



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGRÍCOLAS**

---

---

**REGENERACIÓN DE PLANTAS DE *AGAVE MARMORATA*  
*ROEZL*, VÍA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
**INGENIERO AGRÓNOMO FITOTECNISTA**

PRESENTA

**CARLOS ALVAREZ ARAGON**

MODALIDAD: TESIS

ASESOR DE TESIS

**DR. AMAURY MARTÍN ARZATE FERNÁNDEZ**

AGOSTO, 2019.



**CAMPUS UNIVERSITARIO "EL CERRILLO", EL CERRILLO PIEDRAS  
BLANCAS MUNICIPIO DE TOLUCA, MÉXICO.**

## INDICE

1.1.	Objetivo general .....	8
1.2.	Objetivos específicos .....	8
1.3.	Hipótesis .....	8
II.	REVISION DE LITERATURA .....	9
2.1.	Importancia económica, cultural y comercial del Agave .....	9
2.2.	Forma natural de reproducción de <i>Agave marmorata</i> Roehl.....	10
2.3.	Propagación <i>in vitro</i> de Agavaceas .....	10
2.4.	Embriogénesis somática (ES).....	11
2.5.	Características de células embriogénicas.....	13
2.6.	Factores importantes del proceso de embriogénesis somática.....	13
2.7.	Reguladores de crecimiento vegetal (RCV) .....	14
2.8.	Efecto de las auxinas en el proceso de embriogénesis somática .....	15
2.9.	Efecto de la citocinina Benciladenina (BA) en el proceso de embriogénesis somática (ES) 16	
III.	MATERIALES Y METODOS.....	17
3.1.	Ubicación del área experimental .....	17
3.2.	Material biológico experimental .....	18
3.3.	Desinfección de la semilla .....	18
3.4.	Condiciones de siembra e incubación de los tratamientos .....	18
3.5.	Embriogénesis somática.....	19
	Etapa 1. Inducción de callo embriogénico.....	19
3.6.	Variables evaluadas .....	21
3.7.	Análisis estadístico.....	21
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	22
	Etapa 1. Formación de callo embriogénico.....	22
	Etapa 2. Inducción de estructuras embriogénicas .....	22
	Etapa 3. Expresión de estructura embriogénicas.....	23
	4.4 Análisis estadístico .....	25

<b>4.5 Efecto del tratamiento previo con BA .....</b>	<b>27</b>
<b>4.6 Efecto del regulador de crecimiento vegetal 2,4-D y GA y las condiciones de cultivo en la expresión de estructuras embriogénicas .....</b>	<b>28</b>
<b>4.7 Aclimatación de plantas a condiciones <i>ex vitro</i>.....</b>	<b>29</b>

## **INDÍCE DE TABLAS**

Tabla 1. Reguladores del crecimiento vegetal empleados para inducir el proceso de estructuras embriogénicas en <i>Agave marmorata</i> Roezl. ....	20
Tabla 2 .....	24
Tabla 3. Análisis de varianza para número de ES-Sumas de cuadrados tipo III .....	25
Tabla 4 Comparación de medias entre los tratamientos para la expresión de embriones somáticos en <i>Agave marmorata</i> Roezl. ....	26

## **INDÍCE DE FIGURAS**

Figura 1. Respuesta de los explantes a las concentraciones de 2,4-D y BA, solo o en combinación. ....	23
Figura 2. Embriogénesis somática en <i>Agave marmorata</i> Roezl. ....	30

## INTRODUCCIÓN

Entre las plantas más conspicuas del paisaje mexicano, en especial de las zonas áridas y semiáridas de México, están los agaves o magueyes, considerados especies clave en esas regiones, tanto por su abundancia como por la cantidad de recursos que proporcionan a otros organismos. De sus aproximadamente 200 especies, 150 de estos se encuentran en México representando el 75% a nivel mundial.

Las especies de *Agave* crecen en un gran número de hábitats de México, desde el nivel del mar hasta 3400 metros de altitud, aunque son más comunes entre los 1000 y 2000 m.s.n.m. Son abundantes en las planicies y bases de las montañas de las zonas áridas y semiáridas de la península de Baja California, Sonora, el Altiplano Mexicano (Chihuahua, Coahuila, Guanajuato y Querétaro), la planicie Tamaulipeca, el Valle de Tehuacán- Cuicatlán y la Cuenca del río Balsas. Abundan también en sitios escarpados y expuestos dentro de los bosques templados, en paredes rocosas, en las barrancas de los ríos de las provincias biogeográficas de la Sierra Madre Occidental, Sierra Madre Oriental, Serranías Meridionales y Sierra Madre del Sur (García-Mendoza, 2007).

El *Agave* es quizás la planta con mayor utilización y aprovechamiento a nivel mundial. De la planta se pueden obtener bebidas alcohólicas (tequila y mezcal) y fermentadas, alimentos, forraje para rumiantes, fibras, material de construcción, papel y productos terapéuticos, entre otros (Méndez-Gallegos *et al.*, 2011).

El mezcal es producido en la mayoría de los estados de México, en los últimos 10 años el mezcal ha alcanzado un reconocimiento nacional e internacional, siendo así la segunda bebida destilada

de agave más consumida en nuestro país después del tequila, el cual finalmente también es un mezcal con Denominación de Origen propia.

El mezcal puede elaborarse aproximadamente con 14 distintos tipos de agave, algunas existen de forma silvestre como es el caso de Agave tepeztate (*Agave marmorata* Roezl) es con probabilidad el más interesante de los agaves, así como uno de los más raros, su nombre se deriva del vocablo "Tepetl" que en náhuatl significa montaña o monte, haciendo referencia a los lugares donde se le puede encontrar: pendientes empinadas con suelos rocoso donde, en ocasiones, los agaves crecen colgando horizontalmente de los acantilados, haciendo que la extracción del mezcal sea peligrosa. Sin embargo, a pesar de las extremas condiciones en las que crece, sus raíces se extienden aferrándose a las rocas, evitando la erosión en épocas de lluvias.

Al ser un agave endémico y más específicamente de Oaxaca, su crecimiento y reproducción se limita a las selvas bajas y los matorrales de la sierra Madre del Sur, desde el extremo oriental del río Balsas hasta el Istmo de Tehuantepec, donde los suelos son delgados y calizos, con una elevación de entre 680 y 1,800 metros sobre el nivel del mar, y una temperatura que varía entre los 18 y los 26 °C.

Con una altura de casi dos metros de alto y dos metros cincuenta de ancho, el *A. marmorata* Roezl se distingue por su forma de hojas anchas y onduladas de color verde amarillentas o verde azuladas, las cuales son ásperas al tacto y con espinas cortas y robustas, pero lo que más llama la atención de esta planta son sus flores, consideradas por algunos las más hermosas entre los agaves. De color naranja y amarillo brillante, son utilizadas por los habitantes de Oaxaca. Además, algunos suelen usar los destilados de esta planta como remedio medicinal, tanto para curar la tos o el asma, como para el alivio de heridas.

La creciente demanda de materia prima para abastecer la producción de mezcal ha generado la sobreexplotación de las especies de agaves silvestres teniendo graves afectaciones a los ecosistemas. De la misma forma, las especies domesticadas son el blanco de plagas y enfermedades que merman considerablemente los cultivos.

El riesgo aumenta si se tiene en cuenta que es uno de los magueyes que tienen la etapa de maduración más longeva de todas las especies de agaves mezcaleros, ya que puede prolongarse hasta 35 años en forma silvestre y el gusto por las flores, en caso de ser cortadas antes del trabajo de los polinizadores complicaría la reproducción. Lo mismo ocurre cuando se cortan los ejemplares antes de que quiten y puedan aprovecharse sus semillas.

Por lo tanto, se requieren acciones que aseguren la permanencia del recurso y permitan la planeación de áreas para su aprovechamiento sustentable (Domínguez et al., 2008)

La biotecnología vegetal puede ser una alternativa para subsanar lo relativo al esquema de propagación a gran escala, así la embriogénesis somática es considerada una poderosa herramienta biotecnológica para la regeneración y mejoramiento genético de plantas, ya que puede ser inducida en forma directa sobre el explante o indirectamente a partir de callo, siguiendo un patrón de desarrollo similar al de un embrión de origen cigótico. En función de lo anterior, en el presente trabajo se plantean los siguientes objetivos:

### **1.1. Objetivo general**

Regenerar plantas de *Agave marmorata* Roehl, vía embriogénesis somática.

### **1.2. Objetivos específicos**

- Evaluar el efecto de tres concentraciones de 6-bencil adenina (BA) y una de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) en la inducción de estructuras embriogénicas.
- Evaluar el efecto de las condiciones de cultivo (luz y oscuridad) en la expresión de estructuras embriogénicas.
- Comparar el efecto del ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y ácido giberélico (GA<sub>3</sub>), en la expresión de estructuras embriogénicas.
- Adaptar a condiciones *ex vitro* las plantas de *Agave marmorata* Roehl, obtenidas en el laboratorio mediante el proceso de embriogénesis somática.

### **1.3. Hipótesis**

La 6-bencil adenina (BA) sola o en combinación con ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) puede favorecer la inducción de estructuras embriogénicas.

Las condiciones de cultivo (luz y oscuridad) y al menos un regulador del crecimiento (2,4-D o GA<sub>3</sub>) promueven la expresión de estructuras embriogénicas.

## II. REVISION DE LITERATURA

### 2.1. Importancia económica, cultural y comercial del Agave

En México, los agaves han tenido y tienen una gran importancia económica y cultural para numerosos pueblos indígenas y mestizos, que los han aprovechado durante siglos como fuente de alimento, bebida, medicina, combustible, cobijo, ornato, fibras duras extraídas de las hojas (ixtle), abono, construcción de viviendas y elaboración de implementos agrícolas, entre otros usos (García-Mendoza, 2007)

De acuerdo con el Consejo Regulador del Mezcal en el 2018, el mezcal alcanzo una producción de 5,089,667 litros, siendo Oaxaca el mayor productor de esta bebida con el 92.3 %, generando 19,000 empleos directos y más de 85,000 empleos indirectos lo cual ha permitido que disminuya la migración.

La importancia de la industria del mezcal en la economía es sin duda significativa tanto en términos de su contribución al Producto Interno Bruto (PIB) manufacturero como en términos de generación de empleos y de divisas (Ramales y Ortiz, 2009).

## **2.2. Forma natural de reproducción de *Agave marmorata* Roezl.**

La reproducción del *Agave marmorata* Roezl se da de forma sexual y asexual. La propagación sexual casi no se lleva a cabo, ya que la polinización es muy ineficiente y probablemente sin importancia en los agaves (Nobel, 1998). En esta especie tienen que transcurrir de 25 a 35 de años para la producción de semilla de forma silvestre. La propagación asexual se realiza en forma vegetativa a través de bulbos apomícticos y por rizoma (hijuelos). Los bulbos apomícticos son plántulas que brotan en la inflorescencia los cuales pueden ser utilizados para un posterior cultivo. El rizoma dependerá inicialmente de la planta madre, se producen después del primer año de plantación, los cuales dependiendo de su tamaño se establecen en campo, en caso de que sean pequeños se mantienen en vivero por 12 meses o más, hasta su plantación definitiva (Banco de México, 1989).

## **2.3. Propagación *in vitro* de Agavaceas**

La necesidad urgente de obtener un gran número de individuos uniformes de genotipos seleccionados ha llevado al desarrollo de técnicas de cultivo de tejidos *in vitro* con el fin de acelerar el proceso de propagación vegetativa.

En el género *Agave*, la mayoría de los trabajos realizados en cultivo de tejidos, se han orientado a la obtención de grandes cantidades de plantas, principalmente por organogénesis y embriogénesis somática, utilizando como explantes: tallos, hojas, raíces, semillas y fragmentos de semillas.

Son muchas las ventajas que ofrece la micropropagación con respecto a los métodos convencionales; ya que cabe destacar que las plantas obtenidas de cultivo de tejidos vegetales ofrecen un sistema de propagación clonal, un número indeterminado de plantas, libre de virus y

patógenos. Por el método convencional se corre el riesgo de obtener plantas enfermas que pueden afectar el buen desarrollo de la planta.

En *Agave* hay reportes como es el caso de Groenewald, et al (1977), utilizando fragmentos de semilla de una especie de *Agave*, en el medio de Linsmaier y Skoog (1965), suplementado con  $0.2 \text{ mgL}^{-1}$  de 2,4-D y  $1.0 \text{ mgL}^{-1}$  Kinetina, reportaron la organogénesis indirecta 13 semanas después de establecido el cultivo. Resultados similares fueron reportados por Robert, et al (1987), usando como explante secciones de tallo y rizomas de *Agave fourcroydes* Lem, se cultivaron sobre el medio SH, suplementado con  $0.025 \text{ mgL}^{-1}$  de 2,4-D +  $1.0 \text{ mgL}^{-1}$  de BA. Los brotes enraizaron fácilmente en los medios SH y MS suplementado con  $0.025 \text{ mgL}^{-1}$  de 2,4-D. Por su parte Nava (1988), también reportó organogénesis indirecta utilizando solo secciones de tallo de *Agave tequilana* “azul” como explantes, y cultivándolos sobre un medio MS (1962) con clorhidrato de tiamina  $1.0 \text{ mg L}^{-1}$  mionositol  $100 \text{ mgL}^{-1}$   $0.0029 \text{ mgL}^{-1}$  de IBA +  $0.1 \text{ mgL}^{-1}$  de BA y  $30 \text{ gL}^{-1}$  de azúcar comercial, incubados bajo 16 horas luz y 8 horas oscuridad.

#### **2.4. Embriogénesis somática (ES)**

La embriogénesis somática es la formación de un embrión a partir de una célula, sin la necesidad de la fusión de gametos (Tisserat *et al.*, 1979). La embriogénesis somática ha surgido como una nueva vía de propagación y teóricamente es el más eficiente para la producción masiva de plantas *in vitro* y constituye una herramienta de trabajo para la conservación *in vitro* de germoplasma y el mejoramiento genético (Griga, 2000; Das et al., 2002; Freire Seijo, 2003).

Los embriones somáticos se pueden obtener de células vegetativas, de tejidos reproductivos, de embriones cigóticos o de callos producidos de cualquiera de las partes de las plantas (Copeland y McDonald, 1995). Esta técnica permite incrementar los coeficientes de multiplicación, disminuir los

costos de producción y da la posibilidad de automatizar el proceso productivo con el uso de biorreactores a la igual posibilidad de encapsular estas estructuras y obtener semillas artificiales. (de Fera, 2000; Freire Seijo, 2003).

Existen varias teorías acerca del origen unicelular o multicelular de los embriones somáticos. Algunas referencias señalan el incuestionable origen unicelular de los embriones en varios cultivos (Street y Withers, 1974; Haccius, 1977), pero también ha quedado claro que el embrión puede tener un origen multicelular (Williams y Maheswaran, 1986). De manera general las células de las que se derivan los embriones somáticos muestran características comunes a las células en activa división, las cuales son de tamaño pequeño, citoplasma denso, núcleo grande con nucleolo prominente, vacuola pequeña y profusión de gránulos de almidón. Según William y Mahescuaran (1986) sus propiedades histoquímicas y ultraestructurales sugieren una intensa síntesis de ARN y actividad metabólica

Para que ocurra la reprogramación en una célula somática y esta comience a diferenciarse en un embrión, su patrón de expresión génica debe cambiar.

Es probable que esta regulación génica se deba a factores epigenéticos como la metilación del DNA y compactaciones o descompactaciones en la disposición de la cromatina. Según Von Arnold *et al.* (2002), los reguladores de crecimiento vegetal, principalmente las auxinas, juegan un papel muy importante en la transducción de señales para desencadenar un patrón de expresión génica determinado. De todas las auxinas, el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), es utilizado en la mayoría de los casos para la inducción de ES, debido a que promueve la hipermetilación del DNA con mayor facilidad (Viñas y Jiménez, 2011).

## **2.5. Características de células embriogénicas**

La característica más distintiva de un embrión somático es que constituye un nuevo individuo con estructura bipolar (raíz y brote) capaz de originar una planta completa. Histológicamente se plantea que no tiene conexión vascular con el tejido que le dio origen, por lo que pueden ser separados fácilmente de este, presenta bandas procambiales entre los ápices. Contrariamente a los embriones cigóticos, los embriones somáticos no contienen un nuevo grupo de genes, sino que poseen la misma combinación genética de la planta fuente del explante (Freire Seijo, 2003). Las células embriogénicas, a partir de las cuales se originan los embriones, se caracterizan por ser de pequeño tamaño, por poseer un citoplasma denso con un núcleo grande, vacuolas pequeñas, muchos ribosomas y altas concentraciones de RNA, proteínas y abundantes granos de almidón. Según William y Mahescuaran (1986) sus propiedades histoquímicas y ultraestructurales sugieren una intensa síntesis de ARN y actividad metabólica.

## **2.6. Factores importantes del proceso de embriogénesis somática**

Evidentemente los procesos embriogénicos son afectados y modulados por una serie de factores que en algunos casos favorecen y en otros dificultan.

De los cuales se encuentran, los reguladores de crecimiento vegetal, genotipo, explante, composición del medio basal, fuente de carbono, fuente de nitrógeno, aminoácidos, condiciones de luz, pH del medio de cultivo (Hernández, 2013).

## **2.7. Reguladores de crecimiento vegetal (RCV)**

Went y Thimann definieron a las hormonas del crecimiento como “sustancias que siendo producidas en un organismo son transferidas a otra y en ésta influyen un proceso fisiológico específico”. En sentido estricto, las sustancias del crecimiento extraídas de los tejidos vegetales y las sustancias sintéticas con efectos reguladores no pueden ser llamadas hormonas (Bidwell, 1979). Por lo anterior fue creado el término “regulador de crecimiento vegetal”, que define a los compuestos orgánicos distintos de los nutrientes, que en pequeñas cantidades estimulan, inhiben o modifican de algún modo cualquier proceso fisiológico en las plantas.

Como sabemos, el crecimiento en las plantas es un proceso dinámico, complejo y que está rigurosamente controlado, en el que los RCV juegan un papel principal en el control del crecimiento, no únicamente dentro de las plantas como un universo, sino también a nivel de órgano, tejido y células (Wareing y Phillips, 1973)

Es bien sabido que las auxinas y las citoquininas son reguladores clave de la división y diferenciación de las células vegetales. Estos reguladores de crecimiento pueden inducir la reprogramación de células vegetales.

Estas técnicas se han aplicado a varios agaves de importancia económica como *A. fourcroydes*, *A. sisalana*, *A. angustifolia*, *A. tequilana*, y se podrían usar, con pequeñas variaciones, para la mayoría de las otras especies.

## **2.8. Efecto de las auxinas en el proceso de embriogénesis somática**

Las auxinas son el regulador de crecimiento de plantas más utilizado para controlar la regeneración de órganos, la inducción de callos o la inducción de embriogénesis somática. Estas juegan un papel central en el desarrollo temprano y pos embriogénico de las plantas.

En general, los callos pro-embriogénicos contienen más auxinas endógenas que los callos no embriogénicos. Esta observación se ha documentado en especies diferentes, como *D. carota* (Jiménez y Bangerth 2001) (Sasaki et al. 1994; Tianran y Neumann 1985), *Medicago falcata* (Ivanova et al. 1994), *Zea mays* (Jiménez y Bangerth 2001c), *Triticum aestivum* (Jiménez y Bangerth 2001b), *Coffea canephora* (Quiroz-Figueroa et al. 2006), *Pennisetum purpureum* (Rajasekaran et al. 1987), *Brassica napus* (Rodríguez-Sanz et al. 2015) y *Prunus spp.* (Michalczyk y Druart 1999). El ácido 2,4-diclorofenoxiacético se ha aplicado ampliamente para inducir embriogénesis somática. En la zanahoria, se ha demostrado que la eliminación de 2,4-D de un medio de cultivo promueve la formación de estructuras embriogénicas (Fujimura 2014; Halperin 1964). Incluso cuando no siempre observamos esta respuesta, se cree que el 2,4-D facilita la transición de las células embrionarias a los embriones somáticos. A diferencia del ácido indolacético, la contribución a la eficiencia embriogénica mediante el 2,4-D se puede hacer por la falta de su degradación en la célula, lo que podría influir en la reprogramación transcripcional que dirige el programa de desarrollo de las células; particularmente en aquellas especies de plantas con niveles más altos de auxina endógena. En este sentido, los tratamientos con 2,4-D (100  $\mu$ M) en cultivos de células de alfalfa, durante al menos 1 h, inducen la generación de embriones somáticos después de 2 semanas de cultivo (Dudits et al. 1991), mientras que el tratamiento con una concentración más baja de 2,4-D (4,5  $\mu$ M) en células epidérmicas de zanahorias de 12 a 24 h promueve la embriogénesis somática directa después de la transferencia de la célula epidérmica a

un cultivo libre de 2,4-D (Masuda et al. 1995). Posteriormente, utilizando *Arabidopsis thaliana*, se determinó que, a nivel molecular, el 2,4-D afecta la expresión de un alto número de factores de transcripción, en particular los relacionados con el estrés (Gliwicka et al. 2013). Los resultados descritos anteriormente sugieren que las cantidades de auxina exógena induce la acumulación de auxina endógena, que parece ser esencial para la inducción de embriogénesis somática.

## **2.9. Efecto de la citocinina Benciladenina (BA) en el proceso de embriogénesis somática (ES)**

Las citocininas controlan la expresión génica a nivel transcripcional y postranscripcional, la mayor parte de las alteraciones que ocasionan son cuantitativas, pero también se observan, ocasionalmente cambios cualitativos (Barba y Sánchez, 2012).

Las aplicaciones de la benciladenina (BA), bencilaminopurina (BAP) o 2 isopentil adenina (2iP) solas o en combinación con otras citocininas-auxinas también han sido utilizadas para inducir la embriogénesis somática en muchas especies (Nogueras, 2013).

El primer protocolo para la embriogénesis somática en *A. tequilana* fue informado por Portillo et al. (2007). Los embriones somáticos se produjeron a partir de láminas foliares recolectadas de seis genotipos micropropagados *in vitro* y se cultivaron en medio MS suplementado con vitaminas L2 (Phillips y Collins, 1979) con la adición de varios reguladores del crecimiento. En este estudio, se encontró que para la inducción de la embriogénesis somática algunos genotipos dieron una buena producción de embriones con una alta concentración de citoquinina y una baja concentración de auxina, mientras que otros genotipos mostraron una buena respuesta a una concentración de auxina relativamente alta y una baja concentración de citoquinina. De esta manera, el genotipo llamado S3 produjo embriones somáticos con 10.0 y 15.0 mg L<sup>-1</sup> BA y 1.0 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D. Por otro

lado, el genotipo S7 produjo embriones somáticos con  $2.0 \text{ mg L}^{-1}$  de 2,4-D y  $0.3 \text{ mg L}^{-1}$  de BA. Estas respuestas altamente contrastantes solo pueden atribuirse al genotipo de la planta madre.

Arzate-Fernández y Mejía-Franco (2011) lograron embriogénesis somática en *Agave angustifolia* mediante el uso de embriones cigóticos como explantes. Estos embriones se cultivaron para el proceso de inducción en medio MS al 25% suplementado con  $3.0 \text{ mg L}^{-1}$  2,4-D,  $1.0 \text{ mg L}^{-1}$  BA y  $60 \text{ g L}^{-1}$  de sacarosa y se incubaron en condiciones de oscuridad.

Monja-Mio y Robert (2013) informaron embriogénesis somática directa en *A. fourcroydes* a través del cultivo de capa celular fina (tTCL). La inducción de la embriogénesis somática se logró mediante el cultivo de los explantes en medio MS suplementado con vitaminas L2 (Phillips y Collins 1979),  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  de dicamba (DIC) o  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  de picloram (PIC),  $30 \text{ g L}^{-1}$  sacarosa, solidificado con  $3 \text{ g L}^{-1}$  de agar y  $3 \text{ g L}^{-1}$  de Phytigel e incubado en condiciones de oscuridad. La respuesta embriogénica mejoró cuando las plántulas del donante explante se mantuvieron durante un mes en un medio de cultivo que contenía  $10 \text{ mg L}^{-1}$  de BA.

### **III. MATERIALES Y METODOS**

#### **3.1. Ubicación del área experimental**

El trabajo experimental se llevó a cabo en el Laboratorio de Biología Molecular Vegetal, del Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Fitomejoramiento, Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma del Estado de México, ubicada en el Campus Universitario “El Cerrillo”, Toluca, México.

### **3.2 Material biológico experimental**

Se utilizaron semillas maduras de *Agave marmorata* Roezl., donadas por el Centro Regional Universitario Sur Oaxaca, Programa Maguey-Mezcal, de la Universidad Autónoma de Chapingo.

### **3.3 Desinfección de la semilla**

Las semillas fueron sumergidas en una solución jabonosa, Tween® 20 y se enjuagaron a chorro de agua corriente por 15 minutos para eliminar polvo y grasas, posteriormente fueron trasladadas a una campana de flujo laminar para trabajar de manera aséptica donde se sumergieron en etanol al 70% durante un minuto, después en una solución de hipoclorito de sodio al 1% por 15 minutos en constante agitación, finalmente se enjuagaron tres veces con agua destilada esterilizada y se dejaron reposar por 24 h.

### **3.4 Condiciones de siembra e incubación de los tratamientos**

La siembra del material biológico experimental se llevó a cabo en cajas Petri, colocando 10 ejes embrionarios cigóticos por caja, los tratamientos fueron incubados en completa oscuridad. Todos los tratamientos fueron incubados a una temperatura de 25°C. Se hicieron observaciones periódicas a los 20, 40 y 60 ddc, a fin de evaluar la respuesta de los explantes a cada tratamiento en relación con la formación de callo embriogénico, y posteriormente fueron transferidos a medio fresco para la inducción de los embriones somáticos.

### **3.5 Embriogénesis somática**

En el presente trabajo la obtención de embriones somáticos se llevó a cabo en cuatro etapas.

#### **Etapas 1. Inducción de callo embriogénico**

Los explantes se establecieron en un medio de cultivo para la inducción de callo (MI) (Nava-Becerril y Arzate-Fernández, 2015), que consiste en sales MS (Murashige y Skoog, 1962) al 25 %, suplementados con las vitaminas L2 (Phillips y Collins, 1979), 5 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), 3 mg L<sup>-1</sup> de benciladenina (BA), 60 g L<sup>-1</sup> de sacarosa y 8 g L<sup>-1</sup> de agar, fueron incubados en completa oscuridad durante 8 semanas.

El pH del medio de cultivo se ajustó a  $5.7 \pm 0.1$  con NaOH o HCl 1.0 N, antes de adicionar el agar, y después se esterilizó a una temperatura de 121°C y a 1.1 Kg cm<sup>-2</sup> de presión por 20 minutos.

#### **Etapas 2. Inducción de estructuras embriogénicas**

Para la inducción de estructuras embriogénicas, los callos obtenidos en el experimento anterior se fraccionaron y se transfirieron a un medio cultivo MS al 50 %, enriquecido con sacarosa 30 g L<sup>-1</sup>, 8 g L<sup>-1</sup> de agar y se evaluó el efecto de dos reguladores de crecimiento vegetal, sobre la inducción de estructuras embriogénicas y la formación de embriones somáticos. Tres concentraciones de la citocinina BA, (2.0, 6.0 y 10 mg L<sup>-1</sup>) y una concentración de auxina 2,4-D (5 mg L<sup>-1</sup>), solos y/o combinados (Cuadro 1), dando un total de ocho tratamientos con seis repeticiones por tratamiento con seis secciones de callo cada tratamiento. Todos los tratamientos fueron expuestos a condiciones de luz.

Tabla 1. Reguladores del crecimiento vegetal empleados para inducir el proceso de estructuras embriogénicas en *Agave marmorata* Roehl.

		Citocinina (BA)			
		0.0	2.0	6.0	10.0
	(mgL <sup>-1</sup> )				
Auxina(2,4-D)	0.0	0.0,0.0	2.0,0.0	6.0,0.0	10.0,0.0
	5.0	0.0,5.0	2.0,5.0	6.0,5.0	10.0,5.0

### Etapa 3. Expresión de estructuras embriogénicas

Para la expresión de las estructuras embriogénicas se tomaron los callos de los experimentos previos que formaron el 100 % de estructuras embriogénicas y se transfirieron a medio MS al 50%, con 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa y gelificado con 8 g L<sup>-1</sup> donde se evaluaron dos reguladores de crecimiento, 3 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> y 0.1 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D, en condiciones de oscuridad y luz.

### Etapa 4. Medio para el crecimiento de las plantas.

Se utilizó el medio MS al 50%, enriquecido con sacarosa (30 g L<sup>-1</sup>), libre de reguladores del crecimiento vegetal y 8 g L<sup>-1</sup> de agar. Todas las plantas obtenidas se colocaron en condiciones de luz.

### 3.6 Variables evaluadas

- ✚ Porcentaje de formación de callo:

$$\% \text{ de formación de callo} = \frac{\text{número de callos observados} * 100}{10}$$

- ✚ Porcentaje de expresión de estructuras embriogénicas
- ✚ Número de embriones somáticos formados por tratamiento
- ✚ Porcentaje de las plantas aclimatadas.

### 3.7 Análisis estadístico

Los datos obtenidos sobre el número de embriones somáticos inducidos por callo se sometieron a un análisis de varianza con ayuda del software *Stathgraphics* versión 5.0 y, en donde hubo diferencias significativas entre los tratamientos evaluados, se realizó una prueba de comparación de medias de (LSD) con un nivel de significancia del 95%.

## 5. Aclimatación de plantas a condiciones *ex vitro*

Las plantas de *A. marmorata* Roezl regeneradas *in vitro*, vía ES, fueron lavadas con agua corriente para eliminar todo residuo de agar y se transfirieron en cilindros de foami agrícola de 4.3 x 5 cm, se colocaron en un sistema de raíz flotante con solución nutritiva. La primera semana fueron cubiertas con tapas de polietileno, y se retiraron en la segunda semana.

## **IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Embriogénesis somática**

#### **Etapas 1. Formación de callo embriogénico**

La desdiferenciación de los ejes embrionarios cigóticos se empezó a observar con apoyo de un microscopio estereoscópico, a partir del día 9 después de iniciado el cultivo ddic (figura 2A), sin embargo, la formación de las masas callosas de diámetro de 5.0 y 8.0 mm con un peso de 0.4 g se obtuvo a los 60 ddic (Figura 2C)

#### **Etapas 2. Inducción de estructuras embriogénicas**

Con relación a la formación de estructuras embriogénicas, se obtuvo un 100% de respuesta en solo seis tratamientos de los ocho evaluados. Los tratamientos sin reguladores de crecimiento y los que contenían 2.0 mgL<sup>-1</sup> de BA a los 75 ddic, formaron estructuras rizogénicas (figura 1A). Los tratamientos que contenían altas concentraciones de BA (6.0 y 10.0 mgL<sup>-1</sup>) formaron estructuras nodulares, compactas con un aspecto friable y se tornaron verde 80 ddic (figura 1B). Esta característica se le puede atribuir al efecto de las altas concentraciones de citoquininas que mejoran la síntesis de clorofila en las plantas (George, 1993; Zaffari et al.1998). Los tratamientos en combinación 2,4-D y BA (5.0 + 6.0 y 5.0 + 10.0 mgL<sup>-1</sup>) formaron estructuras nodulares muy pronunciadas de un color amarillo perlado (figura 1C) esto se presentó en el 100 % de los explantes a los 80 ddic. Algunas células en presencia de auxina adquieren totipotencia, forman grupos pro embriogénicos y pasan a la etapa globular, la inclusión de citoquininas en el medio de cultivo permite formar callos en varias especies vegetales, aunque principalmente induce que regiones meristemáticas multicelular se diferencien en estructuras organizadas (Freire,2003).

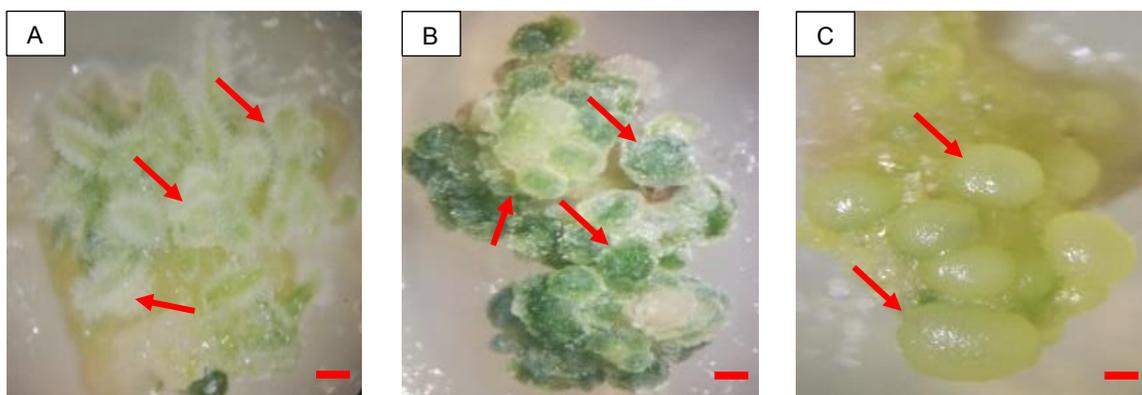


Figura 1. Respuesta de los explantes a las concentraciones de 2,4-D y BA, solo o en combinación. A) Callo con numerosas raíces (flechas) a partir de los 75 DDIC en los tratamientos sin RCV. B) Callo con estructuras nodulares compactas con un aspecto friable y de color verde a partir de los 80 DDIC en los tratamientos con 10 mgL<sup>-1</sup> de BA. C) Callo con estructuras nodulares muy pronunciadas de un color amarillo perlado (flechas) a partir de los 80 DDIC, en los tratamientos con 5.0 mgL<sup>-1</sup> de 2,4-D y 10 mgL<sup>-1</sup> de BA. (Barra 0.5 cm)

### **Etapa 3. Expresión de estructura embriogénicas**

En función a la tabla la expresión de estructuras embriogénicas solo se presentó en cuatro tratamientos de los veinticuatro evaluados. Los embriones se detectaron fácilmente sobre los callos formados tanto en condiciones de luz y oscuridad ya que estos difirieron considerablemente de color y forma con respecto donde se generaron (Figura 2D y E). Donde se puede observar que el mejor tratamiento fue el 5, que consistía en 0.1 mgL<sup>-1</sup> de 2,4-D bajo condiciones de luz y el tratamiento previo fue con 10.0 mgL<sup>-1</sup> de BA con una media de 19.4 embriones somáticos, seguido del tratamiento que consistía en 3.0 mgL<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub>, bajo condiciones de oscuridad y el tratamiento previo fue con 10.0 mgL<sup>-1</sup> de BA.

Estos embriones presentaron una coloración verde, y los que se desprendían de callo germinaron formando una planta completa con su parte apical y radical (Figura 2F).

Tabla 2. Numero de embriones somáticos obtenidos en los tratamientos de expresión de *Agave marmorata* Roehl

Tratamiento	Tratamiento previo	Condiciones de cultivo	Tratamiento de ES	R.C.V (mgL <sup>-1</sup> )		No. De ES
				AG <sub>3</sub>	2,4-D	
1	C	L	1	0	0.1	3
2	C	L	2	3	0	0
3	C	O	1	0	0.1	0
4	C	O	2	3	0	0
5	D	L	1	0	0.1	19.4
6	D	L	2	3	0	0
7	D	O	1	0	0.1	2.2
8	D	O	2	3	0	15.2
9	E	L	1	0	0.1	0
10	E	L	2	3	0	0
11	E	O	1	0	0.1	0
12	E	O	2	3	0	0
13	F	L	1	0	0.1	0
14	F	L	2	3	0	0
15	F	O	1	0	0.1	0
16	F	O	2	3	0	0
17	G	L	1	0	0.1	0
18	G	L	2	3	0	0
19	G	O	1	0	0.1	0

20	G	O	2	3	0	0
21	H	L	1	0	0.1	0
22	H	L	2	3	0	0
23	H	O	1	0	0.1	0
24	H	O	2	3	0	0

#### 4.4 Análisis estadístico

En función al análisis estadístico ANOVA, podemos observar que todos los factores, así como su interacción influyeron estadísticamente ( $P < 0.05$ ) en la formación de embriones somáticos (Tabla 3).

**Tabla 4. Análisis de varianza para número de ES-Sumas de cuadrados tipo III**

Fuente	Suma de cuadrados	Df	Cuadrado de la media	F-Ratio	Valor de P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: Tratamiento de inducción de estructuras embriogénicas	1374.04	5	274.808	519.32	0.0000
B: Condiciones de cultivo	5.20833	1	5.20833	9.84	0.0023

Regeneración de plantas de *Agave marmorata* Roezl. vía embriogénesis somática

C: Expresión de estructuras embriogénicas	18.4083	1	18.4083	34.79	0.0000
INTERACCIONES					
AB	11.0417	5	2.20833	4.17	0.0018
AC	44.0417	5	8.80833	16.65	0.0000
BC	261.075	1	261.075	493.37	0.0000
ABC	1062.38	5	212.475	401.53	0.0000
RESIDUAL	50.8	96	0.529167		
TOTAL (CORRECTED)	2826.99	119			

Todas las relaciones F se basan en el error cuadrado medio residual.

**Tabla 5 Comparación de medias entre los tratamientos para la expresión de embriones somáticos en *Agave marmorata* Roezl.**

Tratamiento	Numero de repeticiones	Media	Grupos homogéneos
10	5	0.0	E
11	5	0.0	E
12	5	0.0	E
19	5	0.0	E
14	5	0.0	E
15	5	0.0	E
16	5	0.0	E
17	5	0.0	E
13	5	0.0	E
9	5	0.0	E
2	5	0.0	E
20	5	0.0	E
21	5	0.0	E
22	5	0.0	E
23	5	0.0	E
24	5	0.0	E
3	5	0.0	E

4	5	0.0	E
18	5	0.0	E
6	5	0.0	E
7	5	2.2	D
1	5	3.0	C
8	5	15.2	B
5	5	19.4	A

Letras iguales significa que no hay estadísticamente diferencia significativa.

#### 4.5 Efecto del tratamiento previo con BA

La auxina 2,4-D se usa ampliamente para la inducción de ES (Gaj 2004; Jiménez 2005) y su uso se ha informado en otras especies de agave como *A. victoria reginae* (Rodríguez-Garay et al.1996; Martínez Palacios, et. al.2003) *A. angustifolia* Haw (Arzate-Fernández y Mejía Franco,2011) y *A. Veracruz* (Tejavathi et al:2007). Pero se ha reportado que tratamientos previos con citocininas se ha asociado con una mayor diferenciación embriogénica y una alta formación de ES como se ha reportado en *A. Tequilana* (Portillo et al.,2007),*A. fourcroydes* (Monja-Mio y Robert,2013), *Coffea arabica* (Papanastasia et al 2008) y *Capsicum annum* (Kintzios et al 2000).

Resultados similares se observaron en el presente trabajo de investigación, ya que el mayor número de embriones somáticos se observó en los tratamientos con 10 mgL<sup>-1</sup> de BA a los 105 ddic tanto en condiciones de luz como oscuridad. Los ES que se formaron en el tratamiento con 0.1 mgL<sup>-1</sup> de 2,4-D, bajo condiciones de luz tomaron una coloración verde translúcida, y los que se formaron en el tratamiento con 3 mgL<sup>-1</sup> bajo condiciones de oscuridad tomaron una coloración blanco cremoso (fig 2E)

#### **4.6 Efecto del regulador de crecimiento vegetal 2,4-D y GA y las condiciones de cultivo en la expresión de estructuras embriogénicas**

El mejor tratamiento fue con 0.1 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D en luz con 19.4 ES (tabla 2 ). Donde el callo presento características de disgregarse con cierta facilidad al realizar un subcultivo. Mientras los que se encontraban en condiciones de oscuridad permanecieron con una consistencia dura y compacta generando 2.2 ES. Por su parte, Verhagen y Wann (1989) obtuvieron callos embriogénicos y embriones somáticos en condiciones de luz y oscuridad, utilizando como explantes embriones cigóticos de Norway spruce, los callos embriogénicos se pudieron mantener por largos periodos de tiempo en ambas condiciones de incubación. Así mismo, Michler y Linenberger (1987), empleando cotiledones y hojas de zanahoria, reportaron que la luz blanca, la azul y bajas intensidades de luz roja inhibieron la embriogénesis, pero altas intensidades de este tipo de luz promovieron los mismos niveles de embriogénesis somática, que los inducidos bajo condiciones de oscuridad.

El segundo mejor tratamiento fue 3.0 mg L<sup>-1</sup> de AG<sub>3</sub> con 15.2 embriones (Demeter et al., 2010) reportó en *Crocus heuffelianus*, una cantidad muy alta de AG<sub>3</sub> (25 mg L<sup>-1</sup>), donde se consideró que ayuda a la regeneración de ES. Dato muy similar a nuestra investigación se reporta en yuca, especie totalmente distinta, en el cual se le adicionó 1 mg L<sup>-1</sup> de AG<sub>3</sub> (Medero et al., 2000), para la maduración de embriones somáticos, utilizando yemas axilares como explante. Comparando nuestros resultados con lo mencionado por los autores anteriores, es evidente que la cantidad de AG<sub>3</sub> utilizada, no siempre va a responder a una misma familia de plantas, sino al tipo de especie y al tipo de explante utilizado. Por lo tanto, se sugiere que el AG<sub>3</sub> mg L<sup>-1</sup> ayuda a la elongación celular

de los embriones somáticos ayudándolos a su desarrollo, como se pudo observar en la maduración de los ES de esta investigación.

#### **4.7 Aclimatación de plantas a condiciones *ex vitro*.**

La adaptación se llevó a cabo transfiriendo 60 plántulas (obtenidas a partir de embriones somáticos) a cilindros de foami agrícola de 4.3 x 5 cm cuidando de no maltratar las raíces de ahí se colocaron en una respectiva placa de unicel ya con sus orificio y se colocaron en un medio nutritivo y durante una semana permanecieron tapadas y a la segunda semana estas se les retiro la tapa obteniendo un porcentaje de sobrevivencia de las plántulas fue del 100% (Figura 2G).



Figura 2. Embriogénesis somática en *Agave marmorata* Roezl. A) Embrión cigótico emergiendo de la semilla a los 5 ddc. B. Desdiferenciación celular a los 9 ddc (flecha) C. Aspecto del callo a los 60 ddc D. Estructuras embriogénicas globulares a los 105 ddc (flechas) con  $0.1 \text{ Mg L}^{-1}$  donde el tratamiento previo fue con  $10 \text{ mgL}^{-1}$  de BA bajo condiciones de luz. E) Embriones somáticos a los 105 ddc bajo condiciones de oscuridad en el medio con  $3 \text{ mgL}^{-1}$  de  $\text{GA}_3$  F) Planta regenerada en el tratamiento con  $0.1 \text{ mgL}^{-1}$  de 2,4-D G) Vitro planta en etapa de adaptación a los 180 DDIC. Barra 1 cm

## 5. CONCLUSIONES

Se logro generar callo a través del medio propuesto por Nava-Becerrif y Arzate-Fernández, 2015, en *A.marmorata* Roehl.

Se logro formar estructuras embriogénicas con  $6.0 \text{ mgL}^{-1}$ ,  $10 \text{ mgL}^{-1}$  de BA y la combinación de 2,4-D Y BA ( $5.0 \text{ mgL}^{-1} + 6.0 \text{ mgL}^{-1}$  y  $5.0 \text{ mgL}^{-1} + 10 \text{ mgL}^{-1}$ ).

Se logro expresar las estructuras embriogénicas con  $0.1 \text{ mgL}^{-1}$  de 2,4-D bajo condiciones de luz y  $3 \text{ mgL}^{-1}$  de  $\text{GA}_3$  bajo condiciones de oscuridad

Se logro la adaptación a condiciones medio ambientales del 100 % de las plantas obtenidas mediante embriogénesis somática

## BIBLIOGRAFIA

Jiménez VM, Bangerth F (2001) Endogenous hormone concentrations and embryogenic callus development in wheat. *Plant Cell Tiss Org* 67:37–46. doi:10.1023/A:1011671310451

Sasaki K, Shimomura K, Kamada H et al (1994) IAA metabolism in embryogenic and non-embryogenic carrot cells. *Plant Cell Physiol* 35:1159–1164

Tianran L, Neumann KH (1985) Embryogenesis and endogenous hormone content of cell cultures of some carrot varieties (*Daucus carota* L.). *Ber Deut Bot Ges* 98:227–235. doi:10.1111/j. 1438-8677.1985.tb02915.x

Ivanova A, Velcheva M, Denchev P et al (1994) Endogenous hormone levels during direct somatic embryogenesis in *Medicago falcata*. *Physiol Plant* 92:85–89. doi:10.1111/j.1399-3054.1994.tb06658.x

Quiroz-Figueroa FR, Monforte-González M, Galaz-Avalos RM et al (2006) Direct somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. In: Loyola-Vargas VM, Vázquez-Flota FA (eds) *Plant cell culture protocols*, Humana Press, Totowa, New Jersey, pp 111–117. doi:10.1385/1-59259959-1:111

Rajasekaran K, Hein MB, Vasil IK (1987) Endogenous abscisic acid and indole-3-acetic acid and somatic embryogenesis in cultured leaf explants of *Pennisetum purpureum* Schum: effects in vivo and in vitro of glyphosate, fluridone, and paclobutrazol. *Plant Physiol* 84:47–51. doi:10.1104/pp.84.1.47

Rodríguez-Sanz H, Manzanera JA, Solís MT et al (2014) Early markers are present in both embryogenesis pathways from microspores and immature zygotic embryos in cork oak. *Quercus suber* L. *BMC Plant Biol* 14:224. doi:10.3389/fpls.2014.00393

Michalczuk L, Druart P (1999) Indole-3-acetic acid metabolism in hormone-autotrophic, embryogenic callus of Inmil® cherry rootstock (*Prunus incisa* x *serrula* 'GM 9') and in hormone-

dependent, nonembryogenic calli of *Prunus incisa* x *serrula* and *Prunus domestica*. *Physiol Plant* 107:426–432. doi:10.1034/j.1399-3054.1999.100408.x

Fujimura T (2014) Carrot somatic embryogenesis. A dream come true? *Plant Biotechnol Rep* 8:23–28. doi:10.1007/s11816-013-0295-y

Halperin W (1964) Morphogenetic studies with partially synchronized cultures of carrot embryos. *Science* 146:408–409. doi:10.1126/science.146.3642.408

Dudits D, Bögre L, Györgyey J (1991) Molecular and cellular approaches to the analysis of plant embryo development from somatic cells in vitro. *J Cell Sci* 99:473–482

Masuda H, Oohashi SI, Tokuji Y et al (1995) Direct embryo formation from epidermal cells of carrot hypocotyls. *J Plant Physiol* 145:531–534. doi:10.1016/S0176-1617(11)81783-9

Gliwicka M, Nowak K, Balazadeh S et al (2013) Extensive modulation of the transcription factor transcriptome during somatic embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE* 8:e69261. doi:10.1371/journal.pone.0069261

Barba-Espín, G. y Sánchez-Calvo, B. 2012. XIII Portuguese-Spanish Congress of Plant Physiology. Centro Hispano-Luso de Investigaciones Agrarias (CIALE). Universidad de Salamanca. 44 pp.

Nogueras, G.P. 2013. Embriogénesis somática y regeneración de plantas de *Medicago arborea* L.: Valoración como forrajeras. Departamento de Fisiología Vegetal. Facultad de Biología. Universidad de Salamanca. 172 pp.

Portillo L, Santacruz-Ruvalcaba F, Gutiérrez-Mora A et al (2007) Somatic embryogenesis in *Agave tequilana* Weber cultivar azul. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 43:569–575. doi:10.1007/s11627-007-9046-5

Phillips GC, Collins GB (1979) In vitro tissue culture of selected legumes and plant regeneration from callus cultures of red clover. *Crop Sci* 19:59–64. doi:10.2135/cropsci1979.0011183X001900010014x

Arzate-Fernández AM, Mejía-Franco R (2011) Capacidad embriogénica de callos inducidos en ejes embrionarios cigóticos de *Agave angustifolia* Haw. *Rev Fitotec Mex* 34:101–106

Monja-Mio KM, Robert ML (2013) Direct somatic embryogenesis of *Agave fourcroydes* Lem. through thin cell layer culture. *In Vitro Cell Dev-PI* 49:541–549. doi:10.1007/s11627-0139535-7

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473–497. doi:10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x

Bildwell, R.S.S., Fisiología vegetal, AGT.editor, Mexico, 1a.ed. 1979

Wareing, R.F y Phillips, I.D.J., The control of growth and differentiation in plants, Pergamon Press., L. T.D., Gran Bretaña, 1973

## **PAGINAS ELECTRONICAS CONSULTADAS**

[http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1027-152X2008000300006](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1027-152X2008000300006)

[http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1027-152X2008000300006](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1027-152X2008000300006)

<http://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/Cultivo%20de%20Tejidos%20en%20la%20Agricultura/capitulo13.pdf>

<https://www.repositoriodigital.ipn.mx/bitstream/123456789/6934/1/TESIS%20LUIS%20MARIO%20AYALA%20GUERRERO%202011.pdf>

[http://biblioteca.cucba.udg.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/5897/Banuelos\\_Castaneda\\_Oscar\\_Ivan.pdf?sequence=1](http://biblioteca.cucba.udg.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/5897/Banuelos_Castaneda_Oscar_Ivan.pdf?sequence=1)

<https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/507/html>

<http://sci-hub.tech/>

