.1007/978-3-030-10504-4\_6.
- Huang, Y. C., Yeh, T. H., and Yang, C. Y. (2019). Ethylene signaling involves in seeds germination upon submergence and antioxidant response elicited confers submergence tolerance to rice seedlings. *Rice (NY)*, 12 (1): 23. doi: 10.1186/s12284-019-0284-z.
- Huerta-Lovera, M., Peña-Valdivia, C. B., García-Esteva, A., Kohashi-Shibata, J., Campos-García, H., and Aguirre-Rivera, J. (2018). Maguey (*Agave salmiana*) infructescence morphology and its relationship to yield

components. *Genet Resour Crop Evol*, 65: 1649-1661. doi: 10.1007/s10722-018-0641-6.

- Hussain, A., Ahmed-Qarshi, I., Nazir, H., and Ullah, I. (2012). Chapter 1: Plant tissue culture: current status and opportunities. 1-27. doi: 10.5772/50568.
- IUCN (2016). <https://www.iucnredlist.org/species/4776/22042479>.
- Jorge, G. L., Kisiala, A., Morrison, E., Aoki, M., Nogueira, A. P. O, and Emery, R. J. N. (2019). Endosymbiotic *Methylobacterium oryzae* mitigates the impact of limited water availability in lentil (*Lens culinaris* Medik.) by increasing plant cytokinin levels. *Environmental and Experimental Botany*, 162; 525-540.
- Kämpfer, P., Glaeser, S. P., Mcinroy, J. A, and Busse, H.-J (2014). *Cohnella rhizosphaerae* sp. nov., isolated from the rhizosphere environment of *Zea mays*. *Intern J System Evol Microbiol*, 64 (5): 1811-1816.
- Lema-Ruminska, K., and Kulus, D. (2012). Induction of somatic embryogenesis in *astrophytum asterias* (Zucc.) Lem. In the aspect of light conditions and auxin 2,4-D concentrations. *Acta Scien Polon, Horto Cult*, 11 (4): 77-87. doi:
- López, J. L., Alvarez, F., Príncipe, A., Salas, M. E., Lozano, M. J., Draghi, W. O., Jofré, E, and Lagares, A. (2018). Isolation, taxonomic analysis, and phenotypic characterization of bacterial endophytes present in alfalfa (*Medicago sativa*) seeds. *J Biotech*, 267 (10): 55-62.
- Luna-Luna, S., Enríquez-del Valle, J. R., y Rodríguez-Ortiz, G. (2017). Anatomía y morfología de plantas micropropagadas-aclimatadas de *Agave potatorum* Zucc. Fertirrigadas en vivero. *Rev Fitotec Mex*, 40 (4): 491-494.

- Macedo-Raygoza, G. M., Valdez-Salas, B., Prado, F. M., Prieto K. R., Yamaguchi, L. F., Kato, M. J., Canto-Canché, B. B., Carrillo-Beltrán, M., Di Mascio, P., White, J. F and Beltrán-García, M. J. (2019). *Enterobacter cloacae*, an Endophyte that establishes a nutrient-transfer symbiosis with banana plants and protects against the black Sigatoka pathogen. *Front. Microbiol*, 10:804. doi: 10.3389/fmicb.2019.00804.
- Martín-Salvador, M., Rubio-Arias, H., and Ortega-Rubio, A. (2005). Population structure of Maguey (*Agave salmiana* ssp. *crassispina*) in southeast Zacatecas, Mexico. *Arid Land Resea Manag*, 19: 101-109. doi: 10.1080/15324980590916495.
- Martínez-Palacios, A., Ortega, L. M. P., Chávez, V. M., y Bye, R. (2003). Somatic embryogenesis and organogenesis of *Agave victoria-reginae*: considerations for its conservation. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 74: 135-142.
- Martínez-Rodríguez, A. (2017). Selección y dinámica de sucesión de bacterias endófitas transmitidas por la semilla y la micropropagación de plántulas de *Agave marmorata* Roezl para fines de restauración de un ecosistema. Tesis profesional para obtener el título de Licenciado Biólogo, Universidad Autónoma de Guadalajara.
- Martínez-Rodríguez, A., Raygoza-Macedo, G., Huerta-Robles, A., Reyes-Sepúlveda, I., Lozano-López, J., García-Ochoa, E., Fierro-Kong, L., Medeiros, M. H. G., Di Mascio, P., White Jr, J. F., and Beltrán-García, M. (2019). Chapter book: 8: *Agave* seed endophytes: ecology and impacts on root architecture, nutrient acquisition, and cold stress tolerance. Seed

endophytes, 139-170. Springer Nature Switzerland, ISBN 978-3-030-10504-4. doi: 10.1007/978-3-030-10504-4.

- Martínez-Rodríguez, J del C., Mora-Amutio, M., Plascencia-Correa, L. A., Audelo-Regalado, E., Guardado, F. R., Hernández-Sánchez, E., Peña-Ramírez, Y. J., Escalante, A., Beltrán-García, M. J. and Ogura, T. (2014). Cultivable endophytic bacter from leaf bases of *Agave tequilana* and their role as plant growth promoters. *Brazi J Microbiol*, 45 (4): 1333-1339.
- Medellín, R. (2016). *Leptonycteris nivalis*.
- Miguel-Luna, M. E., Enriquez del Valle, J. R., Vlasco-Velasco, V. A., Villegas-Aparicio, Y., y Carillo-Rodríguez, J. C. (2014). Concentración de benciladenina, tipo y dosis de carbohidatos en el medio de cultivo para proliferación de brotes de *Agave americana*. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias*, 46(1): 97-107.
- Monja-Mio, K., Berredo-Pool, F., Herrera-Herrera, G., Esqueda-Valle, M., and Robert, M. (2015). Development of the stomatal complex and leaf surface of *Agave angustifolia* Hay. 'Bacanora' plantlets during *in vitro* to *ex vitro* transition process. *Sci Horticul*, 189: 32-40. doi: 10.1016/j.scienta.2015.03.032.
- Monkvold, G. P. (2009). Seed pathology progress in academia and industry. *Annu Rev Phytopathol*. 47: 285-311. doi: 10.1146/annurev-phyto-080508-081916.
- Murashige, T. Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiol*.15: 473-497. doi:



- Narváez-Zapata, J. A., and Sánchez-Teyer, L. F. (2009). Agaves as a raw material: recent technologies and applications. *Rec Pat Biotech*, 3: 185-191. doi: 10.2174/187220809789389144.
- Ornelas, J. F., Ordano, M., Hernández, A., López, J. C., Mendoza, L. and Perroni, Y. (2002). Nectar oasis produced by *Agave marmorata* Roezl (*Agavaceae*) lead to spatial and temporal segregation among nectarivores in the Tehuacán Valley, Mexico. *Journal of Arid Environments* 52: 37-51.
- Paparella, S., Araújo, S. S., Rossi, G., Wijayasinghe, M., Carbonera, D, Balestrazzi, A. (2015). Seed priming: state of the art and new perspectives. *Plant Cell Rep*, 34 (8): 1281:93. doi: 10.1007/s00299-015-1784-y.
- Pedrosa-Manrique, A., Tupaz-Villacorte, J., y Wiliam, A. (2008). Micropropagación de *Ilexkunthiana* Triana y Planchon (*Aquifoliacea*), una especie de gran importancia en programas de revegetación. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 10(2): 72-84.
- Portillo, M. L., Santacruz-Ruvalcaba, F., Gutiérrez-Mora, A., and Rodríguez-Garay, B (2007). Somatic embryogenesis in *Agave tequilana* Weber cultivar Azul. *In vitro Cell Develp Biol plant*, 43 (6): 569-575.
- Prieto, K. R., Echaide-Aquino, F., Huerta-Robles, A., Válerio, H. P., Macedo-Raygoza, G., Prado, F. M., Medeiros, M. H. G., Brito, H. F., da Silva, I. G. N., Cunha Felinto, M. C. F., White, J. F., Di Mascio, P., and Beltrán-García, M. J. (2017). Book chapter: 16. Endophytic bacteria and rare aerth elements; promising candidates for nutrients use efficiency in plants. *Plant*

macronutrient use efficiency: molecular and genomic perspectives in crop plants, pp: 285-306. doi: 10.1016/B978-0-12-811308-0.00016-8.

- Ramírez-Ramírez, M., Mancilla-Margalli, N., Meza-Álvarez, L., Turincio-Tadeo, R., Guzmán-De Peña, D., and Ávila-Miranda, M. D. (2017). Epidemiology of *Fusarium Agave* wilt in *Agave tequilana* Weber var. Azul. *Plant, Protect, Sci*, 53 (3): 144-152. doi: 10.17221/142/2016-PPS.
- Rodríguez-Garay, B., Gutiérrez, A., and Acosta-Dueñas, B. (1996). Somatic embryogenesis of *Agave victoriae-reginae* Moore. *Plant Cell, Tiss Org Cult*, 46: 85-87.
- Rodríguez-Garay, B., and Rodríguez-Domínguez, J. M. (2018). Micropropagation of Agave species. *Meth Mol Bio*, 1815: 151-159. doi: 10.1007/978-1-4939-8594-4\_8.
- Ruvalcaba-Ruiz, D., and Rodríguez-Garay, B. (2002). Aberrant meiotic behavior in *Agave tequilana* Weber var. Azul. *BMC Plant Biol*, 2: 10. doi: 10.1186/1471-2229-2-10.
- Sánchez-López, A. S., Pintelon, I., Steven, V., Imperato V., Timmermans, J.-P., González-Chávez, C., Carrillo-González, R., Van hamme, J., Vangronsveld, J, and Thujs, S. (2018). Seed endophyte microbiome of *Crotalaria pumila* unpeeled: Identification of plant-beneficial methylobacteria. *Inter J Mol Sci*, 19 (1): 291.
- Santacruz-Ruvalcaba, F., Gutiérrez-Pulido, H., and Rodríguez-Garay, B. (1999). Efficient *in vitro* propagation of *Agave parrasana* Berger. *Plant Cell, Tissue Org Cultur*, 56 (3): 163-167. doi: 10.1023/A:1006232911778.

- Semarnat, Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Nturales (2010). 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. Diario Oficial de la Federación (DOF).
- Shahzad, E., Khan, A., Bibal, S., Asaf, S., and Lee, I. (2018). What is there in seeds? Vertically transmitted endophytic resources for sustainable imporvement in plant growth. *Front Plant Sci*, 9: 24. doi: 10.3389/fpls.2018.00024.
- Shazad, R., Waqas, M., Khan, A. L., Asaf, S., Khan, S.-M., Yun, B.-W, and Lee, I. J. (2016). Seed-borne endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* RWL-1 produces gibberellins and regulates endogenous phytohormones of *Oryza sativa*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 106; 236-243.
- Slauson, L. A. (2000). Pollination biology of two chiropterophilous agaves in Arizona. *Am J Bot*, 87 (6): 825-836. doi: 10.2307/2656890.
- Tavares, M. J., Nascimento, D. C., Glick, B. R, and Rossi, M. J. (2018). The expression o fan exogenous ACC deaminase by the endophyte *Serratia grimesii* BXF1 promotes the early nodulation and growth of common vean. *Lett in App Microbiol*, 66 (3); 252-259.
- Thorpe, T. A. (2007). History of plant tissue culture. *Mol Biotechnol*, 37 (2): 169-180. doi: 10.1007/s12033-007-0031-3.
- Trejo-Salazar, R., Scheinvar, E., y Eguiarte, L. (2015). ¿Quién poliniza realmente los agaves? Diversidad de visitantes florares en 3 especies de

*Agave* (Agavoideae: Asparagaceae). *Rev Mex Bio*, 86: 358-369. doi: 10.1016/j.rmb.2015.04.007.

- Trejo-Salazar, R., Eguiarte, L., Suro-Piñera, D., and Medellín, R. (2016). Save our bats, save our tequila: industry and science join forces to help bats and Agaves. *Nat Area J*, 36 (5): 523-530. doi: 10.3375/043.036.0417.
- Valenzuela-Zapata, A y Nabhan, G. P. (2003). Tequila. A natural and cultural history. University of Arizona Press, Tucson.
- Vargas-Ponce, O., Zizumbo-Villareal, D., and Martínez-Torres, J. (2007). Libro: en lo ancestral hay future: del tequila, los mezcales y otros agaves. Tradiciones en el aprovechamiento de los agaves mexicanos: una aportación a la protección legal y conservación de su diversidad biológica y cultural. doi: 10.13140/RG.2.1.5192.1441.
- Vega-Ramos, K., Uvalle-Bueno, J, and Gómez-Leyva, J. (2013). Molecular variability among isolates of *Fusarium oxysporum* associated with root rot disease of *Agave tequilana*. *Biochem, Genet*, 51: 243-255. doi: 10.1007/s10528-012-9559-4.
- Verma, S. K and White, J. F. (2018). Indigenous endophytic seed bacteria promote seedling development and defend against fungal disease in brown top millet (*Urochloa ramosa* L.). *J App Microbiol*, 124 (3): 764-778.

## 16. ANEXO

### MEDIO MS MODIFICADO

El tejido vegetal derivado de las semillas se indujo a brotación en el medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) del cual se realizaron modificaciones. El medio base se preparó con las soluciones de los stocks siguientes: macronutrientes, micronutrientes, calcio, Fe-EDTA y adición de una hormona (citoquinina o auxina).

La composición y proporción de los reactivos para los stocks se muestran en las tablas siguientes.

Todas las soluciones de stocks se prepararon en un volumen del 70% de agua, y sobre ella se van añadiendo uno por uno todos los componentes hasta su completa disolución. Posteriormente en un matraz volumétrico se aforo la solución final añadiendo agua bi-destilada y fueron almacenados a 4°C.

Este medio carece de vitaminas L2, del medio convencional generado y usado.

| STOCK DE MACRONUTRIENTES                  |                                    |              |
|-------------------------------------------|------------------------------------|--------------|
| Componente                                |                                    | Aforar a 1 L |
| $(\text{Na}_4)\text{NO}_3$                | Nitrato de amonio                  | 165 g        |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | Sulfato de magnesio heptahidratado | 37 g         |
| $\text{KNO}_3$                            | Nitrato de potasio                 | 190 g        |
| $\text{KH}_2\text{PO}_4$                  | Fosfato de potasio monobásico      | 17 g         |

| STOCK DE MICRONUTRIENTES                            |                                    |              |
|-----------------------------------------------------|------------------------------------|--------------|
| Componente                                          |                                    | Aforar a 1 L |
| $\text{H}_3\text{BO}_3$                             | Ácido bórico                       | 1.240 g      |
| $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$           | Sulfato de manganeso monohidratado | 3.38 g       |
| $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$           | Sulfato de zinc heptahidratado     | 2.12 g       |
| $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | Molibdato de sodio dihidratado     | 5 mg         |
| $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$           | Sulfato de cobre pentahidratado    | 5 mg         |
| $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$           | Cloruro de cobalto hexahidratado   | 5 mg         |
| KI                                                  | Yoduro de potasio                  | 166 mg       |

| STOCK DE CALCIO                           |                               |              |
|-------------------------------------------|-------------------------------|--------------|
| Componente                                |                               | Aforar a 1 L |
| $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | Cloruro de calcio dihidratado | 20 g         |

| STOCK DE Fe-EDTA                          |                                       |              |
|-------------------------------------------|---------------------------------------|--------------|
| Componente                                |                                       | Aforar a 1 L |
| $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | Sulfato ferroso heptahidratado        | 2.784 g      |
| $\text{Na}_2 \cdot \text{EDTA}$           | Etilendinitrilotetra acetato de sodio | 3.724 g      |

La solución stock de Fe-EDTA se almacena en refrigeración a 4°C en un frasco color ámbar ya que se degrada con la luz.

## PREPARACIÓN REGULADORES DE CRECIMIENTO

### Citoquinina

Nuestra hormona para usar es BAP (6-Bencilaminopurina), la solución se prepara en una relación peso/volumen de 1mg/1ml, se disuelve gota a gota con HCl 1M (Ácido clorhídrico 1 normal) o NaOH 1 M (Hidróxido de sodio 1 normal), hasta que esté totalmente transparente. Una vez disuelta, se afora con agua bi-destilada en un matraz volumétrico. La solución se debe almacenar a 4°C en un recipiente color ámbar ya que se degrada con la luz.

## Auxina

Nuestra hormona para usar es KINETN, la solución se prepara en una relación peso/volumen de 1mg/1ml se disuelve gota a gota con etanol al 95% o NaOH 1 M (Hidróxido de sodio 1 normal), hasta que esté totalmente transparente. Una vez disuelta, se afora con agua bi-distilada al volumen deseado en un matraz volumétrico. La solución se debe almacenar a 4°C en un recipiente color ámbar ya que se degrada con la luz.

Nuestra solución base está determinada a concentraciones de hormonas en citoquinina 5 mg/L y auxina 0.025 mg/L.

Para nuestro medio madre se usa el 70% de agua bi-distilada y se van agregando los stocks en las cantidades correspondientes a la tabla que se muestra a continuación.

### PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO MADRE

| Componente        | Aforar a 1 L |
|-------------------|--------------|
| Macronutrientes   | 10 ml        |
| Micronutrientes   | 5 ml         |
| CaCl <sub>2</sub> | 22 ml        |
| Fe.EDTA           | 10 ml        |
| Sacarosa          | 30 g         |
| Agar              | 7.5 g        |
| Citoquininas      | 5 mg         |
| Auxina            | 0.025 mg     |
| pH                | 5.8 ± 0.05   |
| Carbón activado   | 2 g          |

Una vez que se coloquen las soluciones, se agrega la sacarosa y hasta que sea completamente disuelta se ajusta a un pH de 5.8. La solución final se afora en un matraz volumétrico. Se coloca en un matraz Erlenmeyer agregando la relación de agar correspondiente, posterior se disuelve mediante microondas en aproximadamente 8 min con continua agitación. Una vez disuelto el agar se ponen 30 ml en los frascos de micropropagación, se esterilizan por autoclave a 121° C durante 20 minutos, dejándolos gelificar y enfriar en campana de flujo laminar. Estos serán usados hasta 24 horas después para evitar contaminaciones.





# Agave Seed Endophytes: Ecology and Impacts on Root Architecture, Nutrient Acquisition, and Cold Stress Tolerance

8

America Martinez-Rodriguez, Gloria Macedo-Raygoza, Aurora X. Huerta-Robles, Ileana Reyes-Sepulveda, Jhovana Lozano-Lopez, Evelyn Y. García-Ochoa, Luis Fierro-Kong, Marisa H. G. Medeiros, Paolo Di Mascio, James Francis White, Jr, and Miguel J. Beltran-Garcia

|       |                                                                                                                                      |     |
|-------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 8.1   | Introduction .....                                                                                                                   | 140 |
| 8.2   | Ecological Importance of Genus <i>Agave</i> .....                                                                                    | 141 |
| 8.2.1 | Why Is <i>Agave</i> Propagation Ecologically Important? .....                                                                        | 143 |
| 8.3   | Biotechnological Importance of Agaves: From Prebiotics to Biofuels .....                                                             | 144 |
| 8.4   | The <i>Agave</i> Microbiome. . .Until Now .....                                                                                      | 146 |
| 8.4.1 | The Culturable Microbes .....                                                                                                        | 146 |
| 8.5   | Core Microbiome of <i>Agave</i> Seeds: Who Is There? .....                                                                           | 147 |
| 8.5.1 | What Microbes Are Inside <i>Agave</i> Seeds? .....                                                                                   | 148 |
| 8.6   | Dynamics of Seed-Endophytic Bacteria During Emergence Until Formation of the Seedling: The Case of Wild <i>Agave marmorata</i> ..... | 152 |
| 8.7   | <i>Agave</i> “Eats” Microbial Endophytes to Survive in Soils Without Nitrogen .....                                                  | 155 |
| 8.7.1 | Seed-Endophytic Fungi May Also Transfer Organic Nitrogen .....                                                                       | 157 |
| 8.7.2 | Seed Endophytes Can Shape Root Architecture .....                                                                                    | 157 |
| 8.8   | Seed Endophytes Confer Fitness to Cold Stress on <i>Agave</i> Plantlets: A Metabolomic Approach .....                                | 161 |
| 8.8.1 | Secondary Metabolites Were Also Detected Under Chilling Stress and Were Potentially Induced by Endophytic Bacteria .....             | 163 |
| 8.9   | Conclusions .....                                                                                                                    | 164 |
|       | References .....                                                                                                                     | 165 |

A. Martinez-Rodriguez · A. X. Huerta-Robles

Institute of Engineering, Universidad Autónoma de Baja California, Mexicali, Baja California, México

G. Macedo-Raygoza · I. Reyes-Sepulveda · J. Lozano-Lopez · E. Y. García-Ochoa · L. Fierro-Kong · M. J. Beltran-Garcia (✉)

Department of Chemistry-E-Building, Universidad Autonoma de Guadalajara, Zapopan, Jalisco, Mexico

M. H. G. Medeiros · P. Di Mascio

Department of Biochemistry, Institute of Chemistry, Universidade de Sao Paulo, São Paulo, Brazil

J. F. White, Jr

Department of Plant Biology, Rutgers University, New Brunswick, NJ, USA

© Springer Nature Switzerland AG 2019

139

S. K. Verma, J. F. White, Jr (eds.), *Seed Endophytes*,

[https://doi.org/10.1007/978-3-030-10504-4\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-030-10504-4_8)