



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN DE
CELULOSA SINTASA ASOCIADO A LA
PRODUCCIÓN DE FIBRA EN *Agave fourcroydes*.**

Tesis que presenta

María José García Castillo

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Biotecnología)

Mérida, Yucatán, México
2016

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



Por medio de la presente hago constar que el trabajo de tesis de **María José García Castillo**, titulado "EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN DE CELULOSA SINTASA ASOCIADO A LA PRODUCCIÓN DE FIBRA EN *Agave fourcroydes*.", fue realizado en los laboratorios de marcadores moleculares y genómica funcional de la Unidad de Biotecnología, del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., en la línea de Marcadores moleculares, bajo la dirección de Dr. Lorenzo Felipe Sánchez Teyer y la Dra. Cecilia Hernández Zepeda, dentro de la opción de Biotecnología, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Esta tesis tiene orientación al desarrollo socioeconómico de la región porque está orientada hacia la economía basada en conocimiento.

Atentamente:

Dr. Manuel Martínez Estévez
Director de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 01 de Diciembre de 2016

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Firma:



Nombre: María José García Castillo

AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT por la beca otorgada con número 591024/308188

Al proyecto de “Rejuvenecimiento mediante cultivo *in vitro*” con clave CB0049, que nos permitió elaborar la tesis.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán por brindarme la oportunidad de realizar la maestría en el laboratorio de marcadores moleculares y genómica funcional.

A mi director de tesis el doctor Felipe Sánchez Teyer por su asesoría, apoyo, guía, paciencia y confianza otorgada durante el desarrollo de este trabajo.

A mi coasesora la doctora Cecilia Hernández Zepeda por sus aportaciones sobre la tesis.

A mi comité tutorial por las indicaciones y aportaciones en la tesis.

A la Unidad de Materiales Poliméricos donde se me permitió realizar el análisis de cuantificación de fibra en el laboratorio del doctor Gonzalo Canché Escamilla, con el apoyo técnico del M. en C. Santiago Duarte Aranda.

Al laboratorio del doctor Felipe Vázquez Flota que me permitió realizar algunos análisis de la expresión relativa, a la M.C. Miriam Monforte González por hacer ameno el laboratorio y proporcionarme los equipos.

A la M. en C. Adriana Quiroz Moreno y al Dr. Antonio Rescalvo Morales por su apoyo técnico para la colecta del material vegetal.

Al técnico José Luis Herrera por su paciencia y apoyo técnico para la colecta del material vegetal

A la Dra. María Tamayo Ordoñez por su apoyo incondicional en la parte técnica y aportaciones en la tesis, por la ayuda brindada para mi crecimiento y en mi vida personal.

A la Dra. Yahaira Tamayo Ordoñez por su apoyo técnico de la tesis y por sus aportaciones.

A mis compañeros de laboratorio de marcadores moleculares y genómica funcional por hacer que en el desarrollo de la tesis haya sido en un ambiente agradable, divertido y ameno, gracias por sus comentarios y sugerencias en seminarios a mí amigo Gerardo, a Lau, Zamy, Eduardo y Gibran.

A mis compañeros de generación y mis amigos del alma, Sergio, Iné, Canseco, Mariela y Jenni, por todo su apoyo, ánimo y confianza en momentos importantes de mi vida.

A mi familia, a mi papá, a mi mamá, principalmente a mis hermanas por el apoyo siempre brindado, por comprender mi carrera y mis intereses personales y profesionales así como en los momentos más difíciles como mi estrés gracias a Alicia, Sarahih, Natalia y Victoria son parte de lo mejor de mi vida, así como mis hermosos sobrinos Marian, Monse, Víctor, Ethan y bb667.

Sobre todo gracias a mi compañero de vida José porque a pesar que no ha sido fácil siempre me has apoyado en todo sentido, por soportar mis histerias en momentos de tutorales y en la vida en general, gracias a mis dos amores, mis gemelas Victoria y Jimena, porque ustedes hacen que mis días sean aún más alegres y por qué me impulsan a que siga creciendo académica, profesional y personalmente.

DEDICATORIAS

A mi familia principalmente a José, Victoria y Jimena.

ÍNDICE

CAPÍTULO I	1
ANTECEDENTES	1
1.1. CLASIFICACIÓN DE FIBRAS NATURALES	3
1.1.1 COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LAS FIBRAS NATURALES.....	6
1.1.2 SÍNTESIS DE CELULOSA, HEMICELULOSA Y LIGNINA EN PLANTAS	10
1.1.4 GENES RELACIONADOS CON LAS SÍNTESIS DE LA PRODUCCIÓN DE FIBRA.....	10
1.1.5 EXPRESIÓN DE GENES QUE CODIFICAN PARA LA CELULOSA SINTASA Y SU RELACIÓN CON LA PRODUCCIÓN DE FIBRA EN PLANTAS.	15
1.1.6 IMPORTANCIA DE AGAVE SPP. EN LA PRODUCCIÓN DE FIBRA	18
1.1.7 LA INDUSTRIA DEL HENEQUÉN EN YUCATÁN.....	19
1.1.8 AGAVE UNA ALTERNATIVA PARA EL ESTUDIO DE GENES RELACIONADOS CON LA PRODUCCIÓN DE FIBRA	23
1.2 JUSTIFICACIÓN.....	25
1.3 HIPÓTESIS.....	26
1.4 OBJETIVOS.	27
1.5 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.	28

CAPÍTULO II

2. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE FIBRA EN <i>AGAVE FOURCROYDES</i> LEM.	29
---	----

2.1 INTRODUCCIÓN.....	29
2.2 MATERIALES Y METODOS	30
2.2.1 MATERIAL VEGETAL	30
2.2.2 CUANTIFICACIÓN DE FIBRA	32
2.2.3 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE HUMEDAD.....	32
2.2.4 DETERMINACIÓN DE EXTRAÍBLES (COMPUESTOS DE LA FIBRA).....	32
2.2.5 DETERMINACIÓN DE LIGNINA (KLASON)	33
2.2.6 DETERMINACIÓN DE HOLOCELULOSA (CELULOSA Y HEMICELULOSA)	34
2.2.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	35
2.3 RESULTADOS.	35
2.3.1 DETERMINACIÓN DEL PESO FRESCO, PESO SECO Y CONTENIDO DE CELULOSA EN PLANTAS DE DIFERENTES TAMAÑOS DE <i>AGAVE FOURCROYDES</i>.....	35
2.4 DISCUSIÓN	41
CAPÍTULO III.....	45
ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS CON LA PRODUCCIÓN DE FIBRA.....	45
3.1 INTRODUCCIÓN.....	45
3.2 MATERIALES Y METODOS.....	45
3.2.1 MATERIAL VEGETAL	45
3.2.2 EXTRACCIÓN DE ARN.....	45
3.2.3 TRATAMIENTO CON DESOXIRRIBONUCLEASA (DNASA I).....	46

3.3 SÍNTESIS DE ADNc	46
3.4 DISEÑO DE OLIGONUCLEOTIDOS DE GENES DE CELULOSA SINTASA.....	47
3.5 CLONACIÓN Y SECUENCIACIÓN.....	49
3.6 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO	49
3.7 PCR EN TIEMPO REAL (CUANTIFICACIÓN RELATIVA).....	50
3.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	52
3.9 RESULTADOS	52
3.9.1 AMPLIFICACIÓN DE FRAGMENTOS CORRESPONDIENTES AL GEN DE CELULOSA SINTASA (CESA).....	52
3.9.2 RELACIÓN DEL GEN CELULOSA SINTASA DE AGAVE FOURCROYDES CON OTRAS ACCESIONES DE PLANTAS.....	55
3.9.3 EVALUACIÓN DE TRANSCRITOS DE GENES PARCIALES CODIFICANTES DEL DOMINIO CELULOSA SINTASA EN PLANTAS DE <i>AGAVE FOURCROYDES</i>.....	56
3.10 DISCUSIÓN	58
CAPÍTULO IV	63
4 CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	67
BIBLIOGRAFÍA.....	69

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Esquema representativo para la clasificación de las fibras, de acuerdo a su origen de obtención.	1
Cuadro 1. . Ejemplos del uso de diferentes fibras naturales extraídas de diferentes especies de plantas.....	2
Cuadro 2. Especies representativas productoras de fibra.	5
Figura 2. Estructura química de la celulosa y características.	8
Figura 3. Matriz de la estructura de la lignina.....	9
Figura 4. Representación esquemática de la hipótesis sobre la biosíntesis de pared..	12
Figura 5. Genes seleccionados y analizados por tiempo real RT-PCR	16
Figura 6. Patrones de expresión por análisis de PCR en tiempo rea	17
Cuadro 3. Producción de henequén en México, del año 2000 al 2009.....	20
Figura 7. Superficie del henequén cultivado del año 1980 al 2009. Tomado de FAO, 2009	21
Cuadro 4. Ejemplos de genes de Agave con potencial biotecnológico industrial.....	23
Figura 8. Estrategia experimental del proyecto.	28
Figura 9. Plantas de <i>A. fourcroydes</i> seleccionadas en la colecta	31
Figura 10. Representación del área de colecta.	31
Tabla 1. Plantas seleccionadas de la colecta de material vegetal.	35
Figura 11. Imagen resumen del procedimiento para la obtención de Holocelulosa.	36
Figura 12. Representación esquemática de los parámetros evaluados en las hojas.....	39

Figura 13. Representación esquemática de porcentaje de agua en plantas de diferente tamaño.....	41
Tabla 2. Contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina (%) en diferentes especies de agave.....	42
Cuadro 5. Componentes para la síntesis de Cdna.....	47
Cuadro 6. Características de los cebadores.....	47
Figura 14. Alineamiento de secuencias parciales de genes celulosa sintasa en 10 especies de plantas.....	48
Figura 15. Curva de disociación del gen constitutivo 18S ADNr (A) y curva de disociación del gen CESA (B).....	51
Figura 16. Gel de electroforesis al 1% de agarosa.....	53
Figura 17. Cladograma del dominio celulosa sintasa en 26 accesiones de plantas.....	55
Figura 18. Expresión relativa de genes codificantes del dominio glicosil transferasa del gen CESA en plantas de <i>A. fourcroydes</i> de diferente tamaño.....	57
Figura 19. Nivel de transcripción de CESA en las diferentes etapas de la formación de la fibra en algodón.....	59
Figura 20. Incorporación de sacarosa en la pared celular.....	61
Figura 21. Modelo propuesto del comportamiento de genes CESA.....	65

ABREVIATURAS

ADNc: ácido desoxirribonucleico complementario

A.fourcroydes: *Agave fourcroydes*

ARN: ácido ribonucleico

CAM: metabolismo ácido de las crasuláceas

CESA: celulosa sintasa

CSL: proteína reguladora de genes

DPA: días post-antesis

Egra: *Eucalyptus grandis*

ExpA: alfa- expansina

ExpB: beta- expansina

Ext: extraíbles

FW: forward

GB: *Gossipium barbadense*

GH: *Gossipium hirsutum*

Ho: holocelulosa

NDP: nucleósido difosfatado

REV: reverse

Sus: sacarosa sintasa

TMD: dominio transmembrana

UDP: uridina difosfato

XYG: xiloglucano

RESUMEN

Agave Linnaeus, 1753 es un género que incluye alrededor de 166 especies distribuidas ampliamente en México. Dentro de este género se han descrito especies que presentan gran importancia comercial, tal como *Agave fourcroydes*, que se caracteriza por su alto contenido de fibra. A la fecha aún existe desconocimiento de cuáles son los factores moleculares que pueden estar involucrados en que ciertos genotipos de las especies de *Agave* presentan mejor producción y calidad de fibra. Sin embargo en algunas especies de plantas como el algodón (*Gossypium hirsutum*) y lino (*Linum usitatissimum*), se ha observado que la variación en el contenido de polímeros naturales (celulosa, hemicelulosa y lignina) puede estar relacionado con la calidad de fibra obtenida. En *A. fourcroydes* a pesar de que es una especie utilizada en la producción de fibra, se desconoce el comportamiento de los genes relacionados a la producción de polímeros, motivo por el cual en este trabajo analizamos el contenido de celulosa en plantas de *A. fourcroydes* de diferentes tamaños y también analizamos la expresión del gen de celulosa sintasa (CESA) encargado de la biosíntesis de celulosa. Los resultados indicaron que las plantas de mayor tamaño (139 cm) presentan un mayor contenido de celulosa, lo que correlaciona con una mayor expresión del gen CESA. Por su parte plantas de tamaño bajo y medio presentaron menos expresión del gen CESA (de 1 a 3 veces menos) en comparación a las plantas de mayor tamaño. Las variaciones encontradas respecto al tamaño de las plantas, el contenido de celulosa y la expresión del gen CESA, indican que posiblemente el fenómeno gigas y los factores ambientales pueden estar involucrados en el cultivo de esta especie juegan un papel primordial en el desarrollo de las plantaciones de *Agave* y posiblemente en su producción y calidad de fibra.

ABSTRACT

Agave Linnaeus, 1753 is a genus that includes about 166 species widely distributed in Mexico. Within this genus have been described species of great commercial importance, such as *Agave fourcroydes*, which is characterized by its high fiber content. To date, there is still a lack of knowledge about the molecular factors that may be involved in certain genotypes of *Agave* species presenting better production and fiber quality. However, in some plant species such as cotton (*Gossypium hirsutum*) and flax (*Linum usitatissimum*), it has been observed that the variation in the content of natural polymers (cellulose, hemicellulose and lignin) may be related to the obtained fiber quality. In *A. fourcroydes*, although it is a species used in the production of fiber, the behavior of the genes related to the production of polymers is unknown, reason why in this work we analyze the cellulose content in plants of *A. fourcroydes* Of different sizes and also analyzed the expression of the cellulose synthase gene (CESA) responsible for cellulose biosynthesis. The results indicated that the larger plants (139 cm) had a higher cellulose content, which correlated with a greater expression of the CESA gene. On the other hand, plants of low and medium size presented less expression of the CESA gene (1 to 3 times less) compared to the larger plants. The variations found with regard to plant size, cellulose content and CESA gene expression indicate that possibly the phenomenon gigas and environmental factors may be involved in the cultivation of this species play a major role in the development of plantations Of *Agave* and possibly in its production and quality of fiber.

INTRODUCCIÓN

Ante un panorama mundial de apertura de los consumidores a la utilización de fibras naturales, resulta oportuno impulsar su cultivo, transformación y uso. Sin embargo aún se desconocen algunos factores ó mecanismos involucrados en la formación de la fibra. En la literatura se han identificado a genes involucrados en la síntesis de la pared celular como expasina, glucanasa, sacarosa sintasa y celulosa sintasa. Este último codifica para la enzima responsable de la biosíntesis de celulosa, la cual actúa como una glucosil-transferasa que transfiere monómeros activando al extremo no reductor y se ha reportado que está relacionada con el engrosamiento de la pared celular en algunas especies de plantas productoras de fibra.

A. fourcroydes, es una planta monocotiledónea, del género de los *Agaves*, perteneciente a la familia de las *Agavaceae*. Yucatán es una zona de distribución en donde este *Agave* fue llamado "Ki". Fue domesticado en la época prehispánica por los mayas, debido a la utilidad de sus fibras. Es una planta productora de biomasa fibrosa y metabolitos esferoidales, que constituyen principios activos para la industria farmacéutica y agropecuaria (Infante, 2003). Existen esfuerzos que intentan insertar nuevamente al henequén en el escenario nacional y mundial. Para ello se requiere lograr competitividad en la producción, mediante la transferencia de tecnología, que permita a los productores hacer un manejo eficiente del *Agave* para reducir costos, aumentar el volumen de producción y garantizar la calidad.

En este trabajo abordamos el estudio de la expresión de genes de celulosa sintasa (CESA) de *Agave fourcroydes*, involucrados en la biosíntesis de la fibra. La información generada en este trabajo en un futuro podrá ser utilizada para establecer una relación entre la expresión de estos genes con la acumulación final del contenido de fibra, así como para la selección de plantas con mayor contenido de fibra.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1.1 CLASIFICACIÓN DE FIBRAS Y SU IMPORTANCIA COMERCIAL

En la industria textil, de acuerdo a Bhat *et al.* (1998), una fibra puede definirse como cualquier producto capaz de ser tejido o ser convertido a tela. Es la más pequeña unidad visible de producto textil. Entre las características que debe presentar están, el alto grado de finura, la flexibilidad, debe tener estabilidad dimensional y térmica, presentar los niveles mínimos de fuerza y la extensibilidad de acuerdo con el uso final.

Las fibras de acuerdo a su origen, pueden clasificarse en naturales y químicas (figura 1). Las fibras naturales, en su mayoría son de origen vegetal que es denominada como un conjunto heterogéneo de moléculas complejas, definiendo “aquellas fibras naturales renovables de origen vegetal o animal que se puedan transformar fácilmente en hilos para la fabricación de textiles” (FAO, 2009). Éstas se clasifican en celulósicas (origen vegetal), proteínicas (origen animal), o minerales.

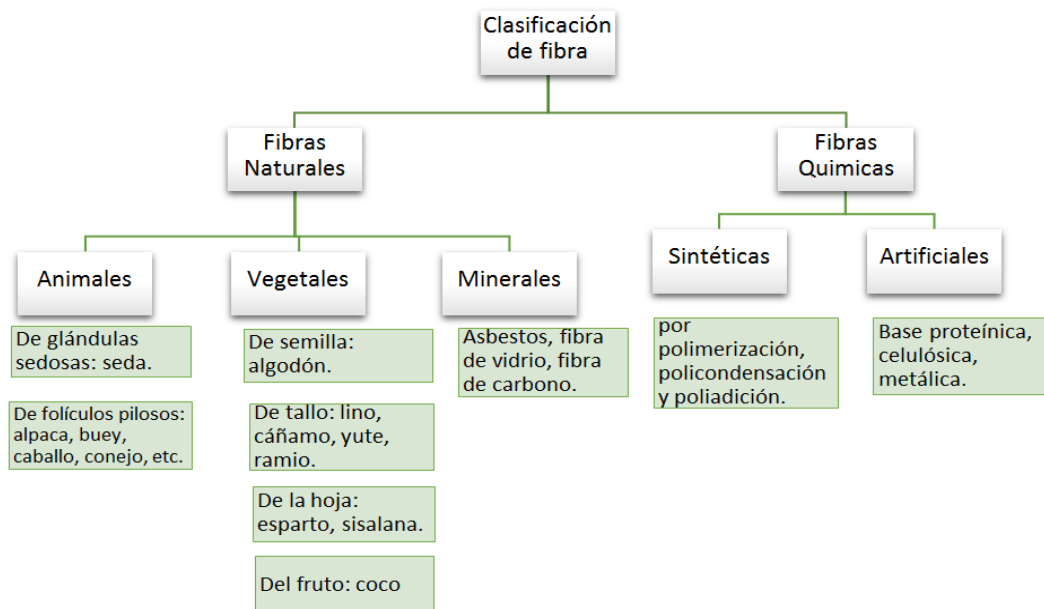


Figura 1. Esquema representativo para la clasificación de las fibras, de acuerdo a su origen de obtención.

Por su parte, además de las fibras vegetales, en la industria textil, también se utilizan las fibras químicas obtenidas por diferentes procesos. A diferencia de las fibras químicas, las fibras naturales son mejor fuente de materia prima para la elaboración de diferentes productos textiles (Cuadro 1). Estas fibras tienen muchas propiedades que las hacen una alternativa en la industria en la industria como la rigidez (Sherman, 1999), la resistencia al impacto (TH Sydenstricker, 2003) y la flexibilidad (K.C. Manikandan, 1996). Además, la materia prima para su obtención se encuentra disponible en grandes cantidades (D. Maldas, 1988), son renovables y biodegradables y presentan bajo costo de producción, baja densidad y no es necesaria la utilización de equipos de abrasión (K.C. Manikandan, 1996; G. Toriz, 2002).

Cuadro 1. Ejemplos del uso de diferentes fibras naturales extraídas de diferentes especies de plantas.

Tipo de fibra	Especie	Productos obtenidos	Bibliografía
Vegetal	<i>Agave fourcroydes</i> , <i>Agave lechuguilla</i> , <i>Agave americana</i> , <i>Agave salmiana</i> y <i>Agave mapisaga</i> .	Zapatos, muebles, bolsas, sombreros, tapetes, sogas, hilos y papel, entre otros	Parra-Negrete <i>et al.</i> , 2010;
	<i>Gossypium hirsutum</i> L y <i>Gossypium</i> spp.	Ropa y zapatos, entre otros	Rapp <i>et al.</i> , 2010; Rodríguez <i>et al.</i> , 2006
	<i>Boehmeria nivea</i> (L.). Gaud.	Ropa y zapatos, entre otros	Angelini and Tavarini, 2013.
Animal	<i>Ovis aries</i>	Ropa, bolsas muebles, tapetes, zapatos, entre otros	Rowe, 2009
	<i>Lama pacos</i> y <i>Lama glama</i>	Ropa, bolsas, muebles, tapetes, zapatos, entre otros	Rowe, 2009
	<i>Capra aegagrus hircus</i>	Ropa, muebles, tapetes y zapatos, entre otros	Rowe, 2009

Minerales	Asbestos, fibra de vidrio, fibra de carbono.	Vidrios, materiales para construcción de casas, tuberías, aislamiento de cables, cintas adhesivas, entre otros.	Oury <i>et al.</i> , 2014; Roggli and Sharma, 2014.
-----------	--	---	---

1.1.1 CLASIFICACIÓN DE FIBRAS NATURALES

En las células vegetales existen diferentes tejidos como la epidermis, el parénquima, el colénquima y el esclerénquima. En este último se encuentran las fibras que son largas y han engrosado considerablemente a las paredes secundarias celulares, presentando composición alta de celulosa y lignina (Raff *et al.*, 2002; Jin *et al.*, 2006).

Dentro de la clasificación vegetal se encuentra una subclasificación de las fibras, distinguiendo las que se producen en la madera y las que se producen en otros lugares. Estas últimas se llaman fibras del líber, que se clasifican en dos tipos: las que tienen paredes celulares lignificadas y las que tienen paredes celulares de celulosa, las cuales se valoran comercialmente y pueden alcanzar longitudes de varios metros. Una gran variedad de plantas como el sisal, el yute, el cáñamo, el ramio, el henequén, el maguey, la palma, el cocotero, latona, esparto, entre otros., son utilizadas para la obtención de fibras (Schooley, 1997).

Entre las fibras celulósicas encontramos una clasificación de acuerdo al lugar de la planta a partir de la cual es extraída (Bikales, *et al.*, 1985). Presentándose tres grandes grupos: 1) obtenidas a partir de semillas, 2) las fibras extraídas de la corteza de los árboles y 3) las fibras obtenidas de las hojas.

La obtención de la fibra a partir de diferentes partes de la planta, dependerá en gran medida de la especie de planta y de la importancia económica que represente la especie de estudio para el país. Por ejemplo, a nivel mundial la especie de *Gossypium* spp. (algodón) representa una especie de alto valor comercial (Ali *et al.*, 2008; Rapp *et al.*, 2010). Por su parte en los países de África occidental, *Corchorus capsularis* (yute) en Bangladesh y el *Agave sisalana* (sisal) en Tanzania, representan un alto valor comercial (FAO, 2009).

Entre las especies productoras más importantes de fibra vegetal se encuentran el algodón (*Gossypium hirsutum*), el ramio (*Boehmeria nivea*), el lino (*Linum usitatissimum*), el coco (*Cocos nucifera*), el yute (*Corchorus capsularis*) y el Agave (*A. sisalana*), entre otros. Cada una de estas especies de plantas ha demostrado poseer diferentes porcentajes de celulosa por encima del 60% (Cuadro 2).

A continuación se describe algunas características de las fibras vegetales obtenidas a partir de cada especie de planta.

- El ramio (*Boehmeria nivea*), ha sido conocido y utilizado por muchos siglos en China y Japón. La fibra que de él se obtiene es una de las más antiguas que se conocen; es de color blanco puro y presenta características de gran durabilidad, longitud, resistencia y un lustre similar al de la seda. Pertenece a la clasificación de las fibras blancas, que al igual que el lino, el cáñamo y el yute provienen del líber de los tallos de las plantas. Al observar la fibra de ramio al microscopio se observa que sus características son muy similares a las del lino (Ramírez, 2009; Hollen *et al.*, 1992). Actualmente, esta fibra se utiliza para la confección de vestimentas, telas, tapicería, sabanas, redes de pescar, sogas, cordeles y la fabricación de papel (Ramírez, 2009).
- El algodón (*G. hirsutum*), es una planta perteneciente al género *Gossypium*, de la familia de las malváceas y tribu de las hibísceas. Existe una multitud de especies y variedades descritas para este género. Es la fibra que más calidad textil tiene en su estado natural y no existe otra fibra con tan mínimas exigencias de manufactura para ser incorporada a nuestro vestido. Los principales consumidores de algodón son China, Estados Unidos, Pakistán y Europa.
- El lino (*Linum usitatissimum*), la fibra presenta color blanquecido, rubio, tostado o gris cálido acerado. Al igual que el algodón, se compone principalmente de celulosa. La resistencia a la rotura de la fibra de lino es casi el doble que la de algodón y presenta buena conducción al calor (Kymalainen *et al.*, 2004; Rennebaum *et al.*, 2002).

- El yute (*Corchorus capsularis*), la fibra presenta una longitud de 1 a 4 metros y un diámetro de entre 17 a 20 micras, su textura es blanda y brillante. Las fibras generalmente están compuestas primordialmente de celulosa (principal componente de las fibras vegetales) y lignina (componentes principales de las fibras leñosas) (Del Rio *et al.*, 2009; Sinha *et al.*, 2009; Islam and Sarkanen, 1993). Las fibras pueden extraerse mediante procesos de enfriado tanto biológicos como químicos.
- Fibras de *Agave*. Las fibras de agave están situadas longitudinalmente en las hojas, siendo más abundantes cerca de la superficie de la hoja. Las hojas contienen alrededor de un 90% de humedad, pero la pulpa carnosa es muy firme y las hojas son rígidas. La fibra tiene que ser extraída de las hojas apenas cortadas, para evitar el riesgo de que se produzcan daños durante el proceso de limpieza una vez secas. La extracción de la fibra se hace raspando el material pulposo, generalmente mediante un proceso de descortezado mecánico y arrancándolo manualmente. Luego de la cosecha, sus hojas se cortan y aplastan para separar la pulpa de las fibras. De acuerdo a lo descrito por Mayorga-Hernández *et al.* (2004), las propiedades físicas y mecánicas de las fibras son uniformes en la sección media, y la morfología de la fibra de henequén es similar a la de otras fibras duras naturales como el sisal, yute, abacá, etc. (Cazaurang, 1991).

Cuadro 2. Especies representativas productoras de fibra.

Nombre científico	Nombre comercial	% Base húmeda	% Componentes	Bibliografía
<i>Gossypium hirsutum</i>	Algodón	3.1%	Celulosa 91% Agua 8 % Proteína 0.52% Grasas 0.35% Cenizas 0.13%	Rodriguez, 2006
<i>Boehmeria nivea</i>	Ramio	7.5%	Celulosa 86.5% Lignina 0.54% Pentosanos 4.03% Ceras y Grasas 0.32%	Sing, 2006

			Cenizas 1.5%	
<i>Linum usitatissimum</i>	Lino	11.5%	Celulosa 70% Materias peptídicas 20% Grasa y Cera 6%	Fedeniuk <i>et al</i> , 1994
<i>Corchorus capsularis</i>	Yute	12.5%	Celulosa 63.2% Lignina 24.4% Agua hidroscoptica 9.9% Grasa y cera 0.39% Ceniza 0.68% Extracto acuosa 1.03%	Rodriguez, 2006
<i>Agave fourcroydes</i>	Henequén	4.6%	Celulosa 77% Humedad 4.6 % Lignina y pectina 3.1% Estratos 3.6% Ceniza 1.1%	Himmerfarb, 1957
<i>Agave sisalana</i>	Sisal	12%	Celulosa 72 % Hemicelulosa 13% Lignina 11% Pectina 1% Cera 3 %	Medina, 1959

1.1.2 COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LAS FIBRAS VEGETALES

Entre los principales componentes químicos de la fibra se encuentran la celulosa y la lignina. A continuación se describen algunas características principales de estos compuestos:

CELULOSA

La celulosa forma parte fundamental de la estructura básica de las células de las plantas, siendo el principal componente de sus paredes celulares (Ott, E., 1963). Cuando

las fibras son cosechadas en plantas jóvenes, menor habrá sido su grado de maduración y por tanto menor será su contenido de celulosa y mayor la cantidad de agua presente en la fibra (Bourne, G. y Danielli. J., 1984). La estructura química de la celulosa está formada por cientos y hasta miles de monómeros de β -glucosa. Entre algunas características fisicoquímicas de la celulosa están que es un polisacárido insoluble en agua, rígido y de peso molecular variable, cuya fórmula empírica es $(C_6H_{10}O_5)_n$, con un valor mínimo de $n=200$ (Figura 2A). Por su parte la estructura de la β -glucosa es de un anillo hexagonal con 5 átomos de carbono y uno de oxígeno, y con un grupo $-CH_2$ OH unido al carbono 5. El grupo $-OH$ del carbono 1, determina la posición β . La unión de moléculas de β -glucosa se da enlaces β 1-4 glucósidicos, como se muestra en la figura 2B.

La celulosa es sintetizada en el exterior celular por la celulosa sintasa, una proteína localizada en la membrana plasmática. Esta enzima recoge unidades de glucosa desde el citosol y las enlaza en el exterior de la célula, determinando en el proceso la orientación de las moléculas que se van sintetizando formando a su vez filamentos largos y delgados de celulosa denominados microfibrillas, estas agrupan aproximadamente a 50 moléculas. Tienen un espesor de aproximadamente 10 a 25 nm y proveen a los tejidos vegetales de resistencia a tensiones mecánicas, tanto de estiramiento como de presión (Casey, 1991).

Estas microfibrillas a su vez, se asocian entre sí mediante puentes formados por otros glúcidos, como hemicelulosa y pectinas, que dan como resultado las fibras de celulosas (Lamoureux, 2007).

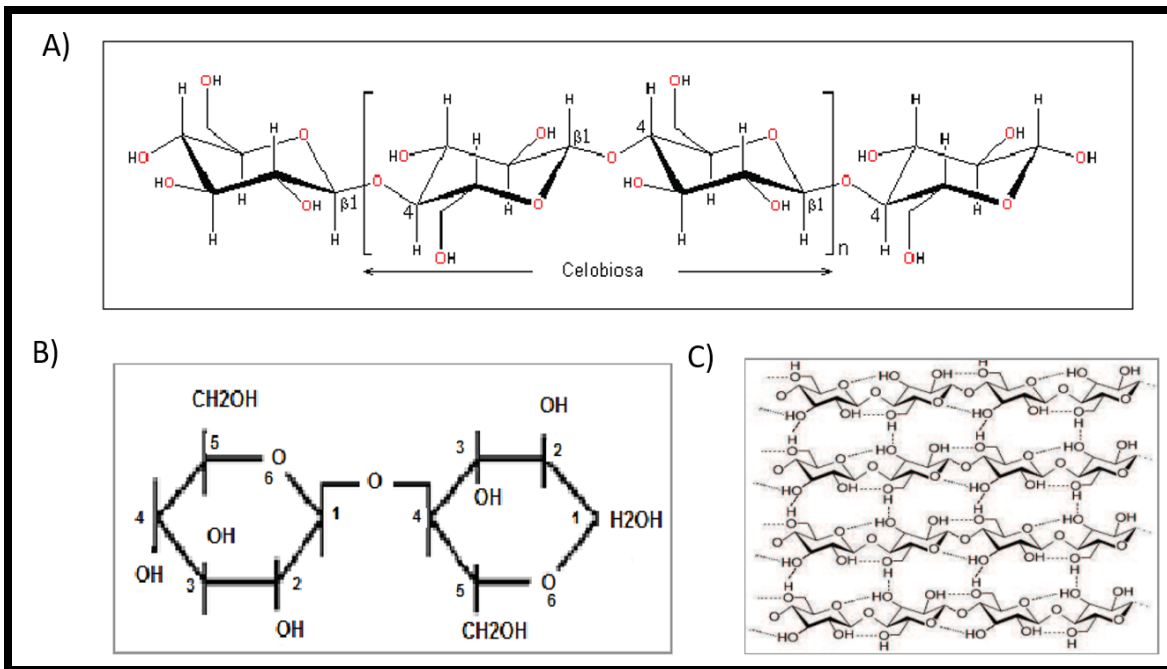


Figura 2. Estructura química de la celulosa y características. A) Estructura química de la celulosa, B) Enlace β 1-4 glucosídico y C) Enlaces de hidrógeno entre cadenas contiguas de celulosa. (Tomado y modificado de Chaplin, 2008 y Gilman, 2002).

Estudios basados en varios métodos físicos y químicos han indicado que las microfibrillas contienen dos regiones claramente diferenciadas. Una región está formada por moléculas de celulosa altamente ordenadas, que se denomina zona cristalina, la cual se puede apreciar en la figura 2C y otra parte que consiste en moléculas de celulosa notablemente menos ordenadas que se denomina región amorfa (Textil Institute, 1954; Hans, 1996).

El efecto del grado de orden o cristalinidad sobre las propiedades de una fibra celulósica, tales como la tenacidad, la elongación y la elasticidad, están estrechamente relacionadas con la cantidad y las características estructurales en las fibras. Existen estudios que revelan que para las fibras de algodón como una orientación fibrilar constante, la elongación a la ruptura aumenta con el decrecimiento de los grados de cristalinidad. Por otro lado, a las áreas amorfas se las asocia con las características de hinchamiento y reactividad. (Hans, 1996)

LIGNINA

Las ligninas son polímeros mixtos, formados por moléculas grandes ramificadas y resistentes, que proporcionan rigidez a la pared celular y protección tanto al ataque de sustancias químicas como a la de acción de microorganismos, impidiendo la penetración de enzimas destructivas. Actúan como el constituyente intracelular incrustante de las células fibrosas de los vegetales que funciona prácticamente como relleno para impartir la rigidez al tallo de la planta, tornándolo resistente a impactos, compresiones y flexiones. Además posee un importante papel en el transporte interno de agua, nutrientes y metabolitos (Basaure, 2005; McCrady, 2008).

La molécula de lignina, es una estructura tridimensional no definida (figura 3), formada por la unión aleatoria de radicales de ácidos y alcoholes fenilpropílicos (cumarílico, coniferílico y sinapílico), confiriendo un elevado peso molecular (Mohanty, 2005).

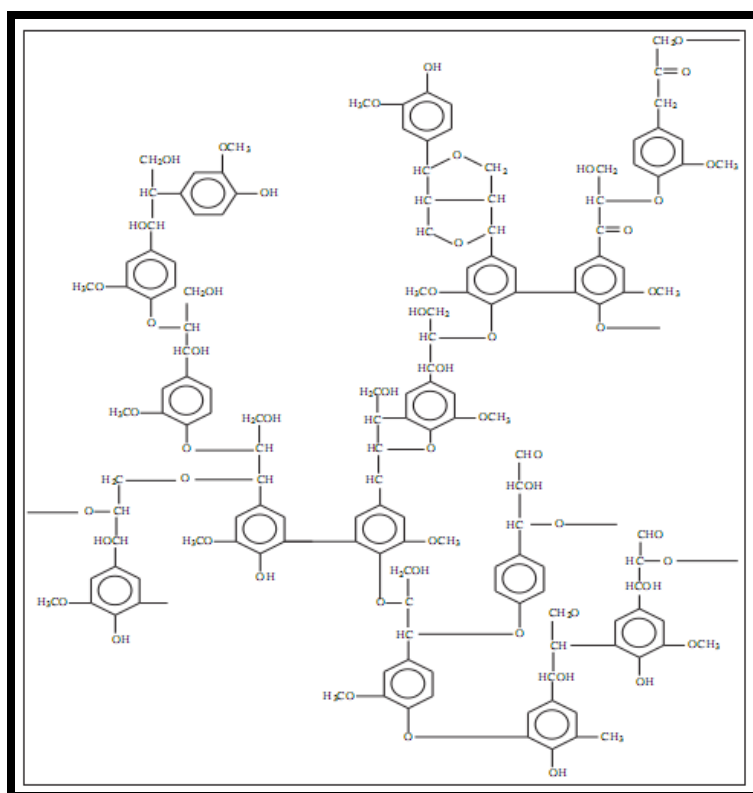


Figura 3. Matriz de la estructura de la lignina. Tomado de (Chaplin, 2008)

1.1.3 SINTESIS DE CELULOSA, HEMICELULOSA Y LIGNINA EN PLANTAS

Se ha descrito que la celulosa, hemicelulosa y lignina, son compuestos que forman parte de la pared celular. La pared celular en general se compone de microfibrillas de celulosa cristalina contenidas en una matriz hidrófila de polisacáridos (hemicelulosa y pectina), con cantidades pequeñas de proteínas estructurales intercalados en la matriz (Carpita y Gibeaut 1993, McCann y Roberts 1994, Cosgrove 1997).

La pared celular posee resistencia a la tracción para soportar el estrés físico de alta presión generada por la turgencia celular. La elongación celular y la expansión determinan la forma celular y contribuyen a la respuesta o adaptación de las células a las condiciones ambientales (Cosgrove, 2000). Por lo tanto, las paredes celulares deben ser extensibles y la celulosa, la hemicelulosa y la pectina, juegan un papel importante en la flexibilidad de la pared celular. El control de células cada vez es mayor en el alargamiento ó expansión de la pared de una manera que mantiene las características aparentemente contradictorias de fuerza y extensibilidad estructural (plasticidad). El relajamiento de la pared celular es un proceso en el que la red de microfibrillas de celulosa-hemicelulosa se reordena (Cosgrove, 1997), es esencial para los cambios en la forma celular y se produce vinculado con la síntesis de la pared. Aunque los mecanismos de relajamiento de la pared han sido relativamente bien caracterizados (Cosgrove 1997, Cosgrove, 2000), los mecanismos de la síntesis de la pared celular son poco conocidos. La síntesis de los componentes de las paredes celulares se resume en la figura 4 y los genes implicados en la síntesis de estos componentes se describen en las siguientes secciones.

1.1.4 GENES RELACIONADOS CON LA SINTESIS DE LA PRODUCCIÓN DE FIBRA

En plantas, el desarrollo de las células puede implicar cambios en el nivel de expresión de genes para la producción de proteínas (Delmer *et al*, 1985), que se requieren para el relajamiento de la pared celular y la síntesis de celulosa. Hay cambios marcados en el patrón de ARNm traducibles asociados con la transición de la síntesis de la pared primaria a la secundaria (Delmer *et al*, 1985). Por lo tanto, la regulación entre la

elongación celular y la deposición de celulosa durante el desarrollo puede ocurrir en muchos niveles con el aumento y la disminución de los niveles de proteínas.

En la figura 4, Se puede observar que los polisacáridos de la pared se sintetizan en dos compartimentos celulares. La celulosa y calosa (no mostrado) se sintetiza en la membrana plasmática. 4 **(a)** Las rosetas se mueven en el plano de la membrana, guiada por los microtúbulos corticales, la producción de microfibrillas de celulosa en la pared que tienen la misma orientación que los microtúbulos en el citosol (Paredes *et al.*, 2006) 4 **(b)** Se cree que cada roseta hexamérica comprende seis subunidades y cada subunidad contiene seis proteínas CESA, proporcionando un total de treinta y seis proteínas de celulosa sintasa (CESA) por roseta, Cada proteína CESA se predice que atraviesa la membrana a través de ocho dominios transmembranales, con el extremo N-terminal, el C-terminal y el sitio activo frente al citosol. La cadena de glucano creciente se cree que se mueve a través de un canal de la membrana a la pared, donde se une con otras cadenas de glucano para formar las microfibrillas. 4 **(c)** Los polisacáridos de la matriz se sintetizan en el aparato de Golgi antes de la deposición en las vesículas secretoras que los entregan a la superficie de la célula. Las cadenas principales de algunos polisacáridos de hemicelulosa, son sintetizados por las proteínas de CSL que muestran similitud de secuencia con las proteínas CESA. 4 **(d)** La topología de las proteínas reguladoras de genes (CSL) no se conoce, pero dos posibilidades se muestran: Si las proteínas CSL utilizan donantes de azúcar activados (NDP) presentes en el lumen de Golgi, entonces el modelo se muestra en la parte superior de (d). Si las proteínas CSL operan de la misma manera como las proteínas CESA, a continuación, el modelo se muestra en la parte inferior de (d), y en una vista ampliada en 4 **(e)** se cree que las sintasas del glucano forman complejos con glicosiltransferasas que añaden cadenas laterales al polímero (parte inferior de (d)). Tal organización en un complejo podría ser especialmente importante para la síntesis de polisacáridos tales como XYG, que tiene un patrón regular de sustitución de la cadena lateral TMD (dominio transmembrana).

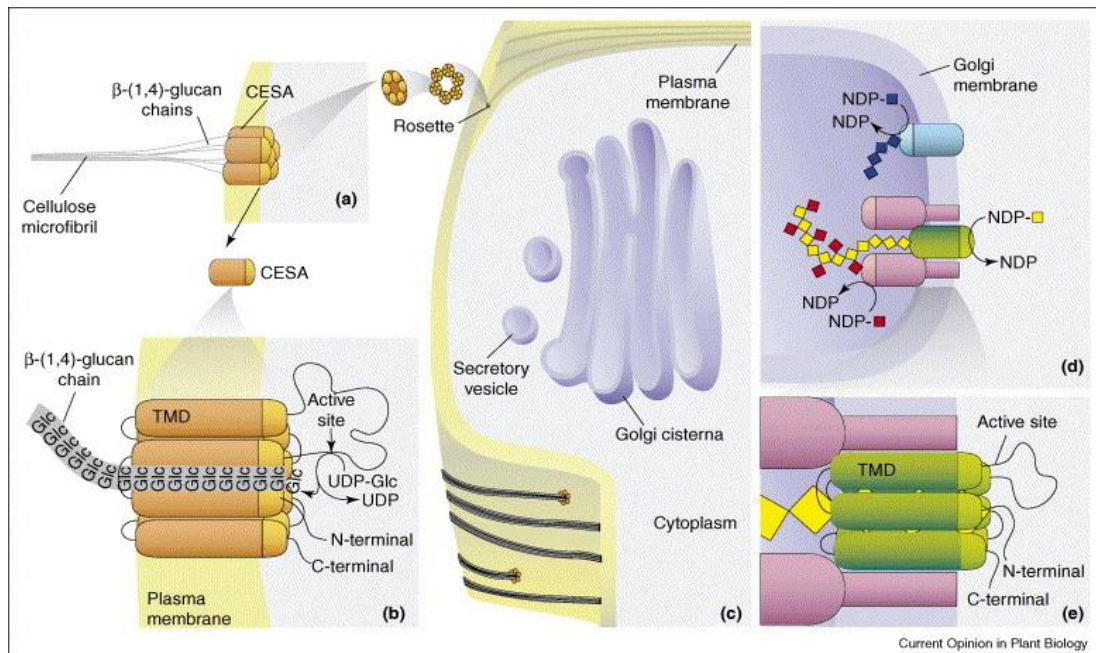


Figura 4. Representación esquemática de la hipótesis sobre la biosíntesis de pared. (Tomado de Lerouxel *et al.*, 2006).

Las enzimas reportadas con relación a los mecanismos de síntesis a la pared celular son las glucanasas, las expansina, la endoxiloglucano transferasa, la sacarosa sintasa y la celulosa sintasa (Hasegawa *et al.*, 1994). Estas enzimas tienen un papel muy importante en el relajamiento de la pared celular durante la elongación celular y están estrechamente asociadas con la síntesis masiva de celulosa. A continuación definimos la reacción que cataliza cada enzima.

GLUCANASAS. Las glucanasas son enzimas que degradan β -glucanos y se clasifican en dos grandes grupos según los mecanismos que utilizan para hidrolizar el sustrato, identificados por los productos de hidrólisis: (i) las *exo- β -glucanasas*, las cuales hidrolizan el sustrato por ruptura secuencial de residuos de glucosa desde el extremo no reductor, y (ii) las *endo- β -glucanasas*, que rompen aleatoriamente los sitios de enlace b de la cadena polisacáridica, liberando pequeños oligosacáridos (Gonzalez *et al.*, 2011). Estudios genéticos han indicado que la *endo-1-3- β -glucano* presentes en las fibras de algodón se acumulan a nivel máximo justo antes de la síntesis masiva de celulosa de la pared

secundaria (Jaquet *et al.* 1982). Adicionalmente, la endo-1-4- β -glucanasa probablemente pertenece a la familia E del álamo (Nakamura *et al.*, 1995) y su actividad puede ser responsable de la solubilización de xiloglucano (hemicelulosa) en la pared primaria, que pueden estar asociados con la auxina la cual induce la elongación celular en plantas (Hayashi, 1989).

EXPANSINAS. La expansina (EXPA) tiene dos grandes familias de genes que se han descubierto en las plantas, denominadas α -expansinas (dado al gen el símbolo EXPA) y β -expansinas (EXPB). Ambas familias de expansinas se han identificado en una gran variedad de plantas de angiospermas y gimnospermas, de helechos y musgos (Cosgrove *et al.*, 2000). Aunque estas dos familias de expansinas tienen una identidad de aminoácidos sólo alrededor del 20%, son similares en tamaño, pero comparten una serie de motivos conservados y tienen actividades similares en la pared (Cosgrove *et al.*, 1997). Adicionalmente, otras dos subfamilias se han identificado: γ -expansinas, que fueron descritos por primera vez en *Arabidopsis* y las δ -expansinas, que fueron identificados en el arroz y se ausentan en *Arabidopsis*. Ambas son versiones truncadas de α - y β -expansinas. Las γ -expansinas representan la mitad amino-terminal de una expansina madura y las δ -expansinas la mitad hacia el extremo carboxilo terminal de una β -expansina. Aún no se han definido papeles funcionales para γ y δ -expansinas, aunque los datos recientes indican un rol de señalización para las γ -expansinas y se ha propuesto que el medio carboxilo terminal de las expansinas canónicas comparte similitud con los dominios de unión a celulosa (Shcherban *et al.*, 1995), por lo que parece probable que las δ -expansinas interactúen con componentes de la pared (Yi li *et al.*, 2003). La expansina puede funcionar para relajar y elongar la pared a través de un mecanismo que interrumpe uniones hidrógeno, no sólo potencialmente entre las microfibrillas de celulosa sino también entre el xiloglucano y la celulosa (Mc-Queen- Mason y Cosgrove 1994). Estudios recientes han demostrado que inducen la relajación de esfuerzo y la extensión de las paredes celulares aisladas de una manera dependiente del pH (McQueen-Mason *et al.*, 1992,1995). No hay otras proteínas con esta actividad (Cosgrove *et al.*, 1994, 1999). Los genes de expansina se expresan en el momento adecuado y en el lugar adecuado para funcionar en el crecimiento de control (Cho *et al.*, 1997, Vriezen *et al.*, 2000, Hutchison *et al.*, 1999, Reinhardt *et al.*, 1998, Orford *et al.*, 1998, Shimizu *et al.*, 1997), por su parte la reducción de la expresión de genes expansina por métodos antisentido inhibe el crecimiento (Cho *et al.*, 2003).

ENDOXILOGLUCANO TRANSFERASA. El endoxiloglucano transferasa pertenece al grupo EXT de proteínas de xiloglucano transferasa basado en el dendrograma en el método UPGMA (Nishitani 1995). Puede participar en la reconstrucción de las redes de xiloglucano – celulosa en las paredes de células de plantas que crecen.

SACAROSA SINTASA. (SUS) Involucrada en la síntesis de glucosa-UDP, celulosa y callosa, suministrando los residuos de glucosilo de la sacarosa en la membrana plasmática (Amor *et al.* 1995).

CELULOSA SINTASA. La celulosa sintasa (CESA) es la enzima encargada de la biosíntesis de celulosa. Actúa como una glucosil- transferasa que transfiere monómeros activando al extremo no reductor. Se ha reportado que está relacionada con el incremento de la pared celular en Lino (*Linum usitatissimum*) (D.V galinously *et al.*, 2014) al igual que en la formación de la pared celular en algodón (Ryan, A.R *et al.*, 2010). La secuencia del genoma en *Arabidopsis* ha revelado que tiene 10 genes CESA que codifican proteínas con una identidad de secuencia del 64% (Holland *et al.* 2000, Richmond 2000). El maíz tiene al menos 12 genes CESA (Appenzeller *et al.*, 2004), la cebada contiene al menos 8 (Burton *et al.* 2004), y el álamo tiene al menos 7 (Joshi *et al.* 2004). Al parecer, todas las plantas superiores tienen un conjunto similar de estos genes. La celulosa sintasa está regulada después de la traducción y se sabe que es fosforilada, sin embargo los mecanismos que regulan su actividad aún no se conocen (Somerville, 2006). Se han identificado que estos genes están asociados con diferentes etapas del desarrollo de la planta, tales como elongación (Shani *et a.*, 1997, Hayashi *et al.*, 1994), la maduración (Tucker *et al.*, 1987, Lashbrook *et al.*, 1994, Cass *et al.*, 1990, Fischer *et al.*, 1991) y abscisión (Tucker *et al.*, 1987, Tucker *et al.*, 1991, Kemmerer *et al.*, 1994, De silva *et al.*, 1993).

1.1.5 EXPRESIÓN DE GENES CELULOSA SINTASA Y SU RELACIÓN CON LA PRODUCCIÓN DE FIBRA EN PLANTAS

A continuación se describen algunas tendencias observadas respecto a la expresión del gen de celulosa sintasa y cuál podría ser su posible relación con la producción de fibra en plantas.

En el modelo *Gossypium hirsutum* L (algodón), su fibra es extraída a partir de sus semillas las cuales se caracterizan por su largos tricomas epidérmicos unicelulares. En esta especie sus fibras se diferencian del tegumento exterior de 2 a 3 días antes del proceso de antesis (DPA). Posteriormente las células de fibra entran en una etapa de elongación rápida durante el DPA que dura alrededor de 20 días. Se ha observado que la mayor cantidad de celulosa se detecta a los 15 días de DPA, esto debido a que existe una gran síntesis de celulosa por el engrosamiento de la célula y las fibras de algodón forman parte de la pared celular secundaria. Adicionalmente se ha reportado una etapa final la cual comprende de 45 a 60 días de DPA, observando en esta que la fibra se somete a deshidratación y maduración (Applequist *et al.*, 2001; Kim and Triplett, 2001). De acuerdo a lo reportado por Guo *et al.*, (2009), se ha demostrado que tres genes codificantes de celulosa sintasa aislados en *Gossypium hirsutum* L. incrementan su expresión a los días 12, 15 y 18, alcanzando mayores niveles de expresión en el día 18, mientras que del día 1-9 no se observa la expresión de éstos (figura 5). Esto sugiere la importante participación del gen celulosa sintasa para la producción de fibra en algodón.

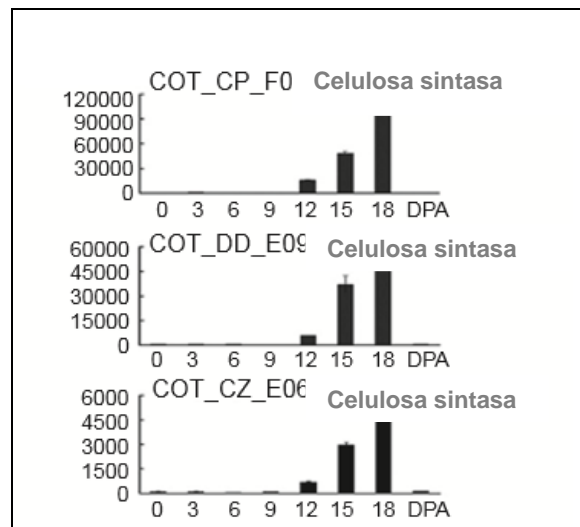


Figura 5. Genes seleccionados y analizados por tiempo real RT-PCR, (tomado y modificado de Gou., *et al*, 2007)

Li *et al.*, (2013), identificaron seis isoformas del gen CESA en *Gossypium hirsutum* y *Gossypium barbadense*, llamados GhCESA1–GhCESA10. Los análisis de co-expresión indicaron que CESA1, CESA2, CESA7, and CESA8 fueron las isoformas que presentan una mayor expresión durante la etapa de biosíntesis de la pared secundaria (figura 6). Por su parte las isoformas CESA3, CESA5, CESA6, CESA9, y CESA10 demostraron estar involucradas en procesos relacionados a la formación de la pared primaria para la iniciación de la fibra de algodón y en su elongación.

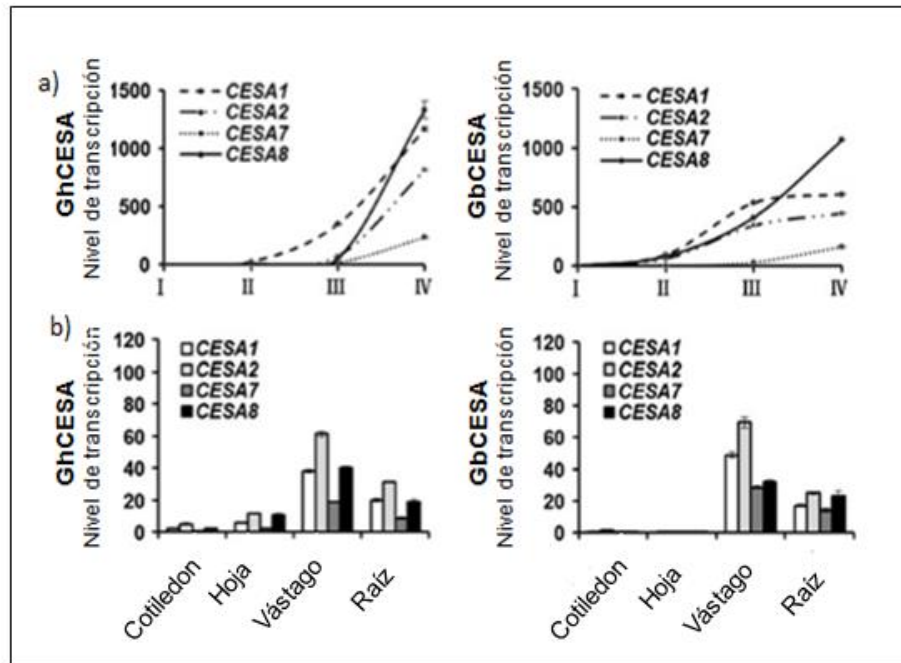


Figura 6. Patrones de expresión por análisis de PCR en tiempo real, CESA 1, 2, 7, 8 a) nivel transcripción de CESA en fibras de algodón. b) nivel de expresión de CESA en tejidos no fibrosos. (Tomado y modificado de Li *et al.*, 2013)

Por su parte, en *Eucalyptus grandis*, se ha reportado la expresión de tres genes de celulosa sintasa (EgraCesA1, EgraCesA2, and EgraCesA3) en células del xilema los cuales están relacionados con la biosíntesis de pared secundaria, de manera similar a lo descrito en *Gossypium* spp. (Lu *et al.*, 2008)

Finalmente la función de los diferentes genes pertenecientes a la familia de celulosa sintasa también ha sido reportada en *Arabidopsis*, maíz y álamo. En *Arabidopsis* se han identificado 10 genes nombrados AtCesA1 a AtCesA10 (Richmond and Somerville, 2000). AtCesA1, AtCesA3, y AtCesA6 han demostrado ser requeridos en la síntesis de pared primaria (Arioli *et al.*, 1998; Scheible *et al.*, 2001; Beeckman *et al.*, 2002; Burn *et al.*, 2002; Desprez *et al.*, 2002; Doblin *et al.*, 2002; Zhong *et al.*, 2003). Por su parte AtCesA4, AtCesA7, and AtCesA8 al parecer participan en la biosíntesis de la celulosa de la pared

secundaria (Taylor *et al.*, 1999, 2000, 2003; Gardiner *et al.*, 2003), y finalmente aún se desconocen las funciones de AtCesA2, AtCesA5, AtCesA9 y AtCesA10.

En maíz se han reportado 12 genes CESA (Appenzeller *et al.*, 2004). Mediante análisis filogenéticos, se ha demostrado que los genes ZmCesA10, ZmCesA11, y ZmCesA12, son homólogos a los genes AtCesA4, AtCesA7, y AtCesA8, lo que sugiere su posible participación en la formación de la pared secundaria. Por su parte en álamo se ha identificado que los genes PtrCesA1, PtrCesA2, y PtrCesA3 se encuentran involucrados en la formación de la pared secundaria; los PtrCesA4, PtrCesA5, PtrCesA6, y PtrCesA7 se relacionan con la biosíntesis de la pared primaria (Joshi *et al.*, 2004).

Con base en lo anterior, se puede sugerir que durante la producción de fibra en plantas, el gen CESA que codifica para la enzima celulosa sintasa, tiene un papel fundamental y ha demostrado estar involucrado en funciones que implican la formación de la pared celular primaria y secundaria.

1.2 IMPORTANCIA DE *Agave* spp. EN LA PRODUCCIÓN DE FIBRA

El henequén (*Agave fourcroydes*) es una planta monocotiledónea, del género de los *Agaves*, perteneciente a la familia de las Agavaceae. Yucatán es una zona de distribución en donde este *Agave* fue llamado “Ki”. Fue domesticado en la época prehispánica por los mayas, debido a la utilidad de sus fibras. Es una planta productora de biomasa fibrosa y metabolitos esféricos, que constituyen principios activos para la industria farmacéutica y agropecuaria (Infante, 2003). La amplia gama de productos que se obtiene del henequén ha ganado en importancia y en el futuro cercano serán producciones codiciadas y sostenibles, a fin de reducir la alta contaminación de los plásticos y otros productos sintéticos dañinos al ecosistema (González, 2004).

Anteriormente existían siete variedades cultivadas de henequén en Yucatán (Gentry's 1982), sin embargo, actualmente solo existen tres: Sac ki (henequén blanco), Yaax ki (henequén verde) y Kitam ki (henequén jabalí). El cultivo de Sac ki o henequén blanco ha sido el más difundido en las plantaciones, por la calidad de su fibra (Gentry's 1982), en tanto que el Yaax ki es de menor calidad y rendimiento y se encuentra en

peligro de extinción (Colunga-Marín, 1997), debido a que fue dejado de cultivar, aunque es más recomendable para la fabricación de bebidas destiladas, debido a que posee un aroma y sabor característicos. Por su parte el Kitam ki, tiene fibras más suaves y bajo rendimiento, se considera casi extinto y es preferido en el uso textil (Colunga-Marín, 1997).

El cultivo del henequén no requiere de gran atención cultural, por lo que su producción no es costosa. Además el henequén puede ser aprovechado integralmente, debido a sus múltiples usos. El principal consumo es industrial, en la fabricación de cuerdas, sogas, sacos, hilos, entre otros. También se utiliza para la elaboración de artesanías como las alfombras, los tapices, los tapetes y las hamacas. A partir de él se pueden también elaborar bebidas alcohólicas y recientemente se está estudiando su posible uso para la fabricación de etanol (Rendón *et al.*, 2009). Asimismo, del henequén se puede obtener pasta de papel, abono, biogás, la pulpa procedente del desfibrado puede servir como alimento de ganado, pueden extraerse ceras para uso industrial y hecogenina, que es un producto básico para diferentes fármacos de gran demanda mundial. El jugo de henequén puede usarse también como biodetergente y como emulsionante para combustibles.

1.2.1 LA INDUSTRIA DEL HENEQUEN EN YUCATAN

Hacia la mitad del siglo XIX entró en auge la gran agroindustria henequenera en Yucatán, en la que florecieron las haciendas dedicadas al cultivo denominado “Oro verde” y se establecieron fábricas para su transformación (Martin Pérez, 1985). Esta industria era de gran importancia a nivel mundial, las actividades marítimas y el embalaje del heno o paja dependían fuertemente del henequén. Se dice que Yucatán producía en ese entonces el 90% de las sogas y sacos usados en el mundo, lo cual enriqueció a los hacendados (Martin Pérez, 1985). Sin embargo, durante la primera guerra mundial esta fibra perdió popularidad y su valor cayó. La fabricación de fibras sintéticas y el cultivo de sisal en países como Brasil, Tanzania, Kenia, entre otros, contribuyeron a que la industria entrara en crisis en nuestro país (Cruz C., 1985). El cultivo de este agave comenzó a

disminuir en Yucatán, a tal grado que no fue posible atender la demanda interna y debió importarse fibra de sisal de Brasil, lo cual ha continuado hasta el día de hoy. Esta agroindustria tiene un carácter residual y en cierta forma marginal en la entidad, en un contexto económico más diversificado, en donde los productores de la fibra deben complementar su ingreso con otras fuentes. Se dice que para atender la demanda de los industriales del ramo, se requieren de por lo menos 20 mil toneladas de fibra, sin embargo, actualmente Yucatán produce cerca de 5 mil toneladas anuales (FAO, 2009).

Existen esfuerzos que intentan insertar nuevamente al henequén en el escenario nacional y mundial. Para ello se requiere lograr competitividad en la producción, mediante la transferencia de tecnología, que permita a los productores hacer un manejo eficiente del agave para reducir costos, aumentar el volumen de producción y garantizar la calidad. Es necesario realizar un esfuerzo de promoción de su uso e incursionar en nuevos productos.

Producción de Henequén en México

Cuadro 3. Producción de henequén en México, del año 2000 al 2009.

Año	Superficie (Miles de Ha)		Producción (Miles de Ton)	Rendimiento (Ton/Ha)	Precio medio rural (\$/Ton)	Valor prod.(Millones \$)
	Semb.	Cosech.				
2000	99.0	54.6	129.7	2.4	1,645.6	213.4
2001	72.3	57.1	97.0	2.1	2,703.2	262.3
2002	60.3	24.5	77.9	3.2	2,523.5	196.5
2003	49.6	16.5	107.1	6.5	2,910.4	311.7
2004	35.3	13.8	111.0	8.1	3,050.0	338.4
2005	30.7	12.6	78.1	6.2	2,070.0	161.7
2006	29.0	11.9	66.1	5.5	2455.0	162.2
2007	20.4	11.9	19.9	1.7	2,825.3	56.2
2008	19.7	12.7	39.1	3.1	1,871.6	73.2
2009	18.8	13.9	38.2	2.8	2,122.8	81.2

Fuente: con base en datos de SIAP-SAGARPA.

La producción de henequén en México de acuerdo a la gráfica 1, muestra algunas características importantes como son la superficie sembrada y cosechada, la producción, el rendimiento, el precio medio rural y el valor producido, lo cual nos da una vista hacia la problemática actual de este cultivo, mostrando una disminución en todos los parámetros, desde el año 2000 al 2009.

Actualmente Yucatán y Tamaulipas son los únicos dos estados de la República en donde se cultiva el henequén. En Yucatán se encuentra la mayor superficie sembrada, sin embargo, Tamaulipas ha ido cobrando cada vez mayor relevancia.

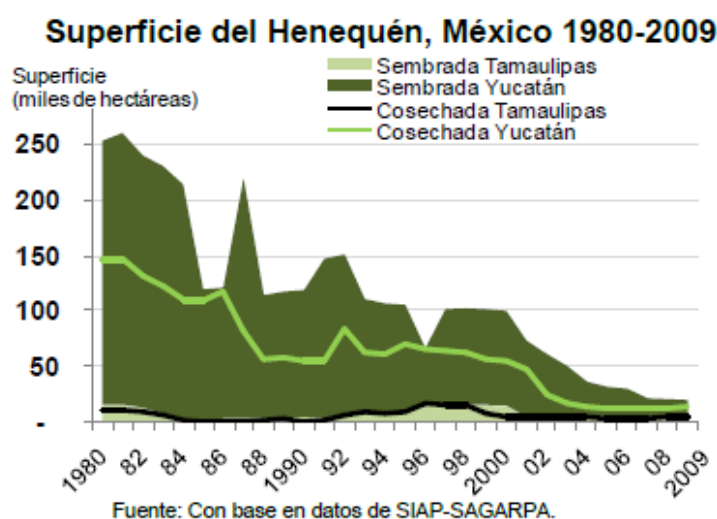


Figura 7. Superficie del henequén cultivado del año 1980 al 2009.

Tomado de FAO, 2009

En México se siembran cerca de 19 mil hectáreas de henequén, mientras que en el año de 1980 la superficie alcanzaba 252 mil hectáreas, es decir, la superficie cayó un 93% en treinta años.

El volumen de producción en Yucatán ha descendido de una manera importante, de 72 mil toneladas en 1980 a 5 mil toneladas en el año 2009, es decir ha caído un 93%,

mientras que la producción de Tamaulipas se ha incrementado un 97.2%, al pasar de 17 mil toneladas producidas en 1980 a 33 mil en el año 2009. Es importante destacar que esta última entidad presentó una producción récord de 276 mil toneladas en el año 1997, debido a una mayor superficie cosechada, así como un alto rendimiento, que alcanzó 18.8 ton/ha ese año.

Los rendimientos han disminuido en las dos entidades productoras del país. Mientras que el rendimiento de Yucatán hoy en día alcanza 0.5 ton/ha, en el año 2000 alcanzó 0.7 ton/ha, lo que representa una pérdida de productividad del 32.4%. Por otro lado, en Tamaulipas, el rendimiento varió de 21.8 ton/ha en 2000 a 9.1 ton/ha en 2009, es decir ha disminuido un 58.3%. Sin embargo es importante mencionar que siendo el henequén endémico de la península, la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo rural, Pesca y Alimentación lo propone impulsar para el presente año, ya que actualmente se producen alrededor de seis mil toneladas anuales con una superficie sembrada de 11 mil hectáreas, insuficiente para satisfacer la demanda nacional (SAGARPA, 2015).

El cultivo de henequén y sisal ha contribuido a reducir la situación de pobreza de los países productores y brinda empleo a casi 6 millones de personas en el sector rural (Shamte, 2000). Tradicionalmente las fibras en bruto son llevadas a los países desarrollados en Europa, Norte América, Japón, Australia y Nueva Zelanda, para su transformación y su posterior re-exportación como productos terminados. Sin embargo, algunos productores han estado cambiando este panorama al procesar la fibra en su lugar de origen. Esta industria ha sufrido un declive en los últimos cuarenta años y su comercio también ha experimentado un retroceso. Sin embargo, existen esfuerzos por parte de los países productores por revitalizar esta actividad, incursionando en nuevos productos y modernizando los procesos (FAO, 2009).

Además del uso de la fibra del agave en la fabricación de cordeles y sogas, están emergiendo otros mercados como la elaboración de papel especial, filtros, geotextiles, colchones, alfombras y papel de colgadura. Es usado como refuerzo en materiales plásticos compuestos, particularmente en componentes automotores y muebles. Otros usos son: sustituto de asbestos, bio-gas, ingredientes farmacéuticos y material de construcción (FAO, 2009).

1.2.2 *Agave* UNA ALTERNATIVA PARA EL ESTUDIO DE GENES RELACIONADOS A LA PRODUCCION DE FIBRA

Entre los genes expresados en el transcriptoma de *A. tequilana*, se identificaron genes que participan en su complejo y no estudiado metabolismo secundario (Martínez-Hernández *et al.*, 2008) entre los cuales varios tienen aplicaciones potenciales tanto para la industria de bebidas alcohólicas como para la industria farmacéutica, química, producción de controladores biológicos, para la industria de fibra e incluso como fuente en pre síntesis de biopolímeros o para sustentar el desarrollo de una novedosa industria bioenergética. En el cuadro 5 se resume algunos ejemplos de genes para posible uso biotecnológico.

Cuadro 4. Ejemplos de genes de *Agave* con potencial biotecnológico industrial. (Tomado de Martínez-Hernández *et al.*, 2008)

FUNCION EN PLANTAS	EJEMPLOS DE GENES DE <i>A. Tequilana</i> IDENTIFICADOS	POTENCIAL APLICACIÓN BIOTECNOLOGICA
Biosíntesis de oligofruktanos	1-SSH Fructosiltransferasa 6-G Fructosiltransferasa	Mejorar la producción de la industria tequilera. Desarrollo de nutraceúticos y prebióticos.
Biosíntesis de fibras y metabolismo de pared celular	Celulosa sintasa Xilanas Celulasa Expansina Proteína de fibra Anexina de fibra	Industria procesadora de fibras, producción de papel.

Biosíntesis de ceras cuticulares	ACBP Beta-cetoacil-CoA sintasa Ceramida sintasa Wax sintasa LACS9 Cutinasa	Síntesis de biopolímeros biodegradables
Biosíntesis de sapogeninas esteroidales	Furostanol glicosido beta-glucosidasa	Síntesis de anticonceptivos o antianflamatorios
Biosíntesis de sustancias demoirritantes	Glicolato oxidasa Galactonolactona-deshidrogenasa	Desarrollo de líneas elite menos demoirritantes
Proteasas	Lectina Bromelina	Diagnostico bioquímico Sustancia desinflamatoria

1.3 JUSTIFICACIÓN

Las fibras naturales están sujetas a la competencia de las fibras sintéticas. Sin embargo, la diversidad de las aplicaciones de las fibras naturales ha ido aumentando considerablemente en los últimos años, ya que presenta ventajas, como su alta calidad y durabilidad que se emplea para la elaboración de una amplia variedad de productos de alto valor económico como la fabricación de cuerdas, sogas, sacos, hilos, alfombras, bebidas alcohólicas, pasta de papel, abono, biogás, entre otros. Algunas especies de *Agave*, como *A. fourcroydes*, *A. sisalana*, Híbrido (11648) que son utilizadas para la producción de fibra, también han demostrado ser tolerantes a sequías, plagas y enfermedades, lo que posiciona a estas especies como prometedoras materias primas para la producción de fibra, con posible adaptación a cambios climáticos. Además hoy en día existe una gran sensibilización de los consumidores a las cuestiones ambientales y al interés de productos no dependientes del petróleo.

En algunas especies de plantas como el algodón (*Gossypium hirsutum*) y lino (*Linum usitatissimum*), se ha observado la variación en el contenido de polímeros naturales (celulosa y hemicelulosa) y los altos contenidos de estos polímeros se ha relacionado con la expresión de genes involucrados en la síntesis de los mismos.

En *Agave* a pesar de que es un género utilizado en la producción de fibra, se desconoce el comportamiento de genes relacionados en la producción de fibra como expansina, sacarosa sintasa, glucanasas y celulosa sintasa.

En este trabajo se determinó la expresión relativa del gen (CESA) de *Agave fourcroydes*, involucrados en la biosíntesis de la fibra.

1.4 HIPÓTESIS

Las diferencias en el contenido de celulosa de *Agave fourcroydes* se correlacionarán con una expresión diferencial del gen CESA.

1.5 OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la expresión del gen (CESA) asociado a la producción de fibra en *A. fourcroydes*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar y comparar el contenido de fibra (celulosa y hemicelulosa) en plantas de *Agave fourcroydes* de tallas baja (75 cm), media (110 cm) y alta (139 cm)
2. Identificar los genes CESA en *A. fourcroydes*.
- 3.- Determinar el perfil de expresión por qPCR de los genes CESA en *A. fourcroydes*.

1.6 EXTRATEGIA EXPERIMENTAL

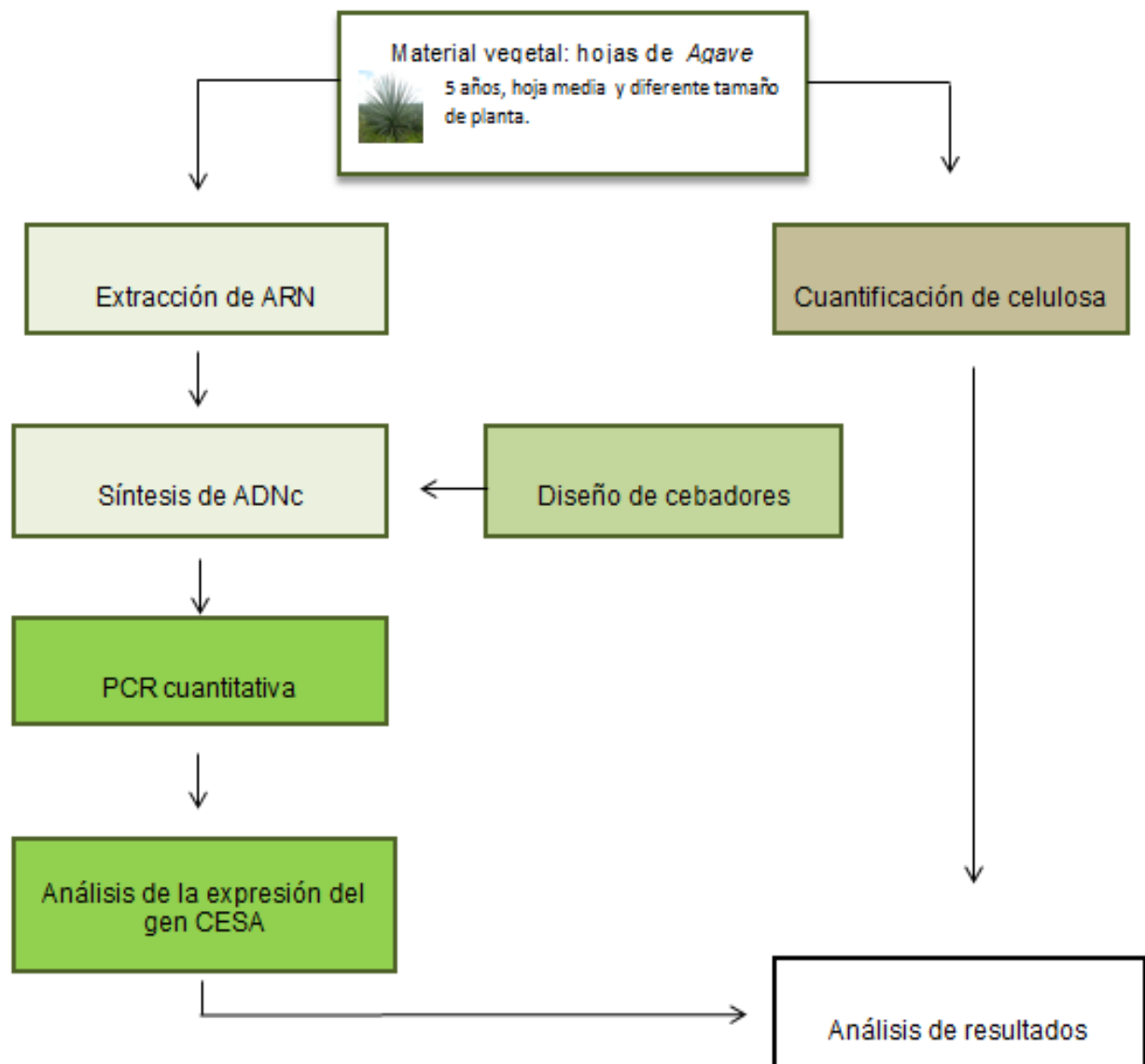


Figura 8. Estrategia experimental del proyecto.

CAPITULO II

DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE FIBRA EN *A. fourcroydes* Lem.

2.1 INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, el interés y la demanda por las fibras naturales se han visto incrementados. El interés por explotar el potencial de las fibras naturales para sus diversos usos es ya una realidad (Mylsamy, 2011; Chattopadhyay y Khan *et al.*, 2012) y muchos cultivos de importancia comercial como el yute, banana y *Agave* entre otros, son ampliamente utilizados para la producción de fibra natural.

Entre las especies de *Agave* más utilizadas para la producción de fibra, destacan *A. americana* Lem, *A. fourcroydes* Lem, *A. lechuguilla* Torr y *A. sisalana* Perrine, entre otros (Mayorga-Hernández *et al.*, 2004; Hulle *et al.*, 2015; Robert *et al.*, 1987). Las fibras obtenidas de estas especies contienen aproximadamente el 80 % de celulosa, el 5 % de hemicelulosa y el 15 % de lignina (Vieira *et al.*, 2002; Msahl *et al.*, 2006).

Los rendimientos de fibra obtenidos a partir de cada especie de *Agave*, varían según la especie en estudio (Hulle *et al.*, 2015) y el método utilizado para su cuantificación o para su obtención (Thamae y Baillie, 2007, Sghaier *et al.*, 2012). A pesar de que los parámetros considerados en el método de extracción tienen un gran impacto en el rendimiento y la calidad de fibra, también es importante destacar que las características morfológicas y fenotípicas propias de la especie en estudio y las condiciones ambientales presentes durante su cultivo, juegan un papel importante en los rendimientos finales de fibra en la especie (Hulle *et al.*, 2015).

A pesar de que *Agave* es un cultivo ampliamente utilizado para la producción de fibra, en esta especie se desconoce qué factores pueden estar afectando la variabilidad en el rendimiento de fibra entre diferentes especies e incluso entre especies de diferente edad y tamaño. Dentro del conocimiento general, en estas plantas la cosecha de hojas destinadas para la producción de fibra se realiza desde el tercer año de vida, se cosechan las hojas más desarrolladas con una longitud no inferior a un metro. Cada planta produce 40-50 hojas al año y entre plantas de *A. americana* el contenido de fibra varía con la variedad de planta usada (2,5% -4,5%) (Hulle *et al.*, 2015).

Dentro del contexto de la importancia de conocer los rendimientos de fibra en las especies de *Agave*, en este estudio se decidió determinar el contenido de fibra en *A. fourcroydes* en plantas de diferentes tamaños (talla).

2.2 MATERIALES Y METODOS

2.2.1 Material vegetal

La colecta del material vegetal para *A. fourcroydes* se realizó en la hacienda Santa Teresa, ubicada en Telchac pueblo. Para la colecta del material vegetal (hojas), se consideraron 2 parámetros, descritos a continuación:

- A) Parámetros de la hoja. Se recolectaron hojas sanas y largas. En la figura 9 A se muestra un ejemplar seleccionado para la colecta. De cada ejemplar de agave se colectó la hoja media (figura 9 B).
- B) Parámetros de plantas. La colecta fue realizada marcando 3 bloques divididos en filas, considerando una distancia de 20 metros entre cada bloque y se consideraron únicamente plantaciones con 5 años de edad. Dentro de cada bloque se consideraron 3 tamaños de plantas (baja, media y alta agregar el rango utilizado en cm o mm), de cada tamaño de planta se colectaron muestras por triplicado (figura 10).

A)



B)

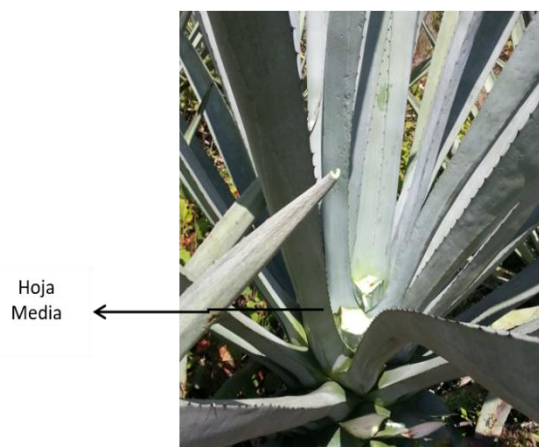


Figura 9. Plantas de *A. fourcroydes* seleccionadas en la colecta. A) Ejemplar de *A. fourcroydes* seleccionado, se demuestra que las plantas visualmente no se tienen ningún síntoma asociado con patógenos, sus condiciones morfológicas demuestran un desarrollo en un ambiente adecuado (plantas sanas) B) Fotografía que muestra la hoja media que fue colectada en cada ejemplar de *Agave*.

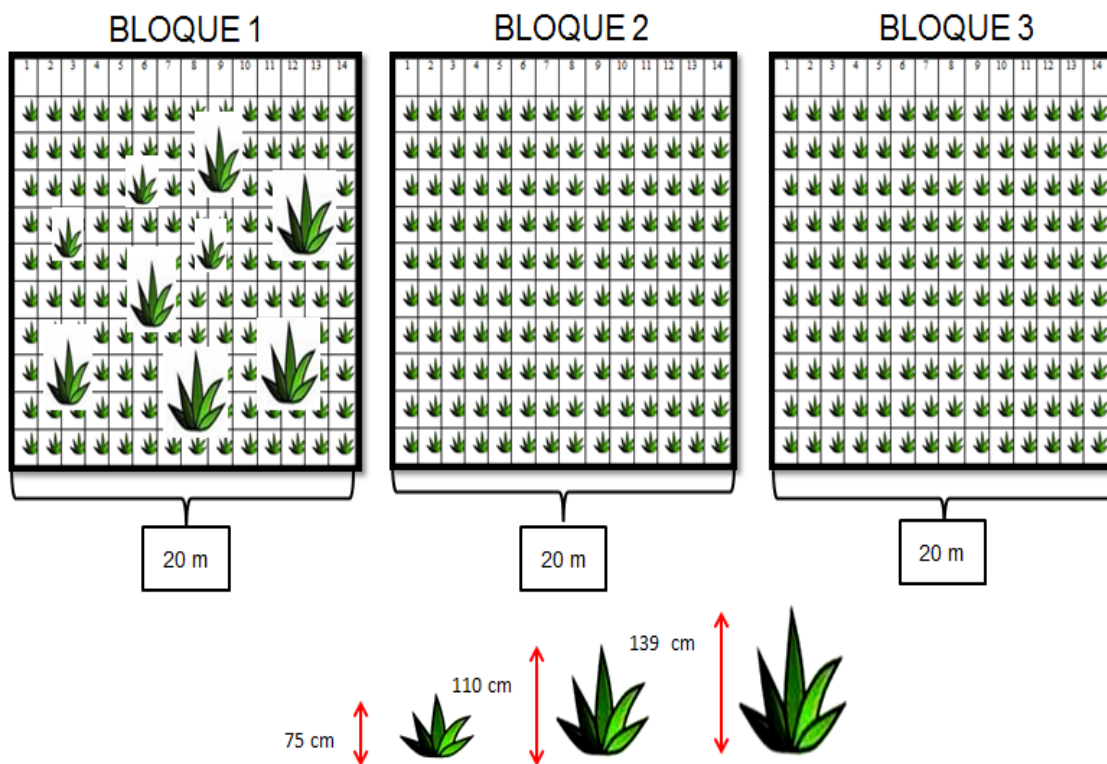


Figura 10. Representación del área de colecta, dividida en 3 bloques donde cada bloque contenía filas de plantas y seleccionamos de acuerdo a su morfología de diferentes tamaños, plantas altas, medianas y bajas para cada bloque.

2.2.2 Cuantificación de fibra

Los análisis fueron realizados con base a los procedimientos y parámetros dictados por las normas TAPPI, que son estándares mundiales para la medición de componentes químicos de materiales fibrosos celulósicos. Estas normas indican los reactivos y materiales necesarios, así como el procedimiento adecuado que se debe utilizar para aislar un constituyente de la fibra a través de la descomposición química de sus demás componentes.

2.2.3 Determinación del contenido de humedad

El contenido de humedad fue determinado siguiendo el procedimiento B del método ASTM D4442-92. De acuerdo con éste se pesaron los gramos de muestras necesarios y se secaron en una estufa de convección a 100 ° C hasta peso constante y se calculó el porcentaje de humedad mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Humedad} = (A-B/ B) * 100$$

Dónde:

A= peso de muestra húmeda

B= peso de muestra seca

2.2.4 Determinación de extraíbles (compuestos de la fibra)

Se extrajo el material que pasó por la malla 40 y se retuvo en malla 60 en un equipo Soxhlet usando el método T-204 cm-07 de la TAPPI. Se pesaron de 2 a 3 g de residuo lignocelulósico seco y se colocaron en cartuchos previamente elaborados con papel filtro y puestos a peso constante. Se colocaron los cartuchos en la cámara de extracción del soxhlet y se extrajo por un periodo de 5 horas con una mezcla de etanol benceno (2:1). El cartucho se filtró y se secó hasta peso constante primero dejándolo solamente en la campana con extractor, luego utilizando una estufa a 100 °C. Se evaporó la mezcla de etanol-benceno usando un rotavapor a 80 °C por 1 hora, el sólido obtenido se dejó secar a temperatura ambiente y se almacenaron para su posterior caracterización. Se repitió el proceso de extracción, pero utilizando solo etanol (99%) como disolvente.

Para la determinación de extraíbles con agua se empleó el método T-207 cm-99 de la TAPPI. Se vertieron las muestras que se encontraban dentro de los cartuchos directamente en matraces con 900 ml de agua destilada y se procedió a calentarlo a ebullición durante una hora, las suspensiones se filtraron usando embudos buchner. El procedimiento se realizó por triplicado para cada muestra y los sólidos se secaron hasta peso constante. El porcentaje de extraíbles para cada etapa, se calculó de la relación de peso perdido (peso antes y después de la extracción) con respecto al peso inicial de muestra utilizando la ecuación. La muestra libre de extraíbles se usó para la determinación de lignina klason.

$$\% \text{ Extraíbles (Ext)} = (C-D/C) * 100$$

Dónde:

C= Peso de la muestra sin extraer, g

D= Peso de la muestra libre de extraíbles, g

2.2.5 Determinación de lignina Klason

Se determinó el contenido de lignina lignocelulósico libre de extraíbles de acuerdo a la técnica T222, con algunas modificaciones. Se pesó 1 g de material libre de extraíbles y se sometieron a una hidrólisis ácida con 15 ml de H₂SO₄ al 72 %, la muestra se mantuvo en agitación en un baño de temperatura constante durante 2 horas a temperatura de 15 °C. Posteriormente la suspensión se diluyó con agua hasta alcanzar una concentración de ácido del 4 % y se calentó a ebullición durante 4 horas. Después se filtró la solución en un filtro de vidrio poroso tipo "F", previamente llevados a peso constante y el residuo insoluble (lignina Klason) se secó en una estufa a 100 °C para su cuantificación gravimétrica utilizando, el contenido de lignina Klason se calculó empleando la siguiente ecuación:

$$\% \text{Lignina} = [(E/F) * (1 - G+H/100)] * (100)$$

Dónde:

E= Peso de lignina, g

F= Peso de muestra libre de extraíbles, g

G= Extraíbles con solventes orgánicos, % en peso

H= Extraíbles con agua, % en peso

2.2.6 Determinación de Holocelulosa (Celulosa y Hemicelulosa)

Se utilizó la metodología de Rajev Kumar *et al.* 2009, para la cuantificación de la celulosa y hemicelulosa. Se pesó 1 g de muestra libre de extraíbles, se agregaron 32 ml de H₂O y se calentó a 74 °C. Cuando alcanzó dicha temperatura se agregaron 0.2 ml de ácido acético glacial (CH₃COOH) Y 0.4 g de hipoclorito de sodio (NaClO₂) y posteriormente se dejó en agitación constante con ayuda de un agitador magnético. Se repitió la adición de ácido acético (CH₃COOH) y de hipoclorito de sodio (NaClO₂) cada hora hasta un total de 6 veces. Después de una hora se dejó enfriar la mezcla (teniendo un tiempo de reacción de 6 horas) y se filtró con un filtro de vidrio poroso tipo "C" y se lavó con agua para que quedara libre de ácido. Se secó en la estufa de convección hasta peso constante. El producto final obtenido se cuantificó como holocelulosa y el contenido de holocelulosa se calculó utilizando la ecuación:

$$\% \text{Holocelulosa (Ho)} = [(K/J * (1 - H + I/100))] * 100$$

Dónde:

K= Peso de la muestra deslignificada, g

J= Peso de la muestra seca y libre de extraíbles, g

H= Extraíbles con solventes orgánicos, % en peso

I= Extraíbles con agua; % en peso

Para el análisis de la cuantificación de la celulosa se utilizó la norma T 203 cm-99. (Schoening, 1965), la cual consiste en 4 pasos: primero se realiza una hidrólisis ácida con H₂SO₄ al 2%, posteriormente se realiza la cloración con NaClO₂ al 3.5%, posteriormente una extracción alcalina con NaOH al 20% y por último se procede a blanquear con NaClO₂ al 0.5 %, lo que permitirá separar la α, β y γ celulosa.

2.2.7 Análisis estadístico

Los datos correspondientes a longitud de hoja, peso seco, peso fresco y contenido de celulosa, fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) utilizando el paquete de software estadístico SAS ver. 9.0 (2000) y el programa Origin 9.1 (Programa para el análisis de datos y gráficos). Pruebas estadísticas se evaluaron con un alfa de 0.05 y las medias se compararon mediante la prueba de Tukey ($P > 0,05$).

RESULTADOS

2.3 Determinación del peso fresco, peso seco y contenido de celulosa en plantas de diferentes tamaños de *A. fourcroydes* Lem.

Se colectaron en total 27 plantas de diferentes tamaños (Bajas, Medias y Altas). Estas se clasificaron según su tamaño en bajas, medias y altas que presentaron aproximadamente una longitud promedio de 139.37, 110.09 y 75.88 cm. La medición de las plantas se efectuó desde la parte baja de la hoja hasta la espina central de la hoja media. Las plantas se etiquetaron como se ejemplifica en la tabla 1.

Tabla 1. Plantas seleccionadas de la colecta de material vegetal.

PLANTAS ALTAS	TALLA (cm)	PLANTAS MEDIAS	TALLA (cm)	PLANTAS BAJAS	TALLA (cm)
	X		X		X
B1F2P3	134.00	B1F4P7	107.00	B1F2P5	69.50
B1F6P14	126.00	B1F2P11	109.30	B1F4P10	65.00
B1F4P13	126.30	B1F6P6	106.00	B1F6P13	68.50
B2F2P5	131.50	B2F3P8	118.50	B2F2P12	75.00
B2F3P13	135.50	B2F4P9	107.50	B2F4P7	84.60
B2F5P22	153.00	B2F6P13	118.50	B2F6P19	84.50
B3F6P16	149.50	B3F2P12	90.00	B3F2P9	88.50
B3F2P5	141.00	B3F4P5	115.00	B3F4P10	73.00
B3F4P7	157.50	B3F6P8	119.00	B3F6P10	74.30

Promedio	139.37		110.09		75.88
-----------------	---------------	--	---------------	--	--------------

B= hace referencia al bloque de colecta; F= hace referencia a la fila de colecta y P = hace referencia a el número de planta.

Posteriormente a la selección de plantas, se realizó el secado de las pencas para la cuantificación de celulosa, en la figura 11 se puede observar el procedimiento para la obtención de celulosa.



Figura 11. Imagen resumen del procedimiento para la obtención de Holocelulosa. A) Moledora B) Tamiz C) secciones obtenidas en el tamizado (seleccionando la sección 40/60, descrito anteriormente) D) primera extracción con el sistema Soxhlet E) material seleccionado para continuar con la obtención (ultima extracción) F) extracción alcalina G) blanqueo de la Holocelulosa.

Inicialmente todos los datos determinados respecto al peso fresco, peso seco y contenido de agua (%), fueron analizados para identificar clases. Los análisis estadísticos nos indicaron una agrupación de 3 tipos de clases que coincidieron con la agrupación de los datos por planta de diferente tamaño. Posteriormente a cada clase se le realizaron

pruebas estadísticas de Tukey para determinar si entre estas 3 clases existen diferencias significativas. Los resultados, indicaron que los datos de peso fresco y peso seco, demostraron que son diferentes en cada clase de datos analizados. Tal como se ilustra en la figura 11, en el inciso A podemos observar la longitud de las hojas las plantas de mayor tamaño (139cm), presentan en promedio de 773g de peso fresco, con valores máximos y mínimos de 620 y 1000 g (por hoja), respectivamente. Para el caso de las plantas de tamaño mediano (110 cm), demostraron presentar en promedio 410 g de peso fresco, con valores máximos y mínimos de 300 a 500 g, respectivamente y finalmente las plantas de tamaño menor (75 cm), presentaron en promedio 196 g de peso fresco, con valores máximos y mínimos de 125 a 280 g, respectivamente. Los análisis estadísticos mediante la prueba de Tukey indicaron que las tres clases de datos presentan diferencias significativas, las plantas de talla mayor presentan más peso fresco y estas van disminuyendo según la talla de las plantas analizadas (Figura 12 A y 12 B).

Tendencias similares fueron encontradas respecto al peso seco. Para el caso de las plantas de talla mayor (139 cm), demostraron presentar en promedio 196 g de peso seco, con valores máximos y mínimos de 125 a 260 g, respectivamente y las plantas de talla mediana (110 cm), presentaron en promedio 108 g de peso seco, con valores máximos y mínimos de 59 a 155 g, respectivamente. Por su parte las plantas de talla menor (75 cm) presentaron en promedio 33 g de peso seco, con valores máximos y mínimos de 25-50 g. Nuevamente, igual que los datos de peso fresco, las clases indicaron diferencias estadísticas entre cada clase respecto a su peso seco. Las plantas de talla mayor presentan más peso seco, y estas van disminuyendo según la talla de las plantas analizadas (Figura 12 C).

La determinación de celulosa entre las tres clases de datos, indicó que las plantas de mayor tamaño (139 cm), presentan 48% de celulosa, con valores máximos y mínimos de 30 a 60%, respectivamente y las plantas tamaño mediano (110 cm) presentaron en promedio 24% de celulosa, con valores máximos y mínimos de 14 a 37%, respectivamente. Finalmente las plantas de talla menor (75 cm) presentaron en promedio 8% de celulosa, con valores máximos y mínimos de 5 a 13. Se encontró una correlación entre el tamaño de planta y la cantidad de celulosa. Todas las plantas de diferente tamaño mostraron diferencias estadísticas significativas. La mayor cantidad de celulosa fue encontrada en las plantas de mayor tamaño, este porcentaje de celulosa disminuyó en

relación al tamaño de planta analizada (Figura 12 D), esta tendencia fue similar a la observada con los valores de peso fresco y peso seco, descritos anteriormente.

DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE FIBRA EN *A. fourcroydes* Lem.

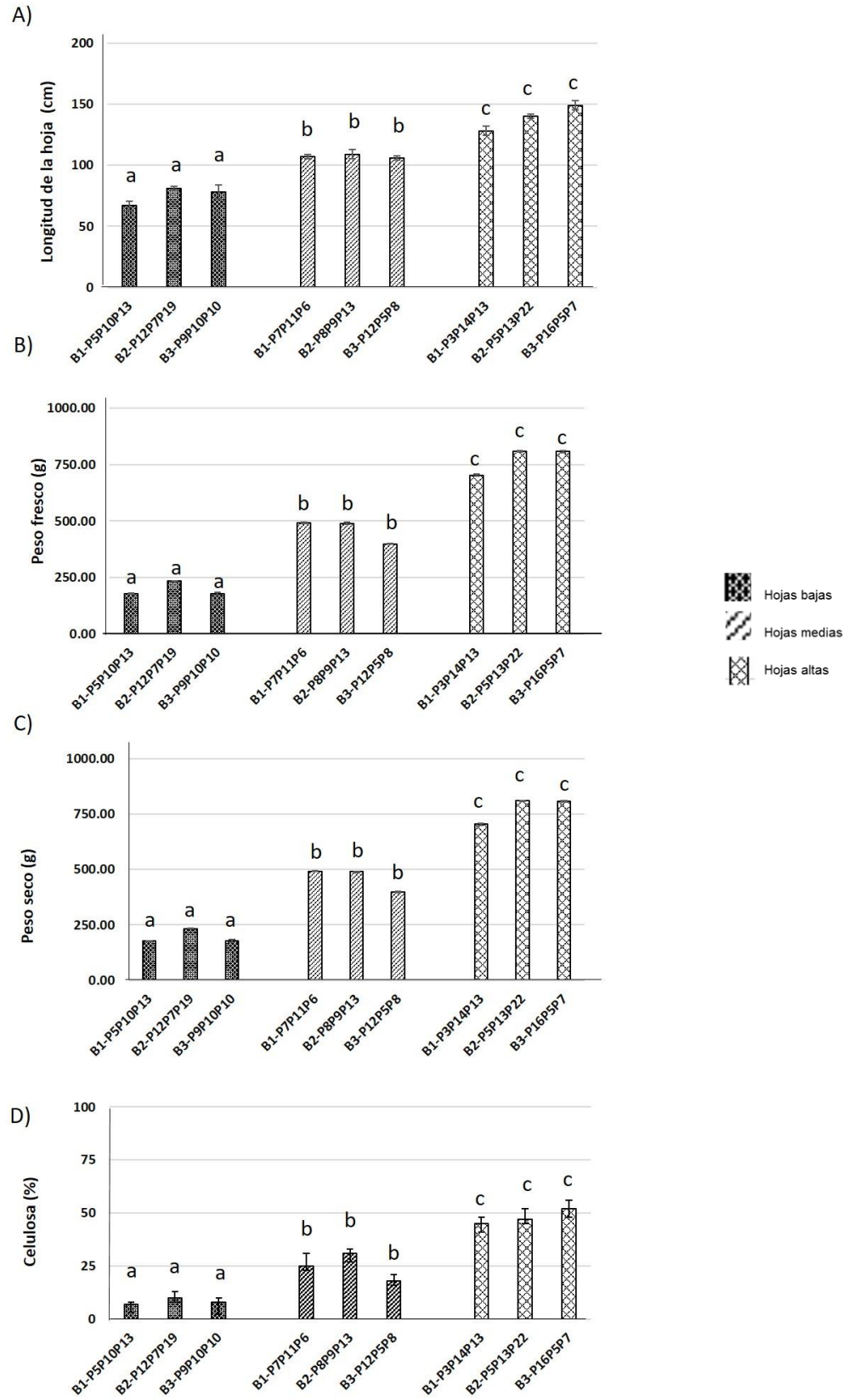


Figura 12. Representación esquemática de los parámetros evaluados en las hojas, las letras a, b y c corresponde a la comparación múltiple de las muestras por triplicado por medio de la prueba tukey y los patrones gráficos en la barra corresponde a la desviación estándar. A) valores de la longitud de la hoja para cada bloque mostrando los diferentes tamaños de las hojas muestreadas equivalente a 9 individuos con sus triplicados que conforman cada clase o grupo de datos analizados B) peso fresco en plantas de diferente tamaño, las plantas de mayor tamaño mostraron mayores valores de peso fresco en comparación a las plantas medianas y de menor tamaño, C) peso seco en plantas de diferentes tamaños, Las plantas de mayor tamaño demostraron presentar mayores valores de peso seco en comparación a las plantas medianas y de menor tamaño, D) porcentaje de celulosa en plantas de diferente tamaño, Las plantas de mayor tamaño demostraron mayores porcentajes de celulosa en comparación a las plantas medianas y de menor tamaño.

A pesar de que las tres clases de datos demostraron diferencias significativas en el peso fresco y peso seco analizado, cuando se determinó el porcentaje de agua contenido en las plantas, no se encontró diferencias estadísticas (figura 13). En general todas las plantas de *A. fourcroydes* Lem. mostraron un 77 % de agua, con relación al peso fresco en promedio y con valores máximos y mínimos de 70 y 80%, respectivamente.

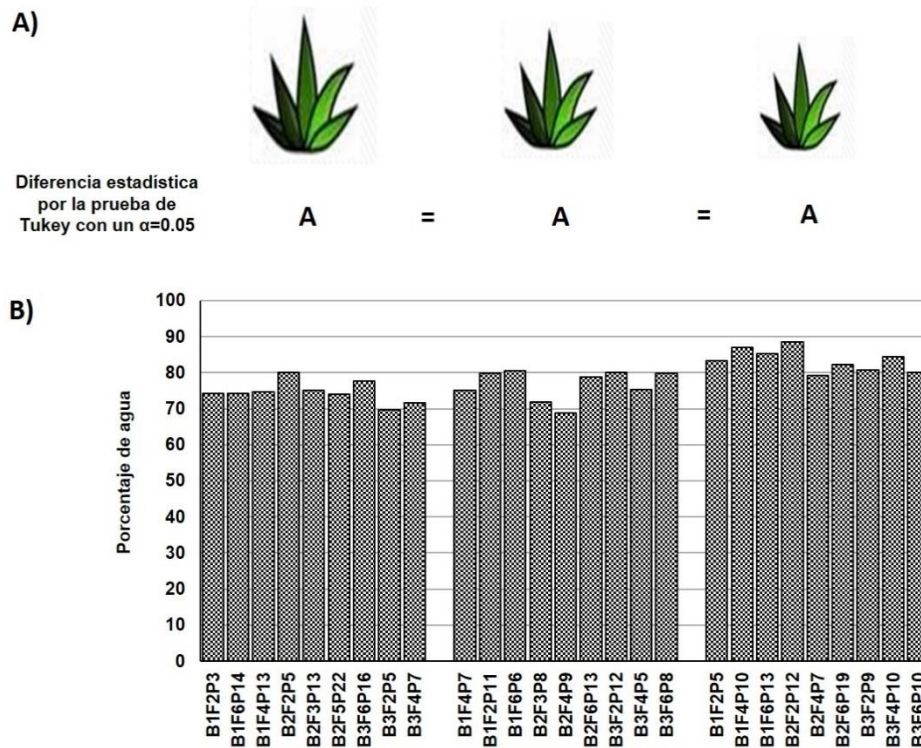


Figura 13. Representación esquemática de porcentaje de agua en plantas de diferente tamaño. A) ilustra la diferencia estadística presente entre las 3 clases de datos analizados. No se encontró diferencia estadística, indicando que todas las plantas analizadas contienen el mismo porcentaje de agua. B) Representación gráfica de los porcentajes de agua en 9 individuos colectados, que conforman cada clase o grupo de datos analizados.

2.4 DISCUSIÓN

Agave es una especie de gran importancia económica para México. En nuestro país el uso de las pencas de *Agave* para obtención de fibra, es limitada a algunas especies, entre las que se pueden incluir a *A. americana* L., *A. fourcroydes*, *A. lechuguilla* y *A. sisalana*, entre otros (Mayorga-Hernández *et al.*, 2004; Msahli *et al.*, 2006; Hulle *et al.*, 2015; Robert *et al.*, 1987).

En varias especies de *Agave* L., se ha descrito que el porcentaje de celulosa puede estar alrededor de 43 a 79.8 %. Por su parte los valores de hemicelulosa reportados

oscilan alrededor de 5-32 % y los valores de alrededor de 4.9-15.3% han sido descritos respecto al contenido de lignina. Tal como se observa en la tabla 2, los valores más altos de celulosa han sido reportados para la especie de *A. fourcroydes* y *A. Lechugilla* ($\geq 76\%$). Los resultados obtenidos en este trabajo indicaron que las plantas de *A. fourcroydes* de tamaños de 139, 110 y 75 cm mostraron 48, 24 y 8% de celulosa respectivamente. Se encontró una correlación positiva con el peso fresco y peso seco, de estas plantas relacionándolo con su contenido de celulosa. Plantas con mayor peso fresco y peso seco, presentaron mayores valores de celulosa.

Tabla 2. Contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina (%) en diferentes especies de agave. Tomado de Li *et al.* (2012).

Especie	Celulosa	Hemicelulosa	Lignina	Bibliografía
<i>A. americana</i>	68.4	15.7	4.9	Mylsamy & Rajendran, 2010;
<i>A. salmiana</i>	47.3	12.8	10.1	Garcia-Reyes & Rangel-Méndez, 2009
<i>A. tequilana</i>	43	19	15	Cedeno-Cruz & Alvares-Jacobs, 1999
<i>A. lechuguilla</i>	79.8	3-6	15.3	Vieira <i>et al.</i> , 2002
	46-48	30	11	Márquez <i>et al.</i> , 1996
<i>A. fourcroydes</i>	77.6	5-7	13.1	Vieira <i>et al.</i> , 2002
<i>A. sisalana</i>	43	32	15	McDougall <i>et al.</i> , 1993

Respecto a los porcentajes de agua, reportados para todas las plantas de *Agave*, sin importar el tamaño fue de aproximadamente 77 %, un valor similar a lo reportado para las especies de *Agave* que fue de 80 % (Himmerfarb, 1957).

A pesar de que las plantas de mayor tamaño demostraron presentar mayor porcentaje de celulosa, los valores obtenidos en este trabajo son 1.8 veces menores a los reportados en literatura por Vieira *et al.*, 2002 donde realizaron la cuantificación de celulosa con la técnica de benceno- etanol en *A. fourcroydes*, sin embargo no reportan las características de las plantas (tiempo de vida, edad, tamaño de hojas), indicando que en las plantas de *A. fourcroydes* colectadas tal vez el hábitat donde se cultivan juega un

factor importante en ganancia en peso fresco, peso seco y posiblemente contenido de celulosa. Cabe mencionar que Vieira *et al.*, 2002, reportó valores de celulosa analizando plantas de *A. fourcroydes* colectadas en González, Tamaulipas, México. En este trabajo la colecta fue realizada en el estado de Yucatán. Las diferencias en condiciones ambientales entre estos dos estados de México, podría influir en el contenido de fibra para este cultivo.

Por otra parte, es importante mencionar que las especies de *Agave* con hojas delgadas, como *A. lechuguilla* y *A. fourcroydes*, presentan mejores características en sus fibras lo que permiten una mejor manipulación y utilización en la elaboración de papel y otros usos (Negrete *et al.*, 2010). *A. lechuguilla* ha demostrado presentar fibras más gruesas, resistentes y consistentes. Por su parte en menor grado de resistencia se encuentra el *A. angustifolia* y luego el *A. tequilana* (Negrete *et al.*, 2010). Debido a la morfología que presenta *A. fourcroydes* y a las características propias de su fibra, tal vez sería importante enfatizar la mejora en este cultivo en el estado de Yucatán, hasta obtener valores similares en porcentaje de celulosa a los reportados en otras plantas de *A. fourcroydes* cultivados en otros estados del país.

Además, si comparamos, los valores de celulosa (48%) reportados para *A. fourcroydes* en este trabajo, podemos observar que presenta 15.2% menos de celulosa con respecto al Yute (Rodríguez, 2006). Por su parte el algodón y el ramio, con porcentajes del 91 y 86.5% de celulosa se colocan como los cultivos con mayor porcentaje de celulosa (Rodríguez, 2006, Sing, 2006).

Se ha descrito que las propiedades físicas y mecánicas de las fibras de *Agave* en general son uniformes en la sección media, es por ello que se decidió trabajar con esta parte de la planta para los análisis, por otro lado de ha descrito que la morfología de la fibra de henequén es similar a la de otras fibras duras naturales como el yute y abacá (Cazaurang, 1991).

La importancia de mejorar los rendimientos de celulosa y consiguientemente los contenidos de fibra en las plantas de *A. fourcroydes* del estado de Yucatán, radica en que esta especie presenta características morfológicas y fisiológicas (e.j. Metabolismo CAM, tolerar condiciones extremas y largos periodos de sequía) que le permiten generar una alta biomasa relacionada con mayor productividad en cualquiera de los usos

biotecnológicos a los que se destine, como producción de hilos, calzado, ropa y bebida alcohólicas, entre otras (García y Serrano, 2012).

CAPITULO III

3 ANALISIS DE EXPRESIÓN DEL GEN DE CESA RELACIONADO CON LA PRODUCCIÓN DE FIBRA

3.1 INTRODUCCIÓN

Estudios realizados en algodón, han indicado que durante la producción de fibra, muchos genes son altamente expresados y se ha descrito que la supresión de la expresión del gen codificante de la sacarosa sintasa (SuSy) ha sido involucrada en la afectación de la elongación de la fibra (Ruan *et al.*, 2003). También se ha sugerido que la expresión de genes perteneciente a la familia de expansinas se encuentran involucradas en la elongación de fibras (Orford *et al.*, 1998; Harmer *et al.*, 2002), e incluso otras proteínas que se han correlacionado con la elongación de fibras son la actina y proteínas de transferencia de lípidos (Orford, 2000; Li *et al.*, 2003).

Se ha demostrado que durante la producción y elongación de fibra, muchos genes parecen estar regulados y su expresión ha sido analizada en modelos como *Gossypium* spp. (Gou *et al.*, 2007) y *Linum Usitatissimum* L (Mokshina *et al.*, 2014), cultivos de importancia comercial. Sin embargo, este acercamiento a correlacionar la expresión de genes con la producción de fibra en *Agave*, no ha sido llevado a cabo. En este capítulo de la tesis se tiene como objetivo dilucidar si existe una relación entre la expresión del gen celulosa sintasa de *A. fourcroydes* y una mayor producción de fibra. Esta información en un futuro nos permitirá generar herramientas para el mejoramiento de la especie que resultará en mejores rendimientos y calidad de fibra.

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 MATERIAL VEGETAL

Las 27 plantas de *A. fourcroydes* de diferentes tamaños (Bajas, Medias y Altas) colectadas y descritas en el capítulo II, fueron utilizadas para el aislamiento y análisis de expresión del gen de celulosa sintasa.

3.2.2 EXTRACCIÓN DE ARN

Se maceraron 100 mg de tejido con nitrógeno líquido, se adicionó 1 mL de TRIzol® y β -mercaptoetanol al 2%, se homogenizó el tejido y se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos, se agregaron 200 μ l de cloroformo por cada μ l de TRIzol®, la muestra se centrifugó a 12, 000 rpm por 15 minutos a 4 °C, la fase superior fue transferida a un

nuevo tubo. Posteriormente se agregaron 500 µl de isopropanol para precipitar el ARN de la fase acuosa. Se agitó varias veces y se incubó a -20 ° c durante 90 minutos, se centrifugó a 12,000 rpm por 10 minutos a 4 °C, se desechó el sobrenadante y se agregó 1 mL de etanol al 75 % para lavar la pastilla, se centrifugó a 7,500 rpm por 5 minutos a 4° c, se desechó el sobrenadante, se dejó secar la pastilla y se resuspendió en H₂O tratada con DEPC. La integridad y pureza del RNA se verificó en gel de agarosa al 1 % y mediante cuantificación en con el equipo NANODROP 2000 Spectrophotometer THERMO Scientific.

3.2.3 TRATAMIENTO CON DESOXIRIBONUCLESA (DNASA I)

Para la eliminación del ADN genómico de las muestras de ARN total, se procedió a tratar con DNasa I de la marca PROMEGA siguiendo las especificaciones del Kit RQ1 RNase-Free DNase. Posteriormente la muestra fue sometida a electroforesis en un gel de agarosa al 1 %.

Para asegurar la eliminación del ADN de las muestras de ARN, se realizó una PCR utilizando como molde 50 ng del ARN tratado, con cebadores ribosomales 18's, en un volumen final de 25 µl. Por último, la presencia o ausencia de los productos de PCR se analizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1 %.

3.3 SÍNTESIS DE ADNc

Para la síntesis de cDNA, se usaron las especificaciones del KIT comercial GoScript™ Reverse Transcription System (PROMEGA). Todas las muestras de RNA fueron ajustadas a 100 µg. Este stock fue usado como molde para la síntesis de la cadena complementaria. En la Cuadro 5, se describen los componentes utilizados en la síntesis de cDNA.

La reacción anterior fue incubada por 10 min a temperatura ambiente y posteriormente se incubó a 42°C por 15 minutos y a 95°C por 5 minutos. Las muestras fueron almacenadas a 4°C hasta su uso.

Cuadro 5. Componentes para la síntesis de cDNA

Componentes	Cantidad
MgCl ₂	4 µl
Buffer 10X de enzima RT	2 µl
Mezcla dNTP's 10 Mm	2 µl
Inhibidor de Ribonucleasa Rnasin 1U/ µl	0.5µl
Enzima transcriptasa inversa 15 U/ µg	0.6 µl
Oligo (dT) 0.5 µg	1 µl
Agua libre de nucleasa	9.9 µl
Volumen final	20 µl

3.4 DISEÑO DE OLIGONUCLEOTIDOS DE GENES DE CELULOSA SINTASA

Se realizó un alineamiento de la secuencia de genes de celulosa sintasa de plantas depositadas en la base de datos del NCBI. Dentro de estas secuencias se identificó la región nucleotídica codificante de celulosa sintasa, esto se realizó mediante el software CCD (software de base de datos de dominios conservados) (Marchler-Bauer et al., 2015). Sobre estas regiones se diseñaron dos pares de oligonucleótidos, con el software DNAMAN V.3 y Oligo analyzer (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>). El alineamiento de secuencias fue realizado con el programa Mega v. 4.1 (Tamura *et al.*, 2007). Las características de los cebadores diseñados se pueden observar en el Cuadro 6 y la posición de cada par de oligonucleótidos se ilustra en la figura 14.

Cuadro 6. Características de los cebadores

CEBADOR	SECUENCIA 5´-3´	Tamaño (pb)	Tm	%GC	%GC+AT
CESA1-FWD	CMAGGAAATGGGTDC	16	51	50	52
CESA1-REV	CRTATTCTCTTCATWGCTCT WT	24	46	49	53

CESA2-FWD	TATGTTTCTCGTGAAARCG	19	52	55	58
CESA2-REV	YGTARTGATCACAATCAAGATT	22	54	50	54

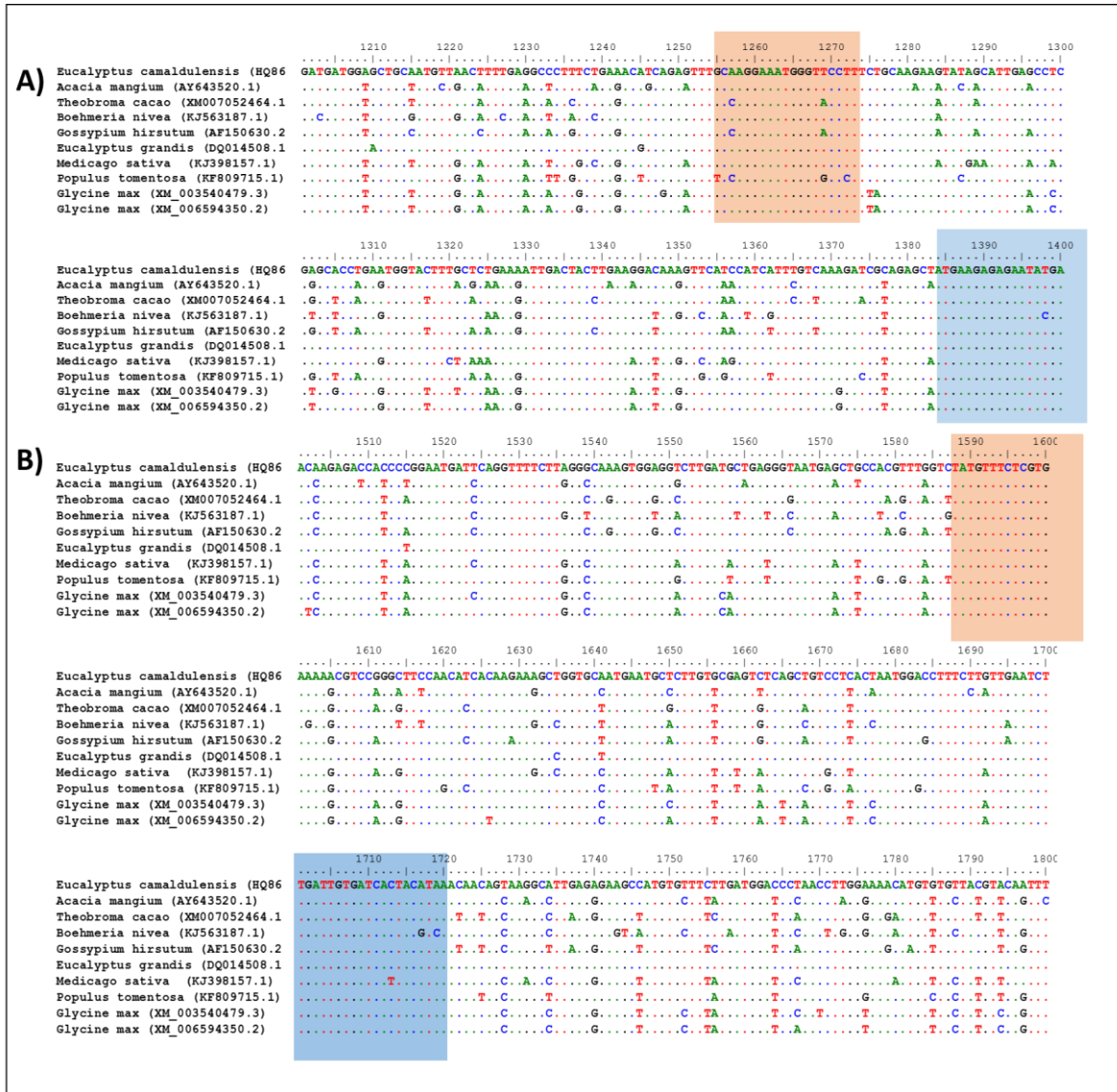


Figura 14. Alineamiento de secuencias parciales de genes celulosa sintasa en 10 especies de plantas. Se indica la posición de los oligonucleótidos diseñados A) primer par de oligonucleótidos llamados CESA1-F Y CESA1-R B) Segundo par de oligonucleótidos llamados CESA2-F Y CESA2-R. Los cuadros rosas denotan la posición de los oligonucleótidos en posición derecha y los cuadros azules denotan la posición de los oligonucleótidos en orientación reverso.

3.5 CLONACIÓN Y SECUENCIACIÓN

Los amplicones obtenidos por PCR de los tamaños esperados para cada gen fueron clonados en el vector p-GEM T-easy. Las reacciones de ligación se realizaron siguiendo las recomendaciones del proveedor, se utilizaron 50 ng/ μ l del producto de PCR, 1 μ l de ligasa T4, 4 μ l de buffer de ligación y 50 ng / μ l del vector p-GEM en un volumen total de 10 μ l. El producto de la ligación se utilizará para transformar células competentes DH10B, mediante la técnica de choque térmico. Las bacterias recombinantes fueron seleccionadas en un medio con 50 μ g/ml de ampicilina, 50 μ g/ml de X-gal y 30 μ l de IPTG.

Para la extracción de plásmidos se utilizó el método de Birnboim & Doyle (1979). Se seleccionaron 10 colonias recombinantes mediante técnicas estériles, las cuales fueron puestas a 37 °C en medio LB líquido con ampicilina (50 μ g/ml) toda la noche; transcurrido el tiempo las bacterias se colectaron por centrifugación a 10000 rpm durante 3 minutos. Las pastillas fueron resuspendidas en 200 μ l amortiguador de resuspensión (50 mM tris-HCl pH 8 y 20mM EDTA); posteriormente, se agregaron 200 μ l del amortiguador de lisis (0.2 M NaOH Y 1 % SDS) y se mezcló por inversión. Las muestras fueron incubadas a 4 °C durante 5 minutos. Posteriormente, se adicionaron 150 μ l del amortiguador de precipitación (3.1 M Acetato de potasio, pH 5.5) agitando por inversión e incubando en hielo por 5 minutos. Las muestras fueron incubadas a – 20 °C durante 3 horas. Se centrifugó a 14,000 rpm a 4 °C por 20 minutos. Se retiró el sobrenadante dejando secar la pastilla para su posterior resuspensión en 25 μ l de agua ultrapura.

Para la verificar la presencia de los insertos en los plásmidos recombinantes, se realizó la amplificación del inserto usando oligonucleótidos universales M13 REV (-24) 5'AACAGCTATGACCARG Y M13 FW (-40) 5' GTTTTCCCAGTCACGAC, que se posicionan en los extremos del sitio múltiple de clonación del vector.

3.6 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

Con el objetivo de conocer la identidad de los fragmentos clonados, se procedió a analizar las secuencias. Con las secuencias obtenidas se realizaron Blastn

(https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch) y mediante el software Mega v. 4.1 (Tamura *et al.*, 2007), se realizaron alineamientos con secuencias de celulosa sintasa referentes a 20 accesiones de plantas. Se realizaron cladogramas correspondientes a las secuencias nucleótidas y aminoacídicas mediante el método Neighbor-Joining con un Bootstrap de 1000 repeticiones.

Se realizó la digestión del ADN plasmidico con la enzima de restricción *Eco* R1. El tampón de reacción se seleccionó siguiendo las instrucciones del fabricante. Las digestiones se incubaron a 37° C durante 1 hora y en todas ellas se utilizó 1 µl de enzima, 2 µl del buffer 10x, 7 µl de AND plasmidico y 6.3 µl de agua ultrapura con un volumen final para 10 µl.

Los fragmentos clonados se enviaron a secuenciar a MACROGEN (# 60-24, Gasan-dong, Geumchen-gu), en seul, Corea.

3.7 PCR TIEMPO REAL (CUANTIFICACIÓN RELATIVA)

Para la estandarización de la expresión del gen constitutivo 18's, inicialmente se evaluó la especificidad de los cebadores. Se realizó una qPCR usando ADNc de cada muestra. La mezcla de reacción usada para este propósito consistió de 5uL de Master mix, 1uL de primer fw, 1uL de primer Rev y 2uL de cDNA ajustado a 100ng/uL. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes 94°C por 10min, 35 ciclos de 94°C por 1 min, 64°C por 1 min y 72°C por 5 min. Al término de los ciclos se procedió a la extensión final realizada a 72°C por 1 min. Terminado la PCR se procedió a programar la construcción de una curva de fusión bajo las siguientes condiciones; 95°C 15 seg, 60°C 1min y 95°C 15 seg,

Debido a que los valores de Ct, de cada muestra estuvieron dentro del rango 10-20 ciclos y las curvas de fusión demostraron la especificidad de los cebadores utilizados (Figura 15).

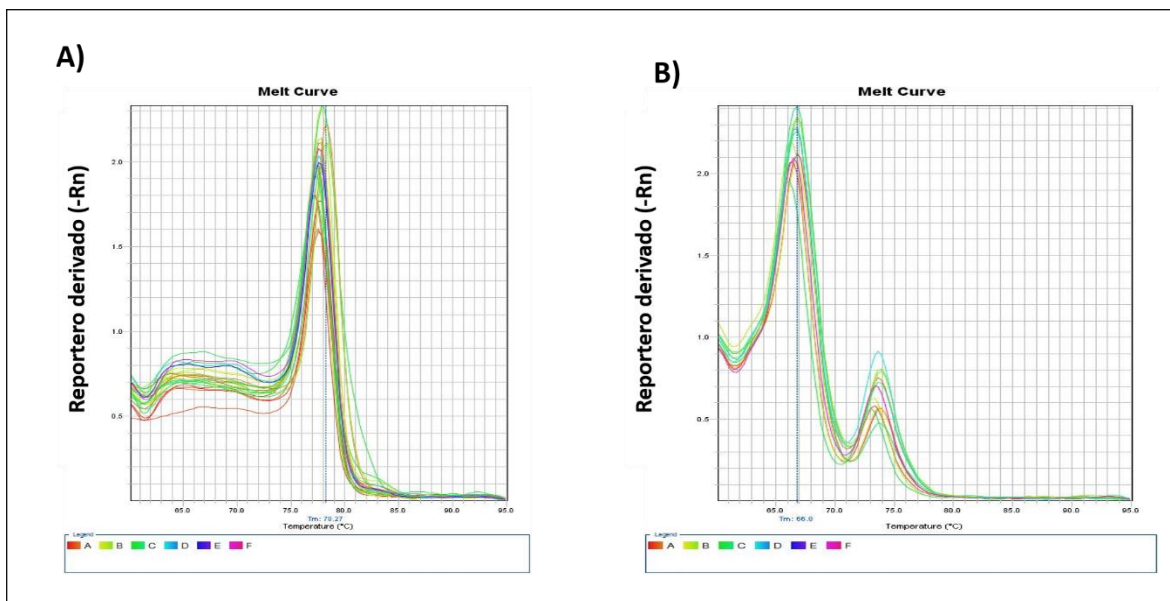


Figura 15. Curva de disociación del gen constitutivo 18S ADNr (A) y curva de disociación del gen CESA (B).

Se utilizó el método de cuantificación relativa (Pfaffl, 2001; Dorak, 2003; Bustin 2003; Marmagne *et al.*, 2009). La expresión de genes se calcula de acuerdo al valor Ct, el cual se encuentra relacionado con la concentración inicial de cDNA, que nos indica los niveles de expresión por cada muestra.

Para esto, primero se calcula la ΔCt , parámetro que consiste en calcular el cambio del ciclo umbral de un gen de interés respecto al ciclo umbral de un gen de referencia, es decir, que la $\Delta Ct = Ct_{\text{gen}} - Ct_{\text{normalizador}}$. La ΔCt de la muestra que presente el valor más alto se le denomina ΔCt de la línea base. Este valor se restará al valor de ΔCt de las otras muestras y se la denominará $\Delta\Delta Ct$ ($\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{línea base}} - \Delta Ct_{\text{muestra}}$). El último paso en la comparación del nivel de expresión es calcular las unidades relativas con la fórmula: $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Los niveles de transcripción de cada gen, fueron calculados utilizando el método comparativo Ct, como se muestra en la siguiente ecuación.

$$\Delta Ct = Ct \text{ gen de interés} - Ct \text{ gen endógeno}$$

3.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos de expresión relativa del gen CESA, para las plantas de *Agave fourcroydes* de diferente talla, fueron analizados y graficados usando los softwares SAS/STAS (statistical Analysis Software) y Origin 9.1 (Data analysis and graphing software). Un análisis de varianza de una vía (ANOVA) se llevó a cabo, usando la prueba de Tukey con un $P \leq 0.05$.

3.9 RESULTADOS

3.9.1 AMPLIFICACIÓN DE FRAGMENTOS CORRESPONDIENTES AL GEN DE CELULOSA SINTASA (CESA) EN *A. fourcroydes*.

La utilización de los oligonucleótidos CESA1-F y CESA1-R para la amplificación de genes celulosa sintasa dio como resultado amplicones inespecíficos no correspondientes al fragmento del tamaño esperado (130 pb) (figura 16A), por lo que se decidió a descartar estos cebadores

Por su parte el uso de los oligonucleótidos CESA2-F y CESA2-R dio como resultado la amplificación un fragmento de aproximadamente 250 pb, 100 pb mayor al esperado. Este fragmento amplificado logró observarse cuando se utilizaron T_m óptimas de alineamiento en un rango de 45°C a 53°C (figura 16B).

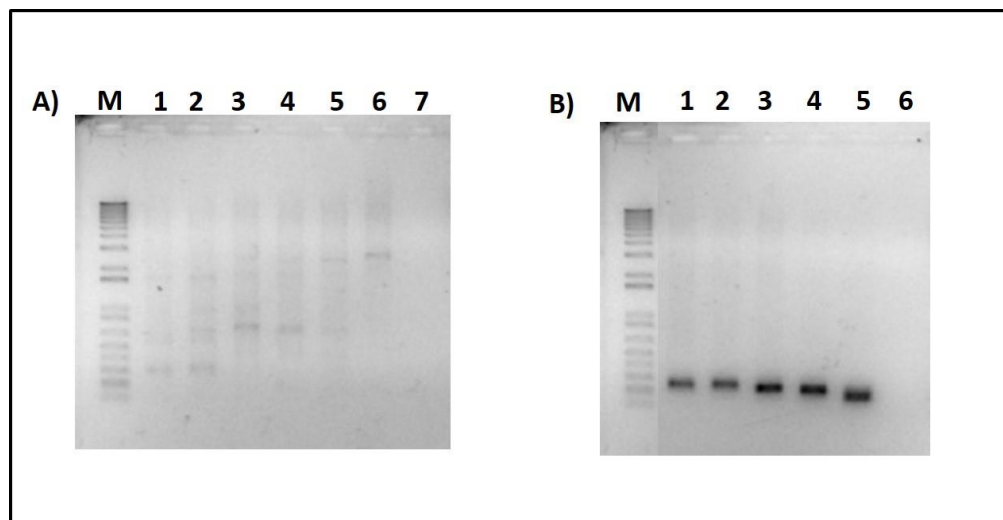


Figura 16. Gel de electroforesis al 1% de agarosa. Se ilustran fragmentos obtenidos por PCR, utilizando los juegos de oligonucleótidos CESA1-F y CESA1-R (A); CESA2-F y CESA2-R (B). Las amplificaciones de fragmentos fueron realizadas a temperaturas óptimas de 1= 45°C, 2=47°C, 3= 49°C, 4= 51°C, 5=53°C, 6=55°C y 7= control, para el caso del inciso A) y para el inciso B) 1= 47°C, 2=49°C, 3= 51°C, 4= 53°C, 5=55°C, 6= control (H_2O fue utilizado como molde de amplificación).

3.9.2 RELACIÓN DEL GEN CELULOSA SINTASA DE *A. fourcroydes* CON OTRAS ACCESIONES DE PLANTAS.

Con el objetivo de conocer la identidad de los fragmentos amplificados, estos fueron clonados en el vector pGEM T-easy, en el cual obtuvimos 10 clonas que posteriormente enviamos a secuenciar. El análisis de la secuencia nucleotídica de este fragmento indicó que presenta un tamaño de 221 pb (la cual 80 % corresponde a la región intrónica y 141 pb corresponde a la amplificación del ADNc, o bien a la región que se transcribe), obteniendo porcentajes de indentidad del 100 % para Cesa 8 en *Zea mays*, 90 % de indentidad para Cesa 3 *Linum usitatissimum* L. entre otras accesiones de plantas .analizadas.

Con la secuencia nucleotídica de 141pb construimos un cladograma para realizar las relaciones filogenéticas del gen de celulosa sintasa de *A. fourcroydes* con genes reportados en otras especies de plantas. (Figura 17).

Se observaron dos grandes grupos de secuencias. En el primer grupo la secuencia parcial de celulosa sintasa (221pb) amplificada a partir de ADN de *A. fourcroydes* se encontró más relacionada con especies de plantas como *Zea mays*, *Bambusa oldhamii*, *Linum usitatissimum* y *Musa acuminata* subsp. Malancensis, *Eucalyptos* spp., entre otras especies de plantas.

Por otro lado, en el segundo grupo observamos especies de plantas que no se relacionaron tan cercanamente a *A. fourcroydes*, como son *Bambusa oldhamii*, *Nicotiana tomentosiformis*, *Acacia mangium*, *Medicago* spp., y *Glicine max*, entre otros.

El soporte principal del primer grupo de plantas (en donde se encuentra *A. fourcroydes*), fue del 68%, indicando que en este trabajo la identidad del fragmento parcial del gen CesaA, fue identificado.

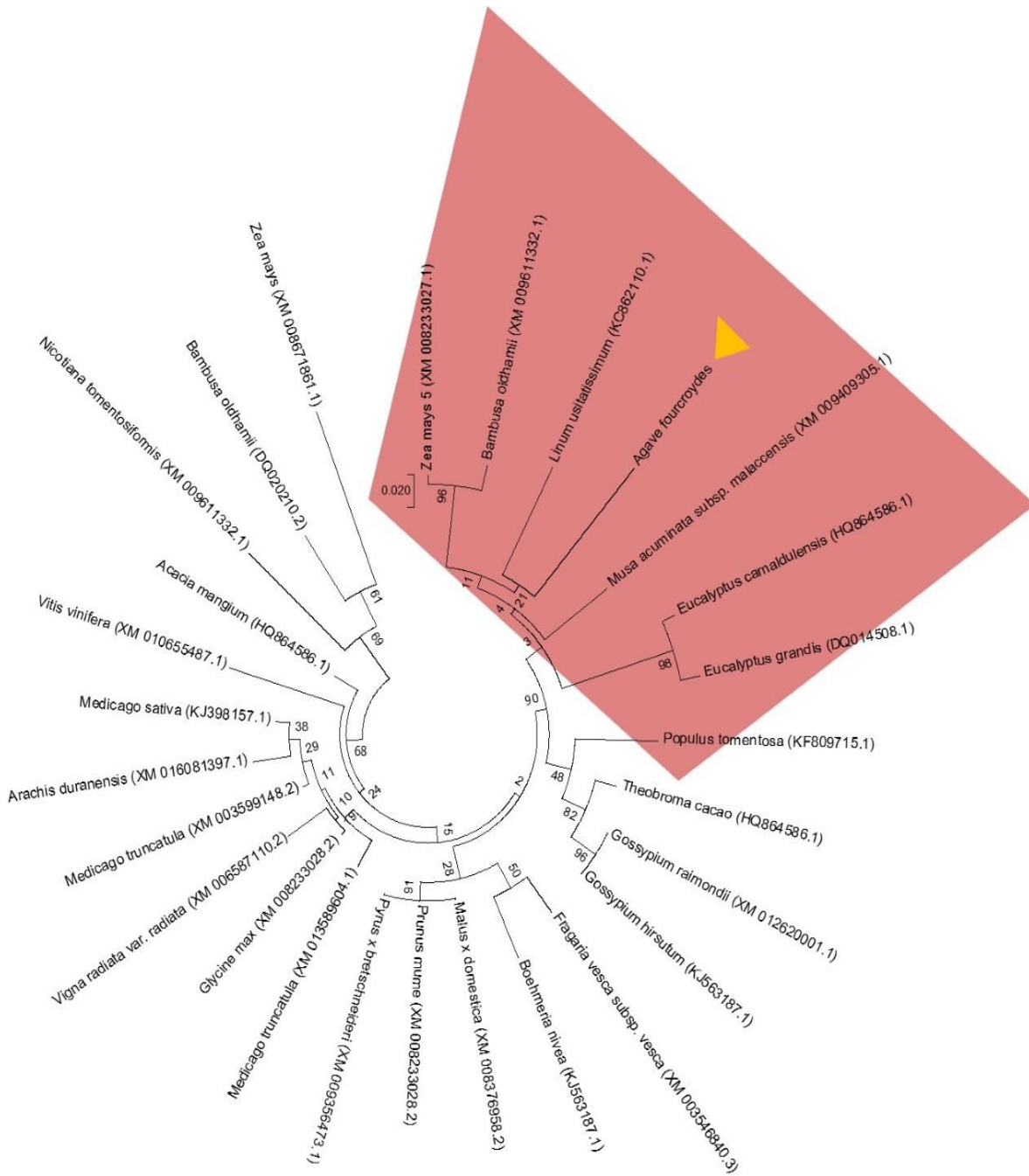


Figura 17. Cladograma del dominio celulosa sintasa en 26 accesiones de plantas. El método usado fue Neighbor-Joining con un Bootstrap de 1000 repeticiones. Las ramas principales son soportadas por valores de bootstrap de 69% y 68% y la formación de un subgrupo con 90 %.

3.9.3 EVALUACIÓN DE TRANSCRITOS DE GENES PARCIALES CODIFICANTES DEL DOMINIO CELULOSA SINTASA EN PLANTAS DE *A. fourcroydes*.

Se obtuvo la amplificación de un fragmento de 141 bp por la técnica de qPCR utilizando los cebadores CESA2-F y CESA2-R. El Análisis de CCD (base de datos de dominios conservados) indicó que corresponde al dominio de glicosil transferasas y de acuerdo a análisis de BLASTn se encontró una identidad del 90% y una cobertura del 93% cuando se comparó con transcritos del gen de CESA de *Glycine max* y otras accesiones de plantas.

Por su parte el análisis de expresión relativa del transcrito CESA en plantas de *A. fourcroydes* de diferentes tamaños, indicó una expresión diferencial según el tamaño de la planta (Figura 18). Análisis estadísticos (prueba de tukey) soportaron diferencias estadísticas significativas, entre las plantas bajas y medias en comparación a las plantas altas. Las plantas bajas y medias presentan una menor expresión relativa de CESA, las plantas altas presentan mayor expresión relativa (de 2 a 4 veces más), indicando que existe de 1 a 3 veces más transcritos en comparación a las plantas medias y bajas.

Las plantas altas que presentan mayor expresión relativa del gen CESA, también demostraron presentar mayor porcentaje de celulosa, sugiriendo una posible participación en la producción de fibra en plantas de *A. fourcroydes* de 139 cm de tamaño. Al parecer a pesar de que las plantaciones de *A. fourcroydes* corresponden a la misma edad (5 años aproximadamente), según el tamaño de las plantas presenta una expresión diferencial en la expresión de genes CESA.

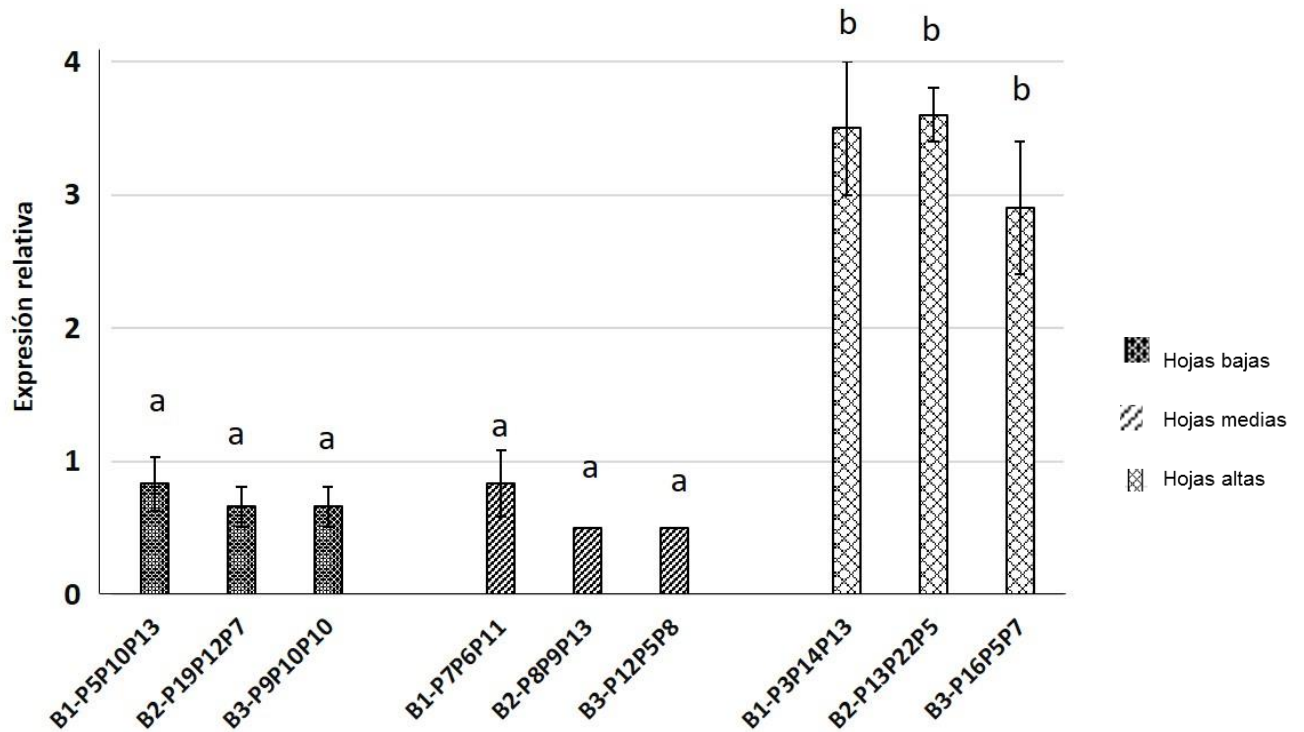


Figura 18. Expresión relativa de genes codificantes del dominio glicosil transferasa del gen CESA en plantas de *A. fourcroydes* de diferente tamaño. Las letras a, b y c corresponde a la comparación múltiple de las muestras por triplicado por medio de la prueba tukey y Los patrones graficos en las barras equivalen a la diferencia estadística presente entre las 3 clases de datos analizados.

3. 10 DISCUSIÓN

En la actualidad existen pocas investigaciones dirigidas a conocer la expresión de genes Cesa. Sin embargo, se ha reportado la identificación de más de un tipo de gen Cesa. En *Arabidopsis* al menos se han identificado 10 genes Cesa, que han demostrado estar involucrados en diferentes procesos de síntesis de pared. AtCesA1, AtCesA3, y AtCesA6 han demostrado ser requeridos en la síntesis de pared primaria (Arioli *et al.*, 1998; Scheible *et al.*, 2001; Beeckman *et al.*, 2002; Burn *et al.*, 2002; Desprez *et al.*, 2002; Doblin *et al.*, 2002; Zhong *et al.*, 2003). Por su parte AtCesA4, AtCesA7, and AtCesA8 al parecer participan en la biosíntesis de la celulosa de la pared secundaria (Taylor *et al.*, 1999, 2000, 2003; Gardiner *et al.*, 2003), y finalmente aún se desconocen las funciones de AtCesA2, AtCesA5, AtCesA9, and AtCesA10.

En álamo se ha identificado que los genes PtrCesA1, PtrCesA2, y PtrCesA3 se encuentran involucrados en la formación de la pared secundaria, por su parte los genes PtrCesA4, PtrCesA5, PtrCesA6, y PtrCesA7 se relacionan con la biosíntesis de la pared primaria (Joshi *et al.*, 2004). En maíz se han reportado 12 genes CESA, donde ZmCesA10, ZmCesA11, y ZmCesA12, mediante análisis filogenéticos han demostrado ser homólogos de los genes AtCesA4, AtCesA7, y AtCesA8, indicando su posible participación en la formación de la pared secundaria.

En este trabajo la secuencia de 221 pb de *A. fourcroydes*, indicó presentar identidad del 85% y una cobertura de 94% con el gen Ces5 de *Zea mays*, indicando que posiblemente el gen CESA identificado en *A. fourcroydes* corresponda a una isoforma del tipo 5 ya reportado en plantas.

En general la expresión de genes CESA participan en procesos que involucran la formación de la pared celular primaria y secundaria (Appenzeller *et al.*, 2004) y a pesar de que a la fecha se desconoce cuál es la función principal de la isoforma 5 del gen CESA en *Zea Mays*, en álamo (*populus*), el PtrCesA5 se ha relacionado con la biosíntesis de la pared primaria. Esta misma tendencia también se ha demostrado en la isoforma del gen Ces5 de *Gossypium* spp (Li *et al.*, 2013).

En *Gossypium hirsutum* y *Gossypium barbadense* el análisis de co-expresión indicaron que CESA1, CESA2, CESA7 y CESA8 fueron las isoformas que presentan una

mayor expresión durante la etapa de biosíntesis de la pared secundaria (figura 19). Por su parte las isoformas CESA3, CESA5, CESA6, CESA9 y CESA10 demostraron estar involucradas en procesos relacionados a la formación de la pared primaria para la iniciación de la fibra de algodón y en su elongación.

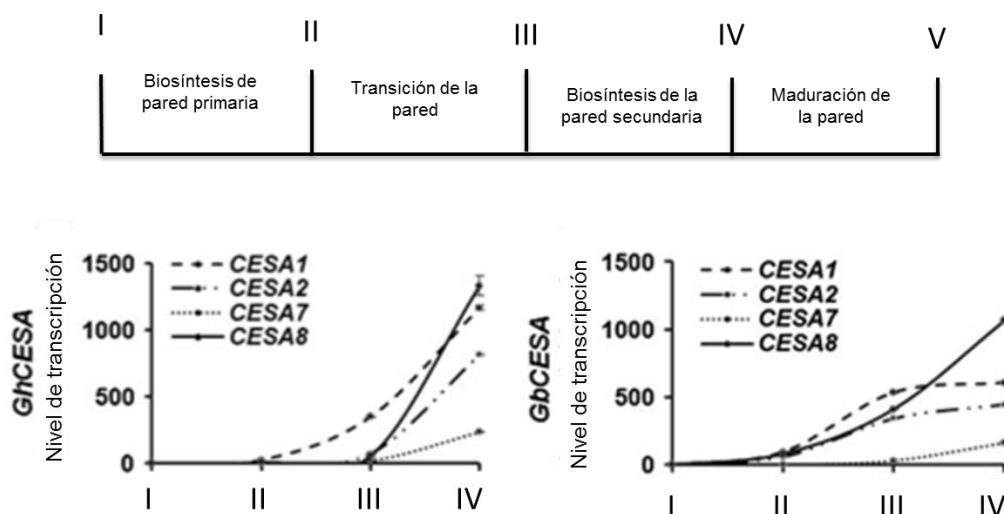


Figura 9. Nivel de transcripción de CESA en las diferentes etapas de la formación de la fibra en algodón. (Tomado y modificado de Li *et al.*, 2013)

Analizando la expresión relativa del gen CESA-5 de *A. fourcroydes*, en plantas de diferentes tamaños, se observó que la expresión de este gen es diferencial, encontrándose valores más altos de expresión relativa en las plantas de mayor tamaño (de 1 a 3 veces más) en comparación a las plantas bajas y medias. Este resultado resulta interesante ya que las plantas de mayor tamaño también han demostrado presentar mayores valores de celulosa, peso fresco y peso seco (ver capítulo II).

Encontrar valores más altos de expresión relativa en las plantas de mayor tamaño en comparación a las plantas de tamaño medio y bajo, podría deberse a que las células de las plantas grandes, son de mayor tamaño, y por tanto se requiere mayor biosíntesis de genes relacionados al mantenimiento y formación de la pared primaria y secundaria. En *Agave spp.*, se ha demostrado el fenómeno gigas, presentes en especies poliploides. Tamayo-ordoñez *et al.*, 2016, analizando 3 especies con diferente nivel de ploidía demostró que las plantas poliploides con mayor nivel de ploidía como *A. fourcroydes* Kitam Ki (3X), *A. fourcroydes* Sac Kl (5X) y *A. angustifolia* Chelem ki (3X), demostraron

presentar menor número de núcleos pero de mayor tamaño, sugiriendo que las células en estas especies podrían ser más grandes (fenómeno gigas). Además analizando la cantidad total de células estomáticas (densidad estomática) demostraron la misma tendencia. Los estomas se encuentran representados en menor número pero son más grandes en comparación a sus especies con menor nivel de ploidia, sugiriendo que en especies poliploides de *Agave* (incluida *A. fourcroydes*), es posible que las células presente mayor tamaño celular.

Dentro de este mismo contexto, si nosotros tenemos plantas de diferente tamaño, el número de células total en las plantas más altas, contendrá mayor número de células en comparación a las plantas medias y bajas. Por tanto es posible que exclusivamente en estas plantas de mayor tamaño se requiera mayor expresión de genes involucrados en el mantenimiento y formación de la pared primaria y secundaria. Coincidiendo con una mayor expresión del gen *Ces5* de *A. fourcroydes* en plantas altas.

Por otra parte, las plantas al menos están compuestas por 40 tipos de células diferentes, por lo que la comprensión de la expansión y formación de las células es difícil de generalizar. Sin embargo, estudios realizados en el modelo de algodón han indicado que durante la biosíntesis de la pared secundaria, los genes CESA juegan un papel importante. Yong-Ling *et al.*, (2007), propuso un modelo de incorporación de fuentes de carbono (sacarosa) durante la biosíntesis de la pared celular secundaria (figura 20). Inicialmente durante la biosíntesis de la pared celular secundaria, la proteína Sus (sacarosa sintasa), se encuentra asociada a la membrana plasmática. SUS-PM puede formar un complejo directo o indirecto con la celulosa sintasa (CESA), enzima que puede catalizar la reacción de adición de una molécula glucosa a una cadena de celulosa en formación. La fructosa igual puede ser reciclada a celulosa mediante la acción de las enzimas fructoquininas, hexoquininas, hexoquinasa, sacarosa fosfatasa.

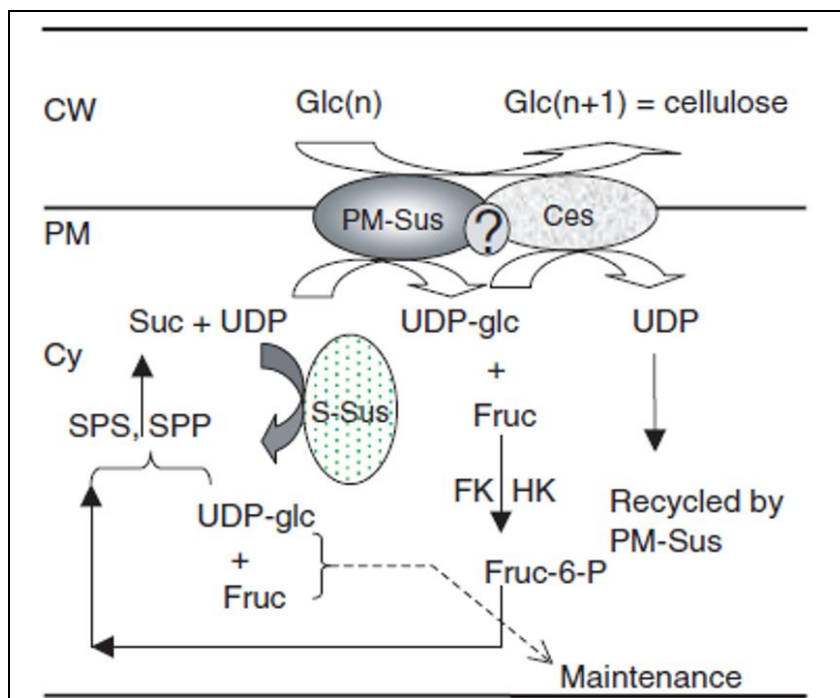


Figura 10. Incorporación de sacarosa en la pared celular. Durante la biosíntesis de la pared celular secundaria, la proteína Sus (sacarosa sintasa), se encuentra asociada a la membrana plasmática. SUS-PM puede formar un complejo directo o indirecto con la celulosa sintasa (ces), La fructosa igual puede ser reciclada a celulosa mediante la acción de las enzimas fructoquiinasas (FK), hexoquiinasas (HK), sacarosa fosfatasa (SSP). Finalmente la sacarosa sintasa soluble puede degradar la sacarosa y utilizarla para el mantenimiento y el metabolismo de glicolisis (tomado de Yong-ling *et al.*, 2007).

Haigler *et al.*, 2007 proporciona un método para aumentar la calidad de la fibra de algodón, introduciendo en una planta de algodón una construcción quimérica de ADN que expresa sacarosa fosfato sintasa, donde esta proteína interviene en el metabolismo de carbono de las plantas dirigiendo el flujo de carbono de celulosa para optimizar el nivel de producción y la calidad de la fibra en algodón.

A pesar de que los cultivos de *A. fourcroydes*, a partir de los cuales se realizó la colecta presentan la misma edad (5 años), las variaciones encontradas respecto al tamaño de las plantas y expresión de genes CesA así como su producción de fibra, indica

que los factores como el clima, las precipitaciones, el tipo de suelo, entre otros, (Sims, 2003) juegan un papel primordial en el desarrollo de las plantaciones de *Agave*. Debido a la morfología que presenta *A. fourcroydes* y a sus características propias de su fibra, tal vez sería importante enfatizar la mejora en este cultivo en el estado de Yucatán, hasta obtener valores similares en porcentaje de celulosa a los reportados en otras plantas de *A. fourcroydes* cultivados en otros estados del país.

CAPITULO IV

4 DISCUSIÓN GENERAL

Agave es un género de gran importancia ecológica y económica para el país. El hombre ha utilizado esta planta en la industria tequilera, en la industria textil, en la industria de alimentos y actualmente en la industria farmacéutica (Good-Avila, 2006). Debido a que se propagan vegetativamente, con excepción del híbrido comercial H11648 (*A. angustifolia* x *A. amaniensis* bc *A. amaniensis*) (Lock, 1962) desarrollado a mediados del siglo pasado, los *Agaves* nunca han sido mejorados genéticamente, sin embargo se han clonado individuos elite, empleando el cultivo de tejidos vegetales (Aureoles *et al.*, 2007)

Las especies de la sección *Rigidae* y *Sisalanae*, son utilizadas en la industria textil, donde la fibra es utilizada para la elaboración de cordeles, tejidos, redes, sacos, muebles, cojines, sandalias, canastos, cepillos y una extensa variedad de productos. Específicamente en México, las especies *Agave lechugilla*, *Agave angustifolia* y *Agave fourcroydes* se utilizan para la producción de fibra (Castorena-Sanchez *et al.*, 1991; Mayorga-Hernández *et al.*, 2004; Msahli *et al.*, 2006; Hulle *et al.*, 2015; Robert *et al.*, 1987). Durante los siglos XIX y XX el cultivo del henequén (*Agave fourcroydes*) fue una de las industrias mejor desarrolladas en Yucatán. Sin embargo, esta industria decayó debido a la sobreexplotación de las especies de *Agave* y a la falta de conocimiento en la mejora de prácticas de cultivo y conocimiento básico acerca de la producción de fibra en *Agave*.

Tal como lo hemos fundamentado en esta tesis, *Agave* a pesar de que es una especie utilizada en la producción de fibra, a la fecha no se conoce si en la producción de polímeros naturales se encuentra relacionado a la expresión de genes codificantes de glucanasas, expansinas, sacarosa sintasa y celulosa sintasa, como se ha demostrado en otras especies de plantas como *Gossypium hirsutum* y *Linum usitatissimum*. Con la finalidad de obtener información de cómo se relaciona la expresión de genes con la producción de fibra en *agave*, en esta tesis abordamos el estudio de la expresión de genes (CESA) de *A. fourcroydes*.

Tal como se desglosó en el capítulo II y III de esta tesis, se evaluó la cantidad de fibra en plantas de diferente tamaño, las plantas de *A. fourcroydes* de tamaños de 139,

110 y 75 cm presentaron 48, 24 y 8% de celulosa respectivamente, demostrando que las plantas de mayor tamaño son las que presentan mayor contenido de celulosa. Además estas plantas también reflejaron el mayor nivel de expresión global del gen CESA de acuerdo a la qPCR. En la figura 20 se presentan los factores que podrían estar influyendo en los resultados encontrados en este trabajo.

La morfología y el contenido total de células presentes en hojas de tamaño medias, bajas y altas de *Agave fourcroydes*, puede ser diferente, encontrando mayor número de células en las hojas altas en comparación a las medias y bajas (figura 21 A), esto podría ocasionar que también en plantas con hojas de mayor tamaño se presente mayor contenido de celulosa debido a que este es un componente principal de la pared secundaria y primaria (figura 21 B). Como consecuencia de la alta demanda de celulosa, podría ser necesario que en estas plantas exista una mayor expresión de genes involucrados en la formación de la pared primaria y secundaria de la célula (por ejemplo celulosa sintasa, expansinas, glucanasas, endoxiloglucanos, sacarosa sintasa) (figura 21 C). Todos los cambios moleculares y fenotípicos en estas plantas, podrán relacionarse a una mayor calidad de fibra. (Figura 21 D), ya que las hojas de mayor tamaño contienen mayor porcentaje de celulosa y la calidad está dada por la longitud y el contenido de celulosa. (Haigler *et al.*, 2005).

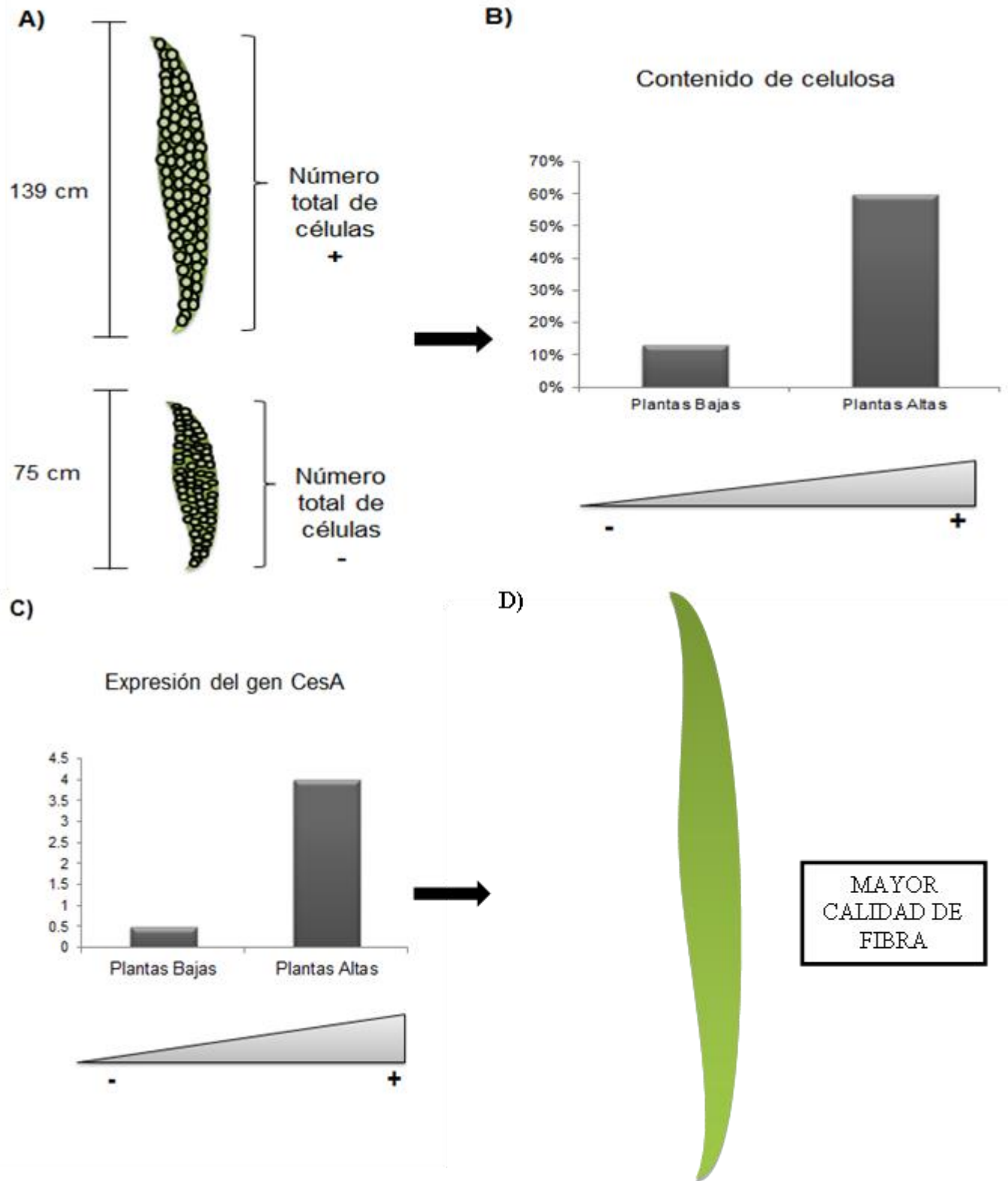


Fig. 21. Modelo propuesto del comportamiento de genes CESA y contenido de celulosa en plantas de diferente tamaño de *A. fourcroydes*. A) Plantas de mayor tamaño, tendrán mayor número total de células en comparación a plantas de menor tamaño, B) de acuerdo a la demanda requerida de cada planta, se pueden presentar diferentes perfiles de expresión de genes involucrados en la formación de la pared primaria y secundaria. Altos contenidos de celulosa serán acompañadas de mayores niveles de expresión del gen CESA y C) finalmente todos los cambios biosintéticos y moleculares llevarán a una mayor calidad de fibra en plantas de mayor tamaño.

Por otra parte, tal como lo sustentan los valores de celulosa reportados en otros trabajos, en especies de *Agave* oscilan entre 43 a 79.8 (Vieira *et al.*, 2002). Los mayores valores de celulosa, han sido mayormente reportados para la especie de *A. fourcroydes* y *A. Lechugilla* ($\geq 76\%$) (Márquez *et al.*, 1996). Los valores de celulosa reportados en este trabajo (46%) fueron 1.8 veces menores a los reportados en literatura para *A. fourcroydes*.

Por otra parte en la industria de fibras, las especies de *Agave* con hojas delgadas, como *A. lechuguilla* y *A. fourcroydes*, han demostrado presentar mejores características en sus fibras que les permiten una mejor manipulación y utilización en la elaboración de papel y otros usos (Negrete *et al.*, 2010). Además se ha descrito que las propiedades físicas y mecánicas de las fibras de *Agave* en general son uniformes en la sección media y la morfología de la fibra de henequén es similar a la de otras fibras duras naturales como el yute y abacá (Cazaurang, 1991). Por lo que resulta importante que se desarrollen protocolos e iniciativas dirigidas a la mejora del cultivo de *A. fourcroydes* en el estado de Yucatán, hasta obtener valores similares en porcentaje de celulosa a los reportados en otras plantas de *A. fourcroydes* cultivados en otros estados del país.

Finalmente, las variaciones encontradas respecto al tamaño de las plantas y expresión de genes CESA así como su producción de fibra, indica que los factores como el clima, las precipitaciones, el tipo de suelo, entre otros, (Sims, 2003), podrían estar afectando al desarrollo de *Agave fourcroydes*, recalcando que estos factores podría tomarse en cuenta al momento de iniciar estrategias dirigidas a la mejora del cultivo de *A. fourcroydes* en el estado de Yucatán.

4.1 CONCLUSIONES

Las fibras de mayor tamaño (139 cm) tuvieron mayor contenido de celulosa, la hoja más larga obtuvo un 60 % de celulosa y la hoja más pequeña un 8 % de celulosa, esto nos indica que a una mayor longitud mayor será el contenido de celulosa y a su vez mayor fibra.

Todas las plantas se encontraban en las mismas condiciones para su crecimiento, actividad metabólica y supervivencia ya que a pesar de tener diferencias en el tamaño de las plantas, todas las hojas muestreadas contenían aproximadamente 77 % de agua.

De acuerdo a la expresión diferencial del gen de celulosa sintasa en los diferentes tamaños, en hojas bajas y media la expresión fue muy similar, obteniendo una muy baja expresión del gen de celulosa sintasa, mientras que el análisis de expresión del gen para plantas altas fue de 2 a 4 veces mayor en comparación a los otros tamaños.

4.2 PERSPECTIVAS

Para lograr una correlación en el contenido de celulosa con la expresión del gen de celulosa sintasa, se necesita realizar la actividad enzimática lo que se esperaría que a mayor cuantificación, mayor expresión y que la enzima CESA tenga mayor actividad.

Por otra parte la búsqueda de nuevos genes involucrados en la formación de la fibra para posteriormente realizar la sobreexpresión de genes y así obtener hojas con mayor longitud y a su vez mayor fibra.

De otra manera se podría implementar un marcador de selección morfológica para plantas de mayor calidad de fibra para lograr tener una producción de mejora, esto se lograría con la selección por el fenotipo de los individuos de interés con características distintivas, el empleo de estos marcadores en el proceso rutinario de un programa de mejora, no solamente aceleraría el proceso de transferencia génica, sino también permite combinar diferentes genes deseables provenientes de diversas fuentes, con el objetivo de elevar el nivel de expresión del carácter de interés, desechar los genes que no interesan, sobre todo, cuando el donante es una especie silvestre y recuperar con más rapidez y efectividad el genoma del parental recurrente.

BIBLIOGRAFÍA

Hulle, A., Kadole, P., & Katkar, P. (2015). *Agave Americana* Leaf Fibers. *Fibers*, 3(1), 64-75.

Javier Sampedro*,†, Mara Guttman‡, Lian-Chao Li§ and Daniel J. Cosgrove*, (2015), Evolutionary divergence of b–expansin structure and function in grasses parallels emergence of distinctive primary cell wall traits. *The Plant Journal* 81, 108–120

Oury, T.D., Roggli, V.L., & Sporn, T.A, (2014). Pathology of asbestos-associated diseases. *Springer*.

Roggli, V.L., & Sharma, A (2014). Analysis of tissue mineral fiber content. In Pathology of asbestos-associated diseases (pp. 253-292). *Springer Berlin Heidelberg*.

Mylsamy, K. (2013). Studies on *Agave Americana* fibre reinforced composite materials. <http://hdl.handle.net/10603/9875>

Stephen M Gross, Jeffrey A Martin, June Simpson, María Jazmín Abraham-Juarez, Zhong Wang and Axel Visel*, (2013), De novo transcriptome assembly of drought tolerant CAM plants, *Agave deserti* and *Agave tequilana*,. *BMC Genomics* 2013, 14:563

Angelini, L.G., & tavarini, S. (2013). Ramie (*Boehmeria nivea* (L.) Gaud.) as a potential new fibre crop for the mediterranean región: Growth, crop yield and fibre quality in a long-term field experiment in central Italy. *Industrial Crops and products*. 51, 138-144.

Li, A., Xia, T., Xu, W., Chen, T., Li, X., Fan, J., ... & Peng, L. (2013). An integrative analysis of four CESA isoforms specific for fiber cellulose production between *Gossypium hirsutum* and *Gossypium barbadense*. *Planta*, 237(6), 1585-1597.

Sghaier, A. E. O. B., Chaabouni, Y., Msahli, S., & Sakli, F. (2012). Morphological and crystalline characterization of NaOH and NaOCl treated *Agave americana* L. fiber. *Industrial Crops and Products*, 36(1), 257-266.

Chattopadhyay, D., & Khan, J. (2012). *Agave Americana*: A New Source of Textile Fibre. *Colourage*, 6, 33-36.

González, I., Infante, D., Peteira, B., Martínez, B., Arias, Y., González, N., & Miranda, I. (2011). Caracterización bioquímica de aislamientos de *Trichoderma* spp. promisorios como agentes de control biológico. II. Expresión de actividad glucanasa. *Revista de Protección Vegetal*, 26(1), 23-29.

Rapp, R.A., haigler, C.H., Flagel L., Hovav, R.H., Udall, J.A., & Wendel, J.F. (2010).gene expression in developing fibres of upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) was massively altered by domestication. *BMC biology* 8 (1), 139.

Hafiza Masooma Naseer Cheema · Aftab Bashir · Asia Khatoon · Nadia Iqbal · Yusuf Zafar, Kauser A. Malik, (2010), Molecular characterization and transcriptome profiling of expansin genes isolated from *Calotropis procera* fibers., *Electronic Journal of Biotechnology* ISSN: 0717-3458

Rowe, T. (Ed.). (2009). Interior textiles: Design and developments. Elsevier.

Del Rio, J. C., Rencoret, J., Marques, G., Li, J., Gellerstedt, G., Jiménez-Barbero, J., & Gutiérrez, A. (2009). Structural characterization of the lignin from jute (*Corchorus capsularis*) fibers. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(21), 10271-10281

FAO. (2009). Proceedings of the symposium on natural fibers. Technical Paper No. 56 .Common Fund for Commodities

Applied Biosystems, (2009), Relative Quantification, Applied Biosystems 7300/7500 Real Time PCR System-Getting Started Guide, Applied Biosystems Publication.

Sinha, E., & Rout, S. K. (2009). Influence of fibre-surface treatment on structural, thermal and mechanical properties of jute fibre and its composite. *Bulletin of Materials Science*, 32(1), 65-76.

Chaplin, M., (2008), Cellulose, <http://www.lsbu.ac.uk/water/hycl.html> (Diciembre, 2009)

Mc Crady, E., (2008), The nature of ligning, <http://cool.conservation.us.org/byorg/abbey/ap/ap04/ap04-4/ap04-402.html>, (Agosto, 2009)

Ali, M. A., Khan, I. A., Awan, S. I., Ali, S., & Niaz, S. (2008). Genetics of fibre quality traits in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Australian Journal of Crop Science*, 2(1), 10-17.

Martínez-Hernández A, Pastrana-Chávez J, Sánchez-Villarreal A, Lara-Reyna J, Herrera-Estrella L, Herrera-Estrella A, Martínez de la Vega O, Simpson-Williamson J .(2007).Colegio de Postgraduados, campus Campeche. Nicaragua 91 3er. Piso Col. Sta. Ana Campeche, Camp. CINVESTAV campus Gto. Genómica de *Agave tequilana*: Identificación de genes útiles para la industria tequilera y el desarrollo de usos alternativos del agave.

Abreu E., González G., Ortiz R., Rodríguez P., Domech R., Garriga M.. (2007,) Evaluación de vitroplantas de Henequén (*Agave fourcroydes lem*) durante la fase de aclimatización. *Cultivos Tropicales*, Vol. 28 (1): 5-11, Cuba.

Gou, J. Y., Wang, L. J., Chen, S. P., Hu, W. L., & Chen, X. Y. (2007). Gene expression and metabolite profiles of cotton fiber during cell elongation and secondary cell wall synthesis. *Cell research*, 17(5), 422-434.

Moreno, L. E., Trujillo, E. E., & Osorio, L. R. (2007). Estudio de las Características físicas de haces de fibra de *Guadua angustifolia*. *Scientia et Technica*, 1(34).

Lamourex F., (2007), Proteoglycans: Key partners in bone cell biology, *Bioessays*, 29, 758

Thamae, T., & Baillie, C. (2007). Influence of fibre extraction method, alkali and silane treatment on the interface of *Agave americana* waste HDPE composites as possible roof ceilings in Lesotho. *Composite Interfaces*, 14(7-9), 821-836.

- Jin, Z., Katsumata, K.S., Lam, T.B.T., & Liyama, K. (2006). Covalent linkages between cellulose and lignin in cell walls of coniferous and nonconiferous Woods. *Biopolymers*, 83 (2), 103-110.
- Msahli, S., Sakli, F., & Drean, J. Y. (2006). Study of textile potential of fibres extracted from Tunisian *Agave Americana* L. *AUTEX Research Journal*, 6(1), 9-13.
- Lerouxel O., Cavalier D.M., Liepman A.H., Keegstra K. (2006). Biosynthesis of plant cell wall polysaccharides a complex process. *Plant biology*, Vol. 5: 621-630
- Somerville, C. (2006). Cellulose synthesis in higher plants. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 22, 53-78.
- García, I. M. R. (2006). Caracterización química de fibras de plantas herbáceas utilizadas para la fabricación de pastas de papel de alta calidad. Universidad de Sevilla.
- Paredes AR, Somerville CR, Ehrhardt DW., (2006). Visualization of cellulose synthase demonstrates functional association with microtubules. *Science*, Vol. 312:1491-1495
- Wong, M., Medrano, J., (2005), Real-time PCR for mRNA quantitation, *Biotechniques*. Vol 39: 1-11
- Guerron, G. (2005), Caracterización y modificación alcalina de la fibra de abacá variedad bungalanon para la elaboración de hilo artesanal, proyecto de titulación previo a la obtención de ingeniero agroindustrial, EPN. Quito, Ecuador, pp: 8-16
- Basaure, F., (2005), Composición química de la celulosa y lignina, [http: / www.manualdelombricultura.com/www.board/messages/9645.html](http://www.manualdelombricultura.com/www.board/messages/9645.html), (Septiembre, 2009)
- Mohanty, A., Misra, M., Drzal, L., (2005), Natural fibers, biopolymers, and biocomposites, Editorial Taylor and Francis, 10ma. Edición, Boca Ratón, Estados Unidos, pp: 41-54
- Kymalainen, H.R., Koivula, M., Kuisma, R., Sjoberg, A.M., & Penkonen, A (2004). Technologically indicative properties of Straw fractions of flax, linseed (*Linum usitatissimum* L.) and fibre hemp (*Cannabis sativa* L.) *Bioresource technology*, 94 (1), 57-63.
- Joshi, C. P., Bhandari, S., Ranjan, P., Kalluri, U. C., Liang, X., Fujino, T., & Samuga, A. (2004). Genomics of cellulose biosynthesis in poplars. *New Phytologist*, 164(1), 53-61.
- Appenzeller, L., Doblin, M., Barreiro, R., Wang, H., Niu, X., Kollipara, K. & Dhugga, K. S. (2004). Cellulose synthesis in maize: isolation and expression analysis of the cellulose synthase (CesA) gene family. *Cellulose*, 11(3-4), 287-299.
- Mayorga-Hernandez, E., Rossel-Kipping, D., Ortiz-Laurel, H., Quero-Carrillo, A. R., & Amante-Orozco, A. (2004). Comparative analysis in the quality of fiber of *Agave lecheguilla* Torr., processed by hand and mechanically. *Agrociencia*, 38(2), 219-225.
- González, G. /. (2004). Una alternativa de la recuperación henequenera de Cuba, mediante el uso de técnicas. *Biotecnología Aplicada*, Vol : 44-49.

- Infante, D. /. (2003). Asexual genetic variability in *Agave*. *Plant Science*: 223-230
- Zhong, R., Morrison, W. H., Freshour, G. D., Hahn, M. G., & Ye, Z. H. (2003). Expression of a mutant form of cellulose synthase AtCesA7 causes dominant negative effect on cellulose biosynthesis. *Plant physiology*, 132(2), 786-795.
- Taylor, N. G., Howells, R. M., Huttly, A. K., Vickers, K., & Turner, S. R. (2003). Interactions among three distinct CesA proteins essential for cellulose synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(3), 1450-1455.
- Gardiner, J. C., Taylor, N. G., & Turner, S. R. (2003). Control of cellulose synthase complex localization in developing xylem. *The plant cell*, 15(8), 1740-1748.
- Sims, I. (2003). Structural diversity of fructans from members of the order *Asparagales* in New Zealand. *Phytochemistry* 63: 351
- TH Sydenstricker, S. M. (2003). Pull-out and other evaluations in sisal-reinforced polyester biocomposites. *Polymer testing*, Vol. 22(4):375-380.
- Yi li, L.J, McQueen, M.S. (2003). Expansins and cell growth., Elsevier, *Current opinion in plant biology*; 6: 603-610
- Ruan YL, Llewellyn DJ, Furbank RT, (2003). Suppression of sucrose synthase gene expression represses cotton fiber cell initiation, elongation, and seed development. *Plant Cell*; 15:952- 964.
- Beeckman, T., Przemeck, G. K., Stamatiou, G., Lau, R., Terry, N., De Rycke, R., & Berleth, T. (2002). Genetic complexity of cellulose synthase A gene function in *Arabidopsis* embryogenesis. *Plant Physiology*, 130(4), 1883-1893.
- Doblin, M. S., Kurek, I., Jacob-Wilk, D., & Delmer, D. P. (2002). Cellulose biosynthesis in plants: from genes to rosettes. *Plant and cell physiology*, 43(12), 1407-1420.
- Burn, J. E., Hocart, C. H., Birch, R. J., Cork, A. C., & Williamson, R. E. (2002). Functional Analysis of the Cellulose Synthase Genes CesA1, CesA2, and CesA3 in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 129(2), 797-807.
- Desprez, T., Vernhettes, S., Fagard, M., Refrégier, G., Desnos, T., Aletti, E., ... & Höfte, H. (2002). Resistance against herbicide isoxaben and cellulose deficiency caused by distinct mutations in same cellulose synthase isoform CESA6. *Plant physiology*, 128(2), 482-490.
- Rennebaum, H., Grimm, E., Warnstorff, K., & Diepenbrock, W. (2002). Fibre quality of linseed (*Linum Usitatissimum* L.) and the assessment of genotypes for use of fibres as a by-product. *Industrial crops and products*, 16 (3), 201-215.
- Gilman, J., Kumar, S., Jain, R., Chae, H., Koziol, K., Windle, A., (2002), Cellulose and silk nanocomposites processing using ionic liquids, www.sameerrahatehar.org/cellulose_silk_IL.html (October, 2009)
- Vieira, M. C., Heinze, T., Antonio-Cruz, R., & Mendoza-Martinez, A. M. (2002). Cellulose derivatives from cellulosic material isolated from *Agave lechuguilla* and *Agave fourcroydes*. *Cellulose*, 9(2), 203-212.

- Harmer SE, Orford SJ, Timmis JN,. (2002). Characterization of six alpha-expansin genes in *Gossypium hirsutum* (upland cotton). *Mol Genet Genomics*; 268:1-9.
- Raff, M., Alberts, B., Lewis, J., Johnson, A., & Roberts, K (2002). *Molecular Biology of the Cell* 4th edition.
- G. Toriz, F. D. (2002). Lignin-polypropylene composites. Part 1: composites from unmodified lignin and polypropylene. *Polym Composite*, Vol 23: 806–811.
- Bustin, S., (2002), Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR(RT-PCR): trend and problems, *Journal of Molecular Endocrinology*, Vol 29: 23-39.
- Applequist, W. L., Cronn, R., & Wendel, J. F. (2001). Comparative development of fiber in wild and cultivated cotton. *Evolution & development*, 3(1), 3-17.
- Scheible, W. R., Eshed, R., Richmond, T., Delmer, D., & Somerville, C. (2001). Modifications of cellulose synthase confer resistance to isoxaben and thiazolidinone herbicides in *Arabidopsis* lxr1 mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(18), 10079-10084.
- Kim, H. J., & Triplett, B. A. (2001). Cotton fiber growth in planta and in vitro. Models for plant cell elongation and cell wall biogenesis. *Plant physiology*,127(4), 1361-1366.
- S.J. Eichhorn, C. B. (2001). Current international research into cellulosic fibres and composites. *J Mater Sci*, Vol. 36:2107–2131.
- Shamte, S. (2000). FAO. “Common Fund for Commodities - Alternative Applications for sisal and henequen, Technical Paper No. 14”,. Roma.
- McPherson JD, Marra M, Hillier L, Waterston RH, Chinwalla A, Wallis J, et al. (2000). A physical map of the human genome. *Nature*, Vol. 409:934-941.
- Taylor NG, Laurie S, Turner SR. (2000). Multiple cellulose synthase catalytic subunits are required for cellulose synthesis in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*,12, 2529–2539.
- A.K. Mohanty, M. M. (2000). Biofibres, biodegradable polymers and biocomposites: an overview. *Macromol Mater Eng*, Vol 276-277: 1–24.
- Richmond, T. A., & Somerville, C. R. (2000). The cellulose synthase superfamily. *Plant physiology*, 124(2), 495-498.
- Orford SJ, Timmis JN, (2000). Expression of a lipid transfer protein gene family during cotton fibre development. *Biochim Biophys Acta* ; 1483:275-284.
- Cosgrove DJ (2000) Loosening of plant cell walls by expansins. *Nature*. 407: 321–326
- Vriezen, W. H., De Graaf, B., Mariani, C. & Vosenek, L. A. C. J., 2000. Submergence induces expansin gene expressin in flooding tolerant *Rumex palustris* and not in flooding intolerant *R. acetosa*. *Planta*. 210, 956–963 .

- Sherman, L. (1999). Natural fibers: the new fashion in automotive plastics. *Plast Technol*, Vol. 45 (10):62-68.
- Hutchison, K. W., Singer, P. B., Diaz-Sala, C. & Greenwood, M. S., (1999). Expansins are conserved in conifers and expressed in response to exogenous auxin. *Plant Physiol.* 120, 827–832 .
- Cosgrove, D. J., (1999). Enzymes and other agents that enhance cell wall extensibility. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50, 391–417 .
- Reinhardt, D., Wittwer, F., Mandel, T. & Kuhlemeier, C.,(1998). Localized upregulation of a new expansin gene predicts the site of leaf formation in the tomato meristem. *Plant Cell* 10, 1427–1437 .
- Orford, S. J. & Timmis, J. N., (1998) .Specific expression of an expansin gene during elongation of cotton fibres. *Biochim. Biophys. Acta Gene Struct. Expression* 1398, 342–346.
- Karnani, R., Krishnan, M., & Narayan, R. (1997). Biofiber-reinforced polypropylene composites. *Polymer Engineering & Science*, 37(2), 476-483.
- Nair, K. C., Diwan, S. M., & Thomas, S. (1996). Tensile properties of short sisal fiber reinforced polystyrene composites. *Journal of applied polymer science*, 60(9), 1483-1497.
- Martin Perez J. (1985). Perspectivas del henequén en México. *Biología y aprovechamiento integral del henequén y otros Agaves*.
- Schoning, A. G. (1965). Absorptiometric determination of acid-soluble lignin in semichemical bisulfite pulp and in some woods and plants. *Svensk Papperstidn*, 68, 607-613.
- Medina, J.C.(1959). Plantas fibrosas de flora mundial. Instituto Agronomico de Campinas: 913.
- Himmerfarb, (1957). Handbook of textile fiber. Woodhead publishing, the institute textile.cell wall extensibility. *Annu Rev Plant Physiol, Plant Molecular Biology* 50: 391–417
- Arioli, T., Peng, L., Betzner, A. S., Burn, J., Wittke, W., Herth, W., & Cork, A. (1998). Molecular analysis of cellulose biosynthesis in *Arabidopsis*. *Science*, 279(5351), 717-720.
- Orford SJ, Timmis JN, (1998). Specific expression of an expansin gene during elongation of cotton fibres. *Biochemistry Biophysical Acta*; 1398:342-346.
- Bhat, N. V. (1998) *Manufactured fibre technology* edited by VB Gupta, & VK Kothari. *Indian journal of fibre and textile research*, 23, 199-199.
- Shimizu, Y. et al., (1997).Changes in levels of mRNAs for cell wall-related enzymes in growing cotton fiber cells. *Plant Cell Physiology*. 38, 375–378 .
- Cho, H. T. & Kende, H., (1997). Expression of expansin genes is correlated with growth in deepwater rice. *Plant Cell* 9, 1661–1671 .

Colunga-Marín, F. M.-P. (1997). Morphological variation of henequen (agave fourcroydes, agavaceae) germplasm and its wild ancestor (*A. angustifolia*) under uniform growth conditions: diversity and domestication. *American Journal of Botany*, Vol 84: 1449–1465.

Cosgrove, D. J., Bedinger, P., & Durachko, D. M. (1997). Group I allergens of grass pollen as cell wall-loosening agents. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(12), 6559-6564.

Jervis, E. J., Haynes, C. A. & Kilburn, D. G., (1997). Surface diffusion of cellulases and their isolated binding domains on cellulose. *Journal. Biology. Chemistry*. 272, 24016–24023 .

Hans, A., (1996), Cellulose, structure, accesibility and reactivity, Segunda Edición, Editorial Gordon and Breach Science, Amsterdam, Países bajos, pp: 6-25, 156-158

McQueen-Mason, S. & Cosgrove, D. J., (1995).Expansin mode of action on cell walls: Analysis of wall hydrolysis, stress relaxation, and binding. *Plant Physiology*. 107, 87–100 .

Cosgrove, D. J., & Durachko, D. M. (1994). Autolysis and extension of isolated walls from growing cucumber hypocotyls. *Journal of experimental botany*, 45(Special Issue), 1711-1719.

Fedeniuk R. Biliaderis C. G., (1994). Composition and physicochemical properties of linseed (*Linum usitatissimum* L.) mucilage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* Vol. 42 (2): 240-247.

McQueen-Mason, S., & Cosgrove, D. J. (1994). Disruption of hydrogen bonding between plant cell wall polymers by proteins that induce wall extension. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(14), 6574-6578.

Islam, A., & Sarkanen, K. V. (1993). The isolation and characterization of the lignins of jute (*Corchorus capsularis*). *Holzforchung-International Journal of the Biology, Chemistry, Physics and Technology of Wood*, 47(2), 123-132.

McQueen-Mason, S., Durachko, D. M. & Cosgrove, D. J, (1992).. Two endogenous proteins that induce cell wall expansion in plants. *Plant Cell* 4, 1425–1433.

Hollen, N., Saddler, J., (1992), Introducción a los textiles, Quinta Edición, Editorial Limusa S.A., México D.F., México, pp: 17-20, 46-55

Casey, J., (1991), Pulpa y papel, Quimica y tecnologia quimica, Vol. 1., Editorial Limusa, S.A, Primera edición, Mexico D.F.

Cazaurang-Martinez, M. N., Herrera-Franco, P. J., Gonzalez-Chi, P. I., & Aguilar-Vega, M. (1991). Physical and mechanical properties of henequen fibers. *Journal of applied polymer science*, 43(4), 749-756.

D. Maldas, B. K. (1988). Improvement of the mechanical properties of sawdust wood fibre-polystyrene composites by chemical treatment. *Polymer*, Vol 29: 1255–1265.

Robert, M. L., Herrera, J. L., Contreras, F., & Scorer, K. N. (1987). In vitro propagation of *Agave fourcroydes* Lem.(Henequen). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 8(1), 37-48

Boluanger, J. (1985). Mejoramiento de la variabilidad genética del sisal y del henequen. En L. d. Carlos Cruz, *Biología y aprovechamiento integral del henequen y otros agaves*: 73-80. Mérida, Yucatan, Mexico: Division editorial del CIES.

De Menezes T.J.B., A. Azzini, (1985). Utilization of agroindustrial products for the manufacture of etanol. Instituto de Tecnología de Alimentos Campinas, Brasil. Editorial CIES: 139-148.

Bourne, G., y Danielli, J., (1984), *International review of cytology*, Editorial Academic Press, Primera Edición, Orlando- Estados Unidos, pp: 80-82

Ott, E., Sprulin, H., Graffin, M., (1963), *Cellulose and Cellulose derivates*, Editorial Interscience publishers, Inc., Segunda Edición, Nueva York, Estados Unidos, pp: 13-19

The Textile Institute and the Society of dyers and colourist, (1954), *Review of textile progress*, Editorial Tinnling and Co. Ltd., Londres, Inglaterra, pp: 32-34