



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

Selección de individuos de *Agave* asociada con el rendimiento de producción de fibra mediante marcadores moleculares

Tesis que presenta

María José García Castillo

En opción al título de

DOCTOR EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Biotecnología)

Mérida, Yucatán, México
2022

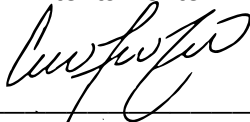
*CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS*



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de **María José García Castillo** titulado “**Selección de individuos de Agave asociada con el rendimiento de producción de fibra mediante marcadores moleculares**”, fue realizado en la unidad de biotecnología, laboratorio de marcadores moleculares del **Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.** bajo la dirección del **Dr. Lorenzo Felipe Sánchez Teyer** y la codirección del **Dr. Luis Carlos Rodríguez Zapata**, dentro de la opción de biotecnología, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente



Dra. Cecilia Hernández Zepeda
Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 15 de junio de 2022

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de investigación 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.



María José García Castillo

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., bajo la dirección del Dr. Lorenzo Felipe Sánchez Teyer y el Dr. Luis Carlos Rodríguez Zapata.

AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT por la beca otorgada

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 Dr. Felipe Sánchez Teyer por su asesoría, apoyo, guía, paciencia y confianza otorgada durante el desarrollo de este trabajo.

A mi coasesor el Dr. Luis Carlos Rodríguez Zapata por sus aportaciones sobre la tesis y mi formación académica.

A mi comité tutorial por las observaciones en cada examen y aportaciones en la tesis.

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.

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 académico y por su amistad, a la Dra. Yahaira Tamayo Ordoñez por su apoyo técnico de la tesis y por sus aportaciones.

A la técnica del laboratorio de marcadores moleculares M.C Fabiola Escalante Erosa, por su apoyo en la solicitud de materiales y por brindarme su amistad.

A mis compañeros de laboratorio de marcadores moleculares y genómica por sus comentarios y sugerencias en seminarios Elia, Sayuri y Alba y al laboratorio de transformación genética, por todas las aportaciones en los seminarios, Samuel, Antonio y Osmar. A mis compañeros de generación y mis amigos del CICY.

A mi familia, mi mamá, mi papá, mis hermanas, a mis mejores amigas Jenni y Julieta y a mi compañero de vida José.

DEDICATORIAS

A mi familia principalmente a mi Papá, José, Victoria y Jimena.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
CAPITULO I.....	3
ANTECEDENTES.....	3
1.1. FIBRAS VEGETALES.....	3
1.2. FACTORES MOLECULARES Y BIOQUÍMICOS INVOLUCRADOS EN SINTESIS DE LA PARED CELULAR EN PLANTAS.....	5
1.2.1. La pared celular de las plantas.....	5
1.2.2. Composición de la pared celular vegetal.....	6
1.3. GENES RELACIONADOS CON LA SÍNTESIS DE LA PARED CELULAR.....	7
1.3.1. Genes de Celulosa sintasa.....	7
1.3.2. Expresión de genes <i>CesA</i> en otras especies y <i>Agave</i>	9
1.4. MEJORAMIENTO GENÉTICO EN PLANTAS ESPECIALIZADAS PARA PRODUCCIÓN DE FIBRA.....	10
1.5. ESPECIES DE <i>Agave</i> EN LA PRODUCCIÓN DE FIBRAS.....	13
2. JUSTIFICACIÓN.....	15
3. HIPÓTESIS.....	16
4. OBJETIVO GENERAL.....	17
4.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	18
CAPÍTULO II.....	19
2. EXPRESIÓN DE LOS GENES <i>CesA</i> Y EL ANÁLISIS DE LAS FIBRAS COMPARANDO TRES ESPECIES DE <i>Agave</i>	19
2.1. INTRODUCCIÓN.....	19
2.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
2.2.1. Material vegetal.....	21
2.2.2. Determinación del contenido de celulosa.....	21
2.2.3. Aislamiento de la secuencia de la subunidad parcial A de <i>CesA</i>	22
2.2.4. Análisis de la relación de la subunidad catalítica A de la celulosa sintasa en plantas.....	22
2.2.5. Determinación del número de copias del gen <i>CesA</i>	23
2.2.6. Cuantificación relativa del gen <i>CesA</i>	24
2.2.7. Análisis de las fibras de <i>agave</i> mediante Microscopía Electrónica de Barrido.....	25
2.2.8. Análisis histológicos de las fibras de <i>agave</i>	25
2.3. RESULTADOS.....	26
2.3.1. Contenido de celulosa.....	26

2.3.2. Cuantificación asoluta y relativa del gen <i>CesA</i>	26
2.3.3. Estructura de fibra y análisis de organización.....	28
2.3.4. Análisis de la subunidad A de la proteína CESA.....	31
2.4 DISCUSIÓN.....	34
2.4.1. La expresión del gen <i>CesA</i> en especies de <i>Agave</i>	35
2.4.2. La importancia de las fibrillas de celulosa y la organización de células en especies productoras de fibras.....	36
2.4.3. Especialización genética de <i>CesA</i> en los cultivos de <i>Agave</i>	38
CAPÍTULO III.....	40
3. EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE GENES <i>CesA</i> Y LA RELACIÓN CON EL CONTENIDO DE FIBRA EN HENEQUÉN.....	40
3.1. INTRODUCCIÓN.....	40
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	42
2.1. Material vegetal.....	42
2.2. Cuantificación de caracteres morfométricos.....	42
2.3. CUANTIFICACIÓN DE FIBRA.....	42
2.4. PCR en tiempo real (expresión relativa).....	43
2.5. Análisis estadísticos.....	44
3. RESULTADOS.....	44
3.1. Caracteres morfométricos y contenido de celulosa.....	44
3.2. Cuantificación relativa de genes <i>CesA</i>	45
4. DISCUSIÓN.....	46
4.1. Relación entre el contenido de celulosa y la longitud de las hojas en henequén.....	46
4.2. Expresión de genes <i>CesA</i> involucrados en la biosíntesis de pared primaria y secundaria en henequén.....	46
CAPÍTULO IV.....	50
DISCUSIÓN, CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS.....	50
4.1. DISCUSIÓN.....	50
4.1. CONCLUSIONES GENERALES.....	52
4.2. PERSPECTIVAS.....	53
BIBLIOGRAFÍA.....	55

Abreviaturas

CesA: celulosa sintasa

CSC: complejo celulosa sintasa

PCP: pared celular primaria

PCS: pared celular secundaria

ADNc: ácido desoxirribonucleico complementario

A.fourcroydes: *Agave fourcroydes*

ARN: ácido ribonucleico

FW: forward

GB: *Gossipium barbadense*

GH: *Gossipium hirsutum*

REV: reverse

TM: dominio transmembrana

UDP: uridina difosfato

Índice de figuras

Figura 1.1. Representación esquemática de la estructura de una proteína CESA.....7

Figura 1.2. Ciencias ómicas útiles para orientar programas de mejoramiento genético vegetal.....10

Figura 1.3. Estrategia experimental del proyecto.....18

Figura 2.1. Número de copias evaluadas del gen *CesA* en diferentes especies de *Agave*.....27

Figura 2.2. Análisis de expresión relativa del gen *CesA* evaluada en diferentes especies de *Agave*.....28

Figura 2.3. Análisis longitudinales de fibrillas de celulosa.....29

Figura 2.4. Estructura y organización de componentes celulares de la fibra.....30

Figura 2.5. Modelamiento de la estructura terciaria de la subunidad catalítica A y B de celulosa sintasa.....31

Figura 2.6. Modelamiento de la estructura terciaria de celulosa sintasa en diferentes especies de plantas productoras de fibras.....32

Figura 2.7. Red de haplotipos de especies de *Agave*.....33

Figura 3.1 Estudio de la expresión relativa de genes de pared primaria y pared secundaria.....45

Figura 4.1. Modelo de plantas de mayor tamaño vs plantas de menor tamaño, comparando los niveles de expresión de los genes *CesA* y el contenido de celulosa.....52

Índice de cuadros

Cuadro 1.1 Calidad de fibras según la variación en los componentes y en diferentes especies de plantas.....4

Cuadro 1.2. Genes *CesA* en especies de plantas.....9

Cuadro 1.3. Marcadores moleculares desarrollados en especies con importancia económica.....11

Cuadro 1.4. Aplicaciones de *Agave fourcroydes* Lem.....13

Cuadro 2.1. Parámetros evaluados para cada especie de *agave*.....26

Cuadro 3.1 Plantas seleccionadas en la colecta del material vegetal.....44

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, como *Agave fourcroydes*, que se caracteriza por su alto contenido de fibra. El componente más abundante de las fibras es la celulosa, para su síntesis se requiere de los genes de celulosa sintasa (*CesA*), estos genes codifican para proteínas que intervienen en la síntesis de la pared celular primaria y secundaria. Este trabajo se enfocó al estudio de la relación de genes *CesA* con el contenido de fibra en *Agave fourcroydes*. Lem. Se determinó la expresión relativa de los genes *CesA3*, *CesA4* y *CesA5* involucrados en la pared celular primaria y secundaria, así como una región parcial de la subunidad A de *CesA* y se evaluó su relación con el contenido de fibra en plantas de diferentes alturas en una plantación de henequén. Se realizó una caracterización de fibras a nivel interespecífico y se evaluó el contenido de los componentes de la fibra por medio de los métodos TAPPI. Los resultados indican que las plantas con mayor altura promedio (147 cm), presentan hojas más largas (139 cm), con mayor contenido de celulosa (48%) y bajo contenido de hemicelulosa (3%) y lignina (8%) y estas características se relacionan con elevados niveles de expresión relativa de los genes *CesA3* y *CesA4* y bajo nivel de expresión relativa del gen *CesA5*. Finalmente se presenta una correlación directa de mayor expresión de genes *CesA3* y *CesA4* con la longitud de las hojas, la altura de la planta y el contenido de celulosa, lo cual sirve de base para investigaciones futuras enfocadas en la selección temprana de individuos con alto contenido de celulosa, que a través del cultivo de tejidos vegetales representa una opción para el mejoramiento genético en beneficio de los productores del cultivo.

ABSTRACT

Agave Linnaeus, 1753 is a genus that includes about 166 species widely distributed in Mexico. Within this genus, species of great commercial importance have been described, such as *Agave fourcroydes*, which is characterized by its high fiber content. The most abundant component of the fibers is cellulose, for its synthesis the cellulose synthase genes (*CesA*) are required, these genes code for proteins that intervene in the synthesis of the primary and secondary cell wall. This work focused on the study of the relationship of *CesA* genes with fiber content in *Agave fourcroydes* Lem. The relative expression of the *CesA3*, *CesA4* and *CesA5* genes involved in the primary and secondary cell wall, as well as a partial region of the A subunit of *CesA*, was determined and its relationship with fiber content was evaluated in plants of different heights in a henequen plantation. A characterization of fibers at the interspecific level was carried out and the content of the fiber components was evaluated by means of the TAPPI methods. The results indicate that plants with higher average height (147 cm), have longer leaves (139 cm), with higher cellulose content (48%) and low hemicellulose (3%) and lignin (8%) content and these characteristics are related to high levels of relative expression of the *CesA3* and *CesA4* genes and low level of relative expression of the *CesA5* gene. Finally, a direct correlation of higher expression of *CesA3* and *CesA4* genes with the length of the leaves, the height of the plant and the cellulose content is presented, which serves as a basis for future research focused on the early selection of individuals with high content. of cellulose, which through plant tissue culture represents an option for genetic improvement for the benefit of crop producers.

INTRODUCCIÓN

Las fibras lignocelulósicas han sido objeto de considerable interés en los últimos años, como alternativa promisoría para reemplazar las fibras sintéticas, debido a la capacidad de ser biodegradables y su obtención no daña y el medio ambiente en comparación con las fibras sintéticas (Munasinghe *et al.*, 2013; Francucci *et al.*, 2012). Entre las especies de *Agave* más utilizadas para la extracción de fibras se encuentran *A. sisalana*, *A. americana*, *A. fourcroydes* y el híbrido H11648 (*A. amaniensis* Trel. Y Nowell X *A. angustifolia* Haw.) X *A. amaniensis*) (Huang *et al.*, 2019; Tamayo-Ordoñez *et al.*, 2018; Megiatto *et al.*, 2008).

Si bien se puede esperar que la producción de fibras de agave tenga un impacto económico significativo en los próximos años, todavía hay limitantes para la obtención de fibra en estas especies, por ejemplo: a) los cultivos de agave requieren períodos de crecimiento de 4 a 10 años, dadas las grandes extensiones de tierra que se necesitan actualmente para el cultivo y sin garantizar que todas las plantas sean altamente productoras; b) el rendimiento de la fibra requiere mejoras, por ejemplo, tan solo el cultivo de *A. sisalana* y *A. americana* ocupa 100, 000 ha de superficie cultivada en Dakota del norte (Escamilla-Treviño *et al.*, 2012). Estas limitaciones hacen que sea urgente abordar los estudios hacia la optimización de los cultivos de agave para lograr mayores rendimientos que reducirá el tiempo necesario para la cosecha de fibras.

La ingeniería genética y la sobreexpresión de genes relacionados con la biosíntesis de la pared celular podrían ser una alternativa que mejore la producción de fibra en cultivos de interés comercial (Phitsuwan *et al.*, 2013; Abramson *et al.*, 2010). Sin embargo, para que esta herramienta tenga éxito en el modelo biológico deseado, es necesario conocer los aspectos básicos relacionados con las enzimas involucradas en la biosíntesis de la pared celular.

Algunas investigaciones genéticas que se han realizado con este objetivo se han llevado a cabo en modelos biológicos ampliamente utilizados para la producción de fibra, como el lino (Galinousky *et al.*, 2014), el algodón (Abdurakhmonov *et al.*, 2014) y el yute (Samanta *et al.*, 2015). Estos estudios han demostrado que el rendimiento de la fibra puede mejorarse a partir del conocimiento de los factores genéticos y bioquímicos que regulan la producción de biopolímeros de plantas (Gou *et al.*, 2007). Por lo anterior, entender cuáles son los genes involucrados en la síntesis de la pared celular primaria y secundaria, así como, los mecanismos

de las enzimas para lograr rendimientos más altos de biopolímeros de plantas con el objetivo de producir fibra.

Las plantas contienen genes que codifican para proteínas (enzimas) involucradas en biosíntesis de pared celular como la celulosa sintasa, por lo que la identificación y el aislamiento de estos genes en conjunto con el desarrollo de marcadores moleculares (Zhang *et al.*, 2015; Du *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2013; Lin *et al.*, 2012), podría ser una herramienta valiosa para aumentar el contenido de fibras en cultivos de importancia comercial, así como una selección temprana.

CAPITULO I

1. ANTECEDENTES

1.1. FIBRAS VEGETALES

Las fibras vegetales se encuentran como elementos estructurales en todas las plantas superiores, estas constan, principalmente, de fibrillas de celulosa sostenidas en una matriz de lignina. Las fibrillas están alineadas a lo largo de la fibra, lo cual brinda resistencia a la tracción y a la flexión, además proporciona rigidez (John & Thomas, 2008). Es considerada como una célula individual, que forma parte del tejido esclerenquimático (VanDan & Gorshkova, 2003).

Las fibras se dividen, de acuerdo con su posición dentro o fuera del xilema, en xilares o extraxilares; y, por su estructura, se clasifican en libriiformes, traqueidas o fibrotraqueidas, mucilaginosas y septadas (VanDan & Gorshkova, 2003). Las fibras xilares constituyen una parte integral del xilema y del desarrollo de los tejidos meristemáticos. Las fibras extraxilares se pueden encontrar dentro de la corteza (fibras corticales), el floema (fibras del floema), o en la periferia de los haces vasculares (fibras perivasculares) (Foster & Gifford, 1959).

Por otra parte, las fibras de la hoja, también conocidas como fibras duras, son los aglomerados de células vasculares y se extraen del sistema fibrovascular, un ejemplo de esto es el agave (*Agave sisalana*, *Agave fourcroydes*), abacá (*Musa textilis*), yuca (*Yucca spp.*) y algunas palmas (VanDan & Gorshkova, 2003). Las fibras del esclerénquima pueden estar por separado como idioblastos, pero habitualmente se producen en grupos. Estos haces fibrosos están incluidos en los cultivos de interés comercial, como el lino (*Linum usitatissimum*), el cáñamo (*Cannabis sativa*), el yute (*Corchorus spp.*), el ramio (*Boehmeria nivea*) y el kenaf (*Hibiscus cannabinus*) (Sperry, 1982).

Por lo anterior, se pueden encontrar seis tipos básicos de fibras naturales, las fibras de tallo (yute, lino, cáñamo, ramio y kenaf), las fibras de hojas (abacá, fique y agave), las fibras de semillas (coco, algodón y kapok), las fibras de la corteza (kenaf, cáñamo y yute), las fibras alimentarias (trigo, maíz y arroz) y los demás tipos (madera y raíces) (Faruk *et al.*, 2012). La eficiencia de la fibra natural está relacionada con la naturaleza y proporción de la celulosa (John & Thomas, 2008).

Se han descrito trabajos en diferentes especies de plantas, en donde reportan que la variación de los componentes de la fibra está relacionada con la calidad (Cuadro 1.1)

Cuadro 1.1. Calidad de fibra según la variación en los componentes y en diferentes especies de plantas.

Nombre científico	Nombre comercial	Características	% Componentes	Bibliografía
<i>Gossypium hirsutum</i>	Algodón	Fibras cortas	Celulosa 95%	Rodríguez, 2006
<i>Gossypium herbaceum</i>		Elasticidad de la fibra	Celulosa 88 %	
<i>Boehmeria nivea</i>	Ramio	Fibras blancas y elasticidad	Celulosa 86.5% Lignina 0.54%	Sing, 2006.
<i>Linum usitatissimum</i>	Lino	Fibras cortas y resistentes	Celulosa 70%	Fedeniuk <i>et al</i> , 1994.
<i>Corchorus capsularis</i>	Yute	Resistencia mecánica	Celulosa 63.2%	Rodríguez, 2006
<i>Corchorus olitorius</i>		Fibra finas y resistentes	Lignina 24.4% Celulosa: 68%	
<i>Agave fourcroydes</i>	Henequén	Fibras largas	Celulosa 77% Lignina y pectina 3.1%	Himmerfarb, 1957.
<i>Agave sisalana</i>	Sisal	Fibras largas y resistentes	Celulosa 72 % Hemicelulosa 13% Lignina 11%	Medina, 1959.

El contenido de los componentes de las fibras vegetales varía de acuerdo con la especie, las fibras de algodón cuentan con los valores más altos en cuanto al contenido de celulosa y se consideran fibras de alta calidad, por lo que se emplean mayoritariamente en la fabricación de ropa y de accesorios para la industria (John & Thomas, 2008), además, se utilizan como un

modelo para realizar estudios biológicos sobre la síntesis de la pared celular en plantas (Zhang *et al.*, 2018; Avci *et al.*, 2013).

1.2. FACTORES MOLECULARES Y BIOQUÍMICOS INVOLUCRADOS EN SINTESIS DE LA PARED CELULAR EN PLANTAS.

Estudios moleculares en modelos como *Gossypium spp.* (Abdurakhmonov *et al.*, 2014) *Linum usitatissimum* L. (Galinousky *et al.*, 2014) y *Nicotiana tabacum* cultivar Samsun (Dayan *et al.*, 2010) han indicado que el mejoramiento de la calidad y rendimiento de biopolímeros en plantas se podría conseguir mediante la elucidación de los factores moleculares y bioquímicos que establecen y regulan su producción. Por ello, en los últimos años, diversos estudios se han enfocado en la identificación de los genes que codifican para las enzimas (sacarosa sintasa, expansina, glucanasas y celulosa sintasa) que están involucradas en la formación de la pared celular, debido a la estrecha relación de estas en la biosíntesis de compuestos como lignina y celulosa (Agarwal *et al.*, 2006; Zhong *et al.*, 2003).

1.2.1. LA PARED CELULAR DE LAS PLANTAS

La pared celular de las plantas es una estructura que define la forma y el tamaño de una célula vegetal, brinda soporte estructural a la planta y sirve como nodos de comunicación entre el simplasto y el apoplasto. En acción coordinada con el citoesqueleto, la pared celular limita y orienta el crecimiento de las células de las plantas ejerciendo una gran influencia en la especialización funcional de los diferentes tipos celulares y en la morfología y desarrollo de la planta (Bidhendi & Geitmann, 2016; Ali & Traas, 2016; Cosgrove, 2015; Ivakov *et al.*, 2013). Su estructura compleja, dinámica y metabólicamente activa juega un papel esencial en las respuestas a factores ambientales, factores de estrés y en múltiples procesos fisiológicos que van desde el transporte de agua hasta la señalización celular (Wang *et al.*, 2016; Hamann, 2015b; Tenhaken *et al.*, 2015; Malinovsky *et al.*, 2014; Wolf *et al.*, 2012; Popper *et al.*, 2011).

La pared celular comienza a sintetizarse con la aparición de la placa celular durante la telofase (Smith, 2001). El desarrollo de la placa celular origina la lámina media constituida por polisacáridos pécticos (Aspinall, 1980). Inmediatamente, entre la membrana plasmática y la lámina media se deposita la **pared celular primaria**, que presenta estructura fibrilar debido a la acumulación de celulosa cristalina (Knox, 2008). La pared celular primaria y la lámina media están presentes en las células que conservan la capacidad de dividirse y/o elongarse, la **pared celular secundaria** se forma una vez que se ha detenido el crecimiento celular, está

involucrada en el proceso de diferenciación, contribuye a la producción de biomasa en plantas (Keegstra., 2010; Schuetz *et al.*, 2013; Hu *et al.*, 2018), y consta de una estructura multicapa constituida básicamente por celulosa y lignina (Kumar *et al.*, 2016; Schneider & Persson, 2015).

1.2.2. COMPOSICIÓN DE LA PARED CELULAR VEGETAL

La pared celular primaria y secundaria está compuesta por varios grupos de polisacáridos que incluyen celulosa, hemicelulosas, pectinas y lignina, así como proteínas estructurales y compuestos fenólicos (Lampugnani *et al.*, 2018; Ivakov & Persson, 2012).

La celulosa, consiste en cadenas de unidades glucosa con enlaces β -1,4, se sintetiza en la membrana plasmática (PM) y se organiza en microfibrillas, que son los principales elementos de carga de la pared celular. La celulosa se produce principalmente en estructuras formando una red de moléculas simples como resultado de los enlaces de hidrógeno entre cadenas, así como las fuerzas de van der Waals (Nishiyama, 2009; Somerville, 2006; Saxena & Brown, 2005).

Las hemicelulosas son polisacáridos compuestos principalmente por cadenas lineales de los monosacáridos xilosa, glucosa y manosa y con cadenas laterales cortas (Pauly *et al.*, 2013). Las hemicelulosas más características de las paredes celulares primarias son el xiloglucano, los arabinoxilanos, (glucurono) arabinoxilanos (Keegstra, 2016). Se ha descrito que estas hemicelulosas se unen mediante puentes de hidrógeno a las microfibrillas de celulosa manteniéndolas en la conformación correcta.

Las pectinas son polisacáridos ricos en el monosacárido ácido galacturónico (GalU). En la pared celular primaria, su contenido es variable, llegando a representar hasta el 10% del peso seco (Carpita, 1996). Se ha descrito que las pectinas desempeñan importantes funciones como la absorción y retención de agua, el transporte de iones, la adhesión celular, la determinación del tamaño del poro de la pared celular (Bethke *et al.*, 2016; Wolf & Greiner, 2012). A diferencia de la síntesis de celulosa que se produce en la membrana plasmática, los polisacáridos no celulósicos son sintetizados en las cisternas del aparato de Golgi y, posteriormente, transportados a la pared celular por exocitosis mediada por vesículas (Anderson, 2016; Lerouxel *et al.*, 2006).

La lignina es un polímero tridimensional complejo cuyas subunidades aromáticas son sintetizadas a través de la ruta de los fenilpropanoides (Dixon *et al.*, 2002), es además un componente fundamental que refuerza y proporciona rigidez a los tejidos vegetales (Weng & Chapple, 2010) y se deposita de manera abundante en células específicas de las plantas como

las esclereidas, traqueidas, elementos de los vasos, y fibras del xilema y floema (Dixon *et al.*, 2002; Vance *et al.*, 1980).

1.3. GENES RELACIONADOS CON LA SÍNTESIS DE LA PARED CELULAR

1.3.1. GENES DE CELULOSA SINTASA

La secuenciación aleatoria de ADNc de algodón y la comparación con genes bacterianos involucrados en la biosíntesis de celulosa condujeron a la identificación de genes que codifican para la enzima celulosa sintasa (*CesA*) en plantas (Pear *et al.*, 1996), éstas son enzimas que catalizan la reacción de adición de una molécula glucosa a una cadena de celulosa en formación (Festucci *et al.*, 2007). Las proteínas CESA contienen aproximadamente de 900 a 1000 residuos de aminoácidos y un peso molecular de 100 kDa (Atanassov *et al.*, 2009). El sustrato para CESA es la uridina difosfato glucosa (Verbančič *et al.*, 2018), que se sintetiza a partir de la vía de la invertasa citosólica (Barnes & Anderson, 2018). Las proteínas CESA están compuestas por una región N-terminal citosólica involucrada en la dimerización / oligomerización de las subunidades CESA (Kurek *et al.*, 2002) seguidas de dos dominios transmembranales, un gran bucle central citoplásmico que contiene las regiones catalíticas y de unión al sustrato, seis dominios transmembranales adicionales (Slabaugh *et al.*, 2014; Sethaphong *et al.*, 2013) y finalmente un dominio C-terminal intracelular (figura 1.1).

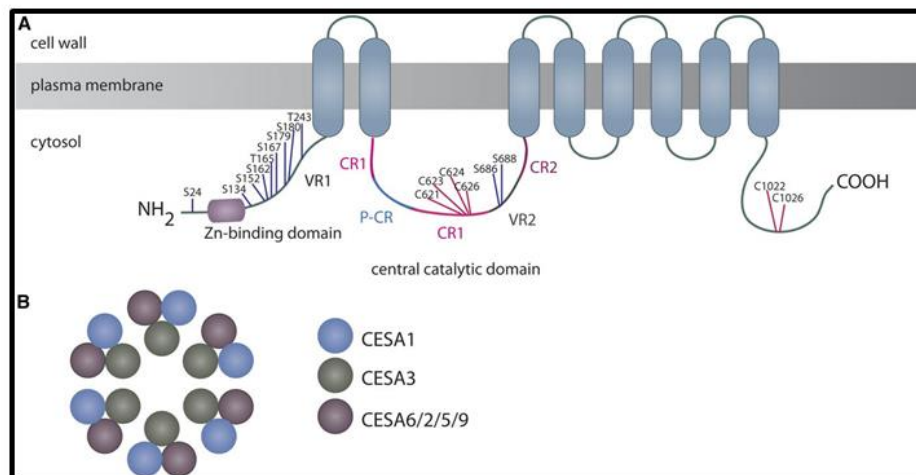


Figura 1.1. (A) Representación esquemática de la estructura de una proteína CESA, (B) Complejo de CESA (Tomado de Polko & Kieber, 2019).

La estructura de las proteínas CESA contiene un dominio N-terminal intracelular, contiene sitios de fosforilación, los dominios de unión a Zn están involucrados en interacciones proteína-proteína. Se pueden observar varias cisteínas en el bucle citoplásmico y dentro del dominio C-

terminal (Kumar 2016b) se representan en roseta. Las siglas corresponden: C, cadena de celulosa; CR1, región conservada 1; CR2, región conservada 2; P-CR, región específica de la planta, seguido por dos dominios transmembrana. Los seis dominios transmembrana subsiguientes son seguidos por el dominio C-terminal citoplásmico. En cuanto a la representación esquemática del complejo (CSC) (Figura 1B), consta de 18 proteínas CESA individuales. El modelo es consistente por lo reportado por Hill *et al.*, 2014, que asume que este CSC está compuesto por seis lóbulos que contienen tres isoformas CESA.

Por lo tanto, las proteínas CESA poseen 8 dominios transmembrana que formarían un poro a través de la membrana plasmática, localizados hacia el citosol (Lerouxel *et al.*, 2006). La síntesis de celulosa consta de dos procesos, polimerización y cristalización, altamente coordinados, pero probablemente independientes (Guerreiro *et al.*, 2010). Cada centro activo es responsable de la polimerización de una cadena de glucano que a través del poro transmembrana hacia el exterior de la célula se organiza espontáneamente por unión a cadenas de glucano vecinas. El movimiento de los complejos terminales no es al azar, sino que es determinado por la polimerización de las microfibrillas de celulosa, de manera que estas se depositen en la pared celular (McFarlane *et al.*, 2014). En último término, se ha propuesto que la deposición ordenada de las microfibrillas de celulosa depende de microtúbulos corticales presentes en la parte citosólica de la membrana plasmática, que sirven de guía para el movimiento de los complejos terminales (Paredes *et al.*, 2006).

A pesar de numerosos intentos para determinar la funcionalidad de proteínas CESA, hasta el momento, se ha demostrado la reconstitución completa de la síntesis de celulosa en bacterias a partir de componentes de *Rhodobacter sphaeroides*, donde la subunidad catalítica A (BcsA) es la encargada de la síntesis de celulosa y forma el poro a través del interior de la membrana y la subunidad B (BcsB), una proteína periplásmica grande, está anclada a la membrana interna a través de una sola hélice TM C-terminal (Morgan *et al.*, 2013). Debido a que la subunidad catalítica A está directamente relacionada con la biosíntesis de celulosa (Omadjela *et al.*, 2013), en el presente estudio se utilizará una región parcial de dicha subunidad como se detalla más adelante.

1.3.2. EXPRESIÓN DE GENES *CesA* EN OTRAS ESPECIES Y *Agave*

Los genes *CesA* son indispensable en la biosíntesis de la pared celular, la clasificación de estos genes se ve obstaculizada por el desafío en la caracterización del papel funcional que desempeña cada miembro de la superfamilia, sin embargo, se han descrito diferentes estudios involucrados con la secuenciación de plantas para poder conocer los genes *CesA* en las diferentes especies, como se menciona en el siguiente cuadro 1.2.

Cuadro 1.2. Genes *CesA* en especies de plantas.

Especie	Genes <i>CesA</i>	Bibliografía
<i>Arabidopsis thaliana</i>	10	Richmond & Somerville, 2000
<i>Oryza sativa</i>	11	Wang <i>et al.</i> , 2010
<i>Zea mays</i>	12	Kumar & Turner, 2015
<i>Populus trichocarpa</i>	18	Djerbi <i>et al.</i> , 2005
<i>Sorghum bicolor</i>	12	Paterson <i>et al.</i> , 2009
<i>Vitis vinifera</i>	11	Jaillon <i>et al.</i> , 2007
<i>Hordeum vulgare</i>	7	Burton <i>et al.</i> , 2004
<i>Agave</i> Híbrido H11648	5	Huang <i>et al.</i> , 2019

El aislamiento de los genes *CesA* expresados en *Zea mays* y su asociación con la formación de paredes primarias y secundarias ha hecho posible realizar estudios acerca de los roles en la síntesis de celulosa a través de la genética mutacional o enfoques transgénicos (Apenzeller *et al.*, 2004).

En plantas como *Gossypium* se ha asociado la calidad de la fibra con el contenido de celulosa y la expresión de genes involucrados en la pared celular secundaria (Li *et al.*, 2013).

La celulosa sintasa (*CesA*) desempeña un papel regulador en la ruta de síntesis de celulosa en las plantas y es un factor importante en el control de la calidad y el rendimiento de la fibra en *Acacia mangium* (Ren *et al.*, 2018).

El análisis del transcriptoma de *Agave*, ha permitido la identificación de los genes *CesA* en *Agave tequilana*, *Agave deserti* y *Agave americana* (Gross *et al.*, 2013; Abraham *et al.*, 2016), así como en *Agave* híbrido H1164 (Huang *et al.*, 2019), en el cual se identificaron 38 secuencias *CesA* y 5 genes de longitud completa *CesA1*, *CesA3*, *CesA4*, *CesA5* y *CesA7*.

1.4. MEJORAMIENTO GENÉTICO EN PLANTAS ESPECIALIZADAS PARA PRODUCCIÓN DE FIBRA

El mejoramiento genético es un proceso de selección, mediante manejo artificial de genes o combinaciones de genes favorables en un cultivar, que varía según sistemas reproductivos y estructuras genéticas específicas (Rimieri P., 2017).

Los programas de mejoramiento de cultivos involucran en sus procesos, un ciclo que consta de la evaluación de fenotipos y genotipos, la selección y cruzamiento de fenotipos superiores, evaluación del fenotipo obtenido y reinicio del ciclo. Este proceso produce genotipos/fenotipos superiores, que son validados y desarrollados en nuevas variedades (Dempewolf *et al.*, 2017).

En las últimas décadas, la generación de nuevas tecnologías de secuenciación genómica ha transformado la manera como se estudia la diversidad genética. Las ciencias ómicas (filogenómica, la genómica comparativa, la transcriptómica comparativa y la selección asistida por marcadores moleculares) son útiles para el estudio de la historia evolutiva, los genes y las variaciones genéticas de especies de importancia agrícola, y como estos pueden ser aprovechados dentro de programas de mejoramiento genético para obtener variedades con características de interés agronómico de una manera más rápida, que utilizando el mejoramiento tradicional (figura 1.2).

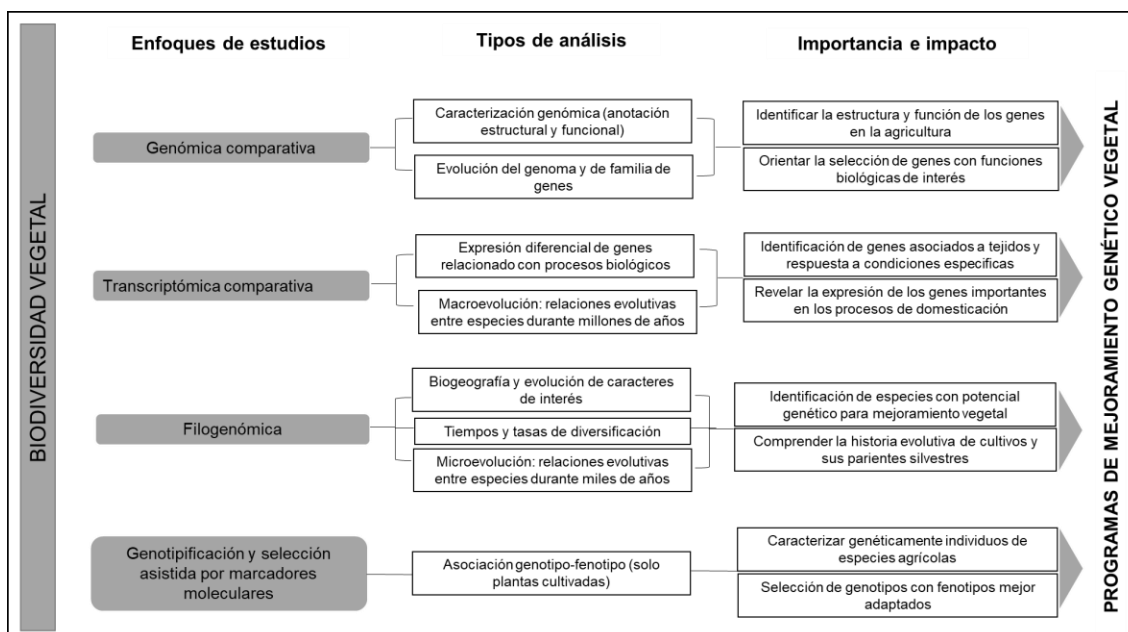


Figura 1.2. Ciencias ómicas útiles para orientar programas de mejoramiento genético vegetal. (Tomado de Botero & Arias, 2018).

Se han desarrollado marcadores moleculares dirigidos a la genotipificación para estudios de variabilidad y diversidad genética en un gran número de plantas de importancia comercial (cuadro 1.3).

Cuadro 1.3. Marcadores moleculares desarrollados en especies con importancia económica

Especie	Tipo de marcador molecular desarrollado	Bibliografía
<i>Zea mays</i>	EST, AFLP	Synrem <i>et al.</i> , 2017, Ritte <i>et al.</i> , 2016
<i>Oryza sativa</i> L.	SSR, SNP's	Nachimuthu <i>et al.</i> , 2015
<i>Cajanus cajan</i> L. Millspaugh	SSR	Bohra <i>et al.</i> , 2017
<i>Triticum aestivum</i> L.	EST-SSR	Yang <i>et al.</i> , 2016
<i>Glycine max</i>	SSR, AFLP	Dong <i>et al.</i> , 2014, Zangar <i>et al.</i> , 2017
<i>Hordeum vulgare</i>	EST-SSR, EST-SNP y AFLP	Rajeev <i>et al.</i> , 2007
<i>Corchorus capsularis</i>	SSR	Saha <i>et al.</i> , 2017
<i>Gossypium hirsutum</i>	EST-SNP	Li <i>et al.</i> , 2014
<i>Linum usitatissimum</i> L.	SSR	Wu <i>et al.</i> , 2017

Mir *et al.*, 2008, describe que, solo unos pocos estudios sobre la genética de las características de rendimiento de la fibra se han realizado en el género *Corchorus* (yute), principalmente utilizando solo rasgos morfo-fisiológicos como la altura de la planta, el índice de cosecha y la resistencia de la fibra (Palit *et al.*, 1996). Sin embargo, tales rasgos son limitados en número y están influenciados por el medio ambiente, lo que los hace inadecuados para una evaluación correcta de la diversidad genética. Esta limitación se puede superar en gran medida mediante el uso de marcadores moleculares, que son ilimitados en número y no están influenciados por el medio ambiente. Implementando la secuenciación de nueva generación (NGS) para el diseño de SSR, se ha logrado obtener una asociación del

marcador molecular con la altura de la planta, el número de nodos por peso de la planta y el contenido de fibra por planta en *C. olerius* y para el diámetro del tallo basal, el número de nodos por planta y el peso de la fibra por planta en *C. capsularis*. Estudios como éste se han desarrollado para especies de importancia económica por sus fibras como es el caso de *Boehmeria nivea* L. (Luan *et al*, 2017) asociando el marcador con la corteza de la planta, *Gossypium arboreum* (Kantartzi *et al.*, 2008) asociando el marcador con varias características que definen la calidad de la fibra en esta especie como porcentaje de pelusa, madurez, elongación y color de pelusa.

Yanagui *et al.*, (2022), identificaron los perfiles de expresión y los genes clave involucrados en mayor contenido de biomasa y de celulosa en *Saccharum*, proporcionaron evidencia sobre el alargamiento de los entrenudos en la caña y desarrollaron posibles marcadores funcionales para programas de mejoramiento genético aumentando la productividad.

1.5. ESPECIES DE *Agave* EN LA PRODUCCIÓN DE FIBRAS

Agave fourcroydes Lem. Var. "Sac ki" (henequén blanco) es una especie con un ciclo de vida largo (de 8 a 20 años). Presenta hojas en forma de roseta, lanceoladas y angostas con una espina terminal de 2 a 3 cm y espinas triangulares en los bordes. La inflorescencia es en racimo y las flores se agrupan sobre un escapo (Garriga *et al.*, 2010; Kulus, 2014; Valdivia *et al.*, 2018). Es una planta monocotiledónea, del género *Agave*, perteneciente a la familia de las Agavaceae. La planta de henequén alcanza una altura promedio aproximada de 1.30 m, su explotación comienza cuando la planta tiene de 4 a 5 años, período a partir del cual el diámetro no aumenta más, solo el crecimiento en la parte inferior. El eje central constituye la parte de la planta donde se desarrollan las hojas y donde hay una gran acumulación de sustancias de reserva (González *et al.*, 2009).

Yucatán es una zona de distribución de esta especie de *Agave*, la cual es una planta productora de biomasa fibrosa y tiene un alto potencial de uso como se menciona en el cuadro 1.3. De igual manera, su cultivo mantiene la preservación del paisaje y la erosión del suelo (Robert *et al.*, 1992).

Anteriormente existían siete variedades cultivadas de henequén en Yucatán (Gentry.,1982), sin embargo, actualmente solo existen tres: Sac ki (henequén blanco), Yaax ki (henequén verde) y Kitam ki (henequén jabalí) (Gentry.,1982). El cultivo de Sac ki o henequén ha sido el más difundido en las plantaciones, por la calidad de su fibra (Gentry., 1982), en tanto que el Yaax ki es de menor calidad y rendimiento (Colunga-Marín, 1997). 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 puede ser aprovechado integralmente, debido a sus múltiples usos (Cuadro 1.4)

Cuadro 1.4. Aplicaciones de *Agave fourcroydes* Lem.

	Aplicaciones	Referencias
Hoja	Producción de fibras (cuerdas, sogas, hilos,	Negrete <i>et al.</i> , 2010

	tapetes, artesanías, papel)	Valdivia <i>et al.</i> , 2018
	Extracción de metabolitos: saponinas, flavonoides y esteroides	
Piña	Producción de bebidas alcohólicas, inulina	López <i>et al.</i> , 2003; Stewart., 2015
Bagazo	Alimento animal	Gutiérrez <i>et al.</i> , 2020

Se estima que para el cultivo de agave con énfasis en la producción de textiles (obtención de fibras), la densidad de siembra va de 2,700 a 3,150 plantas por hectárea (SAGARPA, 2017) y se emplean al menos 1 millón de hectáreas de tierra en Yucatán. Específicamente para el cultivo de *A. sisalana* y *A. americana* se requieren 100 000 ha para la siembra (Escamilla-Treviño., 2012).

En 1960 el henequén era un monocultivo en la península de Yucatán, sin embargo, actualmente solo se produce menos del 10 % de lo que se obtenía en el siglo pasado (92 %), En la actualidad la falta de posturas para complementar los planes de siembra que permitan solventar la demanda de fibra en el presente y futuro, ha conllevado a la plantación de todo tipo de material vegetal, con la consecuencia de generar plantaciones no uniformes y de bajos rendimientos, que han contribuido al mismo tiempo al deterioro gradual en la calidad de la fibra. Es por ello que surge el interés de realizar estudios acerca de las fibras de henequén y comprender la expresión del gen *CesA* en especies de *Agave*, esta información en conjunto con el mejoramiento genético permitirá una selección de individuos altamente productores de fibra en *Agave*.

2. JUSTIFICACIÓN

Las fibras de *A. fourcroydes* requieren un periodo de 4 a 6 años para su colecta y aprovechamiento. Actualmente hay información acerca de las enzimas involucradas en la biosíntesis de celulosa en otras especies productoras de fibra de importancia comercial, donde se han desarrollado marcadores moleculares específicos asociados a características morfológicas con el contenido de fibra, lo que ha permitido la selección de individuos sobreproductores. Sin embargo, en *Agave* aún se desconoce el papel de los genes clave o bien de la subunidad catalítica A de *CesA* y la relación con las fibras vegetales.

En esta investigación se pretende proponer un marcador molecular relacionado con el gen de celulosa sintasa en *Agave*. La utilización de este marcador molecular podría llevar a una selección temprana de individuos de *Agave* L. con altos rendimientos en el contenido de fibras.

3. HIPÓTESIS

Los cambios en los niveles de expresión del gen de *CesA*, involucrado con la síntesis de pared celular derivarán de una selección de plantas con características deseables y sobresalientes en el contenido de fibras en *Agave*.

4. OBJETIVO GENERAL

Proponer un marcador molecular asociado a un mayor contenido de fibras en *A. fourcroydes*.

4.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1.- Realizar un análisis comparativo del contenido de celulosa en especies productoras de fibra de *Agave*.

2.- Identificar secuencias homólogas al gen *CesA*, a partir de las bases de datos del transcriptoma de especies de agave (*A. deserti*, *A. americana* y *A. tequilana*).

3.- Evaluar la expresión de los genes (*CesA*) que codifican para las enzimas involucradas en la biosíntesis de la pared celular en *A. fourcroydes*.

4.- Proponer un marcador molecular asociado a un mayor contenido de fibras en *A. fourcroydes* en grupos contrastantes seleccionados.

5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

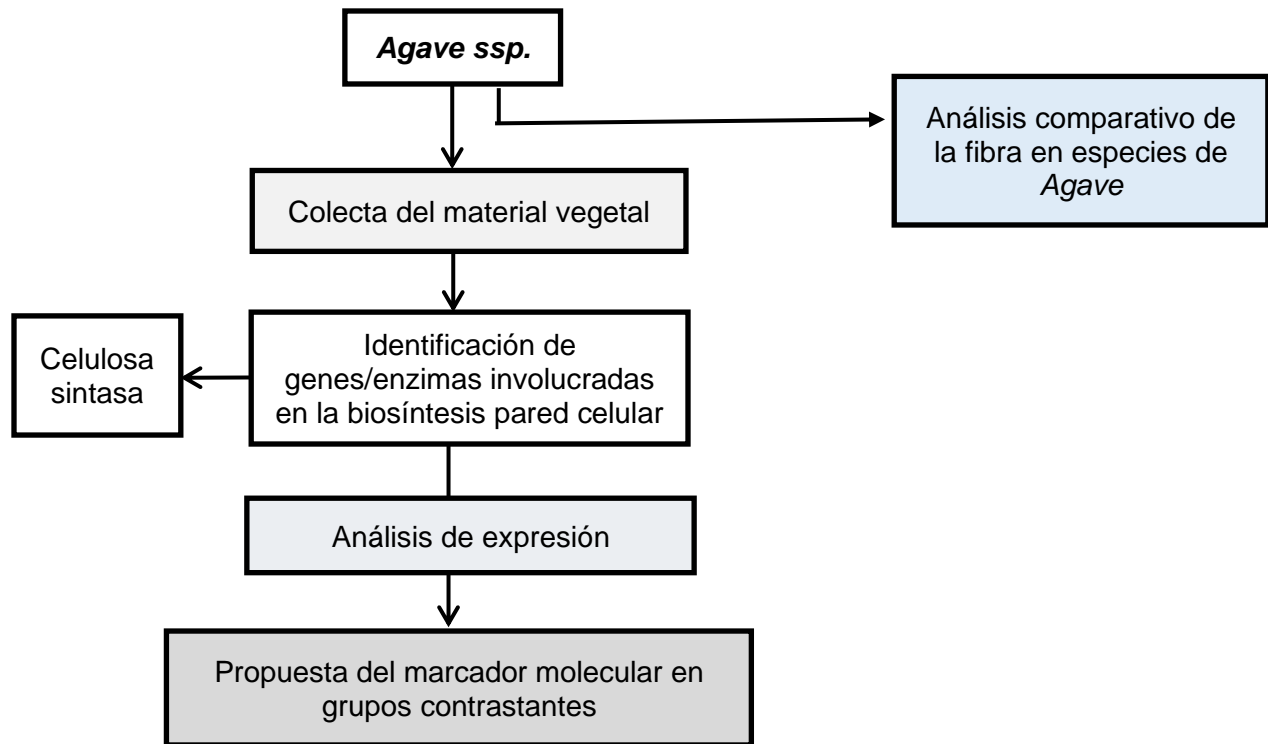


Figura 1.3. Estrategia experimental del proyecto.

CAPÍTULO II

2. EXPRESIÓN DE LOS GENES *CesA* Y EL ANÁLISIS DE LAS FIBRAS COMPARANDO TRES ESPECIES DE *Agave*

2.1. INTRODUCCIÓN

La celulosa sintasa es una proteína de membrana con actividad catalítica codificada por genes pertenecientes a la superfamilia de *CesA* que participan en la síntesis de cadenas β -(1,4)-glucano que polimerizan la molécula de celulosa para la formación de microfibrillas (Richmond y Somerville, 2000; Ruan *et al* 2003).

Morgan *et al.*, 2013, revelaron la arquitectura de la celulosa sintasa, demostrando cómo la subunidad catalítica A forma un canal conductor de celulosa y sugieren un modelo para el acoplamiento de la síntesis y translocación de celulosa en el que el polisacárido naciente se extiende sobre una molécula de glucosa a la vez.

Para la formación de la pared celular primaria, se requiere de interacciones epistáticas de *CesA1*, *CesA3* y *CesA6* (o proteínas relacionadas a CESA1, CESA3 y CESA6) (Arioli *et al.*, 1998), por su parte, en la formación de la pared celular secundaria, se necesita de *CesA4*, *CesA7* y *CesA8* (Watanabe *et al.*, 2015). Así, en cultivos de importancia económica como la cebada (Appenzeller *et al.*, 2004), el álamo (Li *et al.*, 2013) y el algodón (Joshi *et al.*, 2011) la investigación se ha dirigido a identificar genes pertenecientes a la familia *CesA*. Existen 10 genes conocidos de celulosa sintasa en *Arabidopsis*, de los cuales, los genes *AtCesA1*, *AtCesA3*, *AtCesA6* y *AtCesA10* que se encuentran implicados en la formación de paredes celulares primarias. *AtCesA4*, *AtCesA7* y *AtCesA8* solo se expresan en la pared celular secundaria y coordinan la formación de ella. Taylor *et al.*, 2003 describe que los genes *AtCesA2*, *AtCesA5* y *AtCesA9* tienen una función parcialmente redundante en la deposición de celulosa en células en expansión (Desprez *et al.*, 2007).

Se han reportado un gran número de genes *CesA* en diferentes especies como *Oryza sativa* (*CesA1-CesA9*), *Populus trichocarpa* (*CesA1-CesA18*), y *Hordeum vulgare* (*CesA1- CesA8*) (Wang *et al*, 2010; Djerbi *et al.*, 2005; Burton *et al.*, 2004).

En los últimos años, el conocimiento de su expresión y regulación ha cobrado relevancia (Li *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2015; Huang *et al.*, 2019). En el genoma de *Gossypium hirsutum* y *Gossypium barbadense* L., se identificaron cuatro isoformas del gen *CesA* (*GhCesA5-GhCesA10*) que presentaron expresión diferencial (Li *et al.*, 2013). Se han reportado datos

similares, relacionados con la expresión diferencial de ciertas isoformas de CESA para *Eucalyptus grandis* L. (Lu *et al.*, 2008) y para el álamo híbrido ((*Populus tremula* (L.) x *P. tremuloides* (Michx.)) (Djerbi *et al.*, 2004).

Tamayo-Ordoñez *et al.*, 2018, modelaron la estructura terciaria de CESA en especies vegetales utilizadas en la producción de fibras observando dos grupos con diferente estructura terciaria. El Grupo I incluye géneros como *Macleaya*, *Populus*, *Linum*, *Corchorus*, *Phycollastachys*, *Arabidopsis* y *Gossypium* y el Grupo II incluye géneros como *Solanum*, *Cynara*, *Pinus* y *Boehmeria*. Estos autores sugirieron que las diferencias estructurales en la conformación de la enzima CESA podrían resultar en una alteración positiva de su actividad enzimática. Los géneros *Corchorus* y *Gossypium* mostraron dos tipos de estructura terciaria que podrían estar relacionadas con isoformas de los genes *CesA* y más recientemente, la misma característica fue reportada en *Glycine*, *Linum* y *Agave* L. (Galinousky *et al.*, 2014; Gou *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2013; Nawaz *et al.*, 2017).

Recientemente, Huang *et al.*, 2019, identificaron al menos 38 secuencias de *CesA* de *Agave*. H11648, *A. americana*, *A. deserti* y *A. tequilana*. Hasta donde sabemos, no hay suficiente información disponible enfocada en análisis de expresión del gen *CesA* para *A. fourcroydes* (Henequén), la cual es una especie típica de *Agave* utilizada para la industria de producción de fibra durante el siglo pasado.

La fibra lignocelulósica ha estado bajo un interés considerable en los últimos años como una alternativa prometedora para reducir el uso de fibras sintéticas, debido a que es biodegradable y se obtienen varios subproductos (Francucci *et al.*, 2012; Munasinghe *et al.*, 2013).

Las plantas utilizadas para producir fibra como el agave, el algodón y el yute, se han distinguido por presentar altos valores de celulosa (70-95%) (Mylsamy & Rajendran, 2010; García-Reyes & Rangel-Méndez, 2009; Cedeno-Cruz & Alvares-Jacobs, 1999; Vieira *et al.*, 2002; McDougall *et al.*, 1993).

La fibra de *Agave* L. se ha utilizado desde la época pre-hispánica para la fabricación de diferentes productos como ropa, cuerda, bolsos y calzado (Colunga-GarcíaMarín, 2013), utilizando para este fin varias especies del género *Agave*, como *A. sisalana*, *A. americana*, *A. fourcroydes* y *A. Híbrido* H11648 (*A. amaniensis* Trel. y Nowell X *A. angustifolia* Haw.) X *A. amaniensis*) (Megiatto *et al.*, 2008; Tamayo-Ordoñez *et al.*, 2018; Huang *et al.*, 2019).

Algunas investigaciones genéticas se han enfocado en modelos biológicos que producen fibras, como el lino (Galinousky *et al.*, 2014), el algodón (Abdurakhmonov *et al.*, 2014) y el yute (Samanta *et al.*, 2015), donde asociaron la calidad y el rendimiento de la fibra basado en

factores genéticos y bioquímicos que regulan la producción de biopolímeros de las plantas (Gou *et al.*, 2007).

El objetivo de esta investigación fue comparar especies de *Agave*: *A. tequilana*, *A. sisalana* y *A. fourcroydes*, en términos de contenido de celulosa, organización celular, número de copias y el perfil de expresión de la subunidad A del gen *CesA*, esto podría proporcionar información útil acerca de los niveles de expresión de la región parcial de gen *CesA* en comparación con los estudios de fibra realizados en este trabajo y a través de la mejora genética para lograr una selección de individuos altamente productores de fibra en Agaves.

2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1. MATERIAL VEGETAL

Las especies *Agave tequilana* Weber var. Azul, *Agave sisalana* Perrine y *Agave fourcroydes* Lem var. "Sac ki", fueron recolectadas de la colección del Banco de Germoplasma en el Parque Científico-Tecnológico de Yucatán (GB-PCTY), ubicado en Sierra Papacal, a 20 km al noroeste de Mérida (21° 07' 20" N, 89° 43' 41" O). Se incluyeron tres individuos por cada especie. Todas las plantas seleccionadas tuvieron al momento de la colecta aproximadamente 4 años y se cultivaron en las mismas condiciones ambientales.

2.2.2. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE CELULOSA

Las hojas de las diferentes plantas seleccionadas (por triplicado) se secaron a 100 °C. El contenido de humedad se determinó siguiendo el método ASTM D4442-92, por lo que las hojas secas se trituraron en un molino y el polvo se tamizó en malla entre 40 y 60 mm. Los disolventes orgánicos y los extractos de agua se determinaron utilizando los métodos TAPPI T-204cm-07, T-99-207, respectivamente. El contenido de lignina se midió según el método klason (lignina insoluble T-222 de TAPPI), mientras que la celulosa y la hemicelulosa se determinaron según el procedimiento descrito por Kumar *et al.*, 2009. Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando un análisis de varianza (ANOVA) empleando el paquete estadístico SAS ver. 9.0 (2000) y el programa Origin 9.1. Seguimiento de las pruebas estadísticas F se evaluaron con una significancia de 0,05, las medias se compararon mediante pruebas de Tukey ($p \leq 0.05$) y la prueba t de Student ($p \leq 0.05$).

2.2.3. AISLAMIENTO DE LA SECUENCIA DE LA SUBUNIDAD PARCIAL A DE *CesA*

El aislamiento de las secuencias para la subunidad catalítica A de *CesA*, se realizó mediante la base de datos GenBank a partir de transcriptomas reportados de especies de *Agave*. Los cebadores fueron diseñados utilizando el software DNAMAN y Primer3Plus, constan de la siguiente secuencia: FW CAGGCTACTTCCGAAAGAG, REV TGTTATTGCGTAGTGCAA. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen de 50 μ L que contenía 25 ng de ADN genómico, 10 μ M dNTP, 10 μ M de cada cebador, 2,5 unidades de *Taq* polimerasa y 1X tampón de reacción de PCR (Life Technologies, Rockville, MD, U.S.A.) con 1,5 mM MgCl₂. Las condiciones de PCR incluyeron un ciclo de 3 min a 94 °C para la desnaturalización inicial, seguido de 35 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a temperatura de alineación (55°C), 1 min a 72 °C, y finalmente, 7 min a 72 °C. Los productos de 150 pb PCR se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 1,2%. La purificación, clonación y secuenciación de productos de PCR se llevó a cabo según Tamayo-Ordoñez et al. (2016b). Las clonas de celulosa sintasa A (*CesA*) de diferentes especies de *Agave* fueron secuenciados por el método NGS del secuenciador ABI 3730 XL en Macrogen Korea utilizando los cebadores universales M13.

2.2.4. ANÁLISIS DE LA RELACIÓN DE LA SUBUNIDAD CATALÍTICA A DE LA CELULOSA SINTASA EN PLANTAS

De la base de datos GenBank se obtuvieron secuencias representativas del orden de las plantas Poales, Rosales, Curcubitales, Malvales, Malghigiales. Las secuencias de aminoácidos se alinearon y compararon con la base de datos GenBank utilizando el programa BioEdit Sequence Alignment Editor 5.0.6 (Hall, 1999) y el software CLUSTAL W (Thompson et al., 1994). La filogenia se reconstruyó por máxima verosimilitud y la confianza del clúster se probó mediante 1.000 iteraciones de bootstrap. El análisis filogenético se realizó en el software MEGA versión 6.0 (Tamura et al. 2013). Los dominios de interés para ambas proteínas se identificaron con el Conserved Domain Database (Derbyshire et al. 2015). Los cambios mutacionales significativos en las secuencias de aminoácidos de *CesA* se evaluaron mediante la construcción de una red de mutaciones de distancia mínima utilizando software de NETWORK v.4.6 (<http://www.fluxus-engineering.com>; Bandel et al., 1999) y el método de unión de mediana, asumiendo ϵ de 0 y relación de transversión/transición de 1:2.

El análisis terciario de la estructura de CESA se realizó con SWISS-MODEL (Biasini et al. 2014). Para el modelado de la estructura terciaria en *Agave L.*, se generó un dímero entre la secuencia de control de *Rhodobacter sphaeroides* y la secuencia de consenso de *Agave L.* (33

aa). Se consideraron los valores de identidad de secuencia (%), Estimación de calidad del modelo global y Análisis del modelo cualitativo. Como referencias, se incluyeron secuencias correspondientes a *Rhodobacter sphaeroides* (Morgan *et al.* 2013).

2.2.5. DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE COPIAS DEL GEN *CesA*

La secuencia correspondiente a la región de la subunidad catalítica A de *CesA*, fue amplificada y utilizada para la curva de calibración según Rubio-Piña *et al.*, (2016). La curva estándar se construyó a partir de las clonas del gen *CesA* en diluciones seriales (100,10, 1, 0,1, 0,01, 0,001, 0,0001, 0,00001, 0,000001 y 0,0000001 ng/mL). Mediante secuenciación, se verificó que cada clona contenía solo una copia del gen. Cada concentración de plásmidos se convirtió en número de copia de acuerdo con la fórmula propuesta por Whelan *et al.* (2003) y Lu *et al.* (2012): $\text{ADN (copia)} = 6.02 \times 10^{23}(\text{copies mol}^{-1}) \times \text{ADN (g)}/\text{ADN pb} \times 660 (\text{g mol}^{-1}\text{bp}^{-1})$. La amplificación de *CesA* se realizó utilizando los cebadores con secuencia: FW CAGGCTACTTCCGAAAGAG, REV TGTTATTGCGTAGTGCAA. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen de 50 μ L que contenían 25 ng de ADN genómico, 10 μ M DNTP, 10 μ M de cada cebador, 2,5 unidades de *polimerasa Taq* y 1X tampón de reacción de PCR (Life Technologies, Rockville, MD, U.S.A.) con 1,5 μ M MgCl₂. Las condiciones de PCR incluyeron un ciclo de 3 min a 94 °C para la desnaturalización inicial, seguido de 35 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a temperatura de alineación (55°C) según cada conjunto de cebadores utilizados, 1 min a 72 °C, y finalmente, 7 min a 72 °C. Los productos de PCR se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 1,2%. La purificación, clonación y secuenciación de productos de PCR se llevó a cabo según Tamayo-Ordoñez *et al.*,2016b. El número de ciclos de PCR para que la señal de fluorescencia alcanzara un valor superior al de la fluorescencia de fondo (valor umbral del ciclo ct) se determinó de acuerdo con la intensidad del umbral de fluorescencia utilizando el software StepOne v2.0 (Applied Biosystems). Los valores de Ct se analizaron contra el logaritmo de sus concentraciones iniciales. La curva estándar se generó mediante regresión lineal de los puntos trazados. Siguiendo a Yuan *et al.*,2007, se realizó un análisis de regresión para la curva estándar. El procedimiento de regresión se realizó en SAS para modelar el valor de Ct contra la concentración de ADN de entrada transformada en logaritmo. Para fines de control de calidad de datos, la declaración de prueba que establece la equivalencia de Ct a -1 ayuda a estimar si la pendiente de la regresión lineal simple es -1 e indica una eficiencia de amplificación del 100%. Además, la eficiencia de amplificación por PCR

(E) se calculó a partir de la pendiente de cada curva mediante la fórmula $E = 10^{-1/\text{pendiente}-1}$.

2.2.6. CUANTIFICACIÓN RELATIVA DEL GEN *CesA*.

El aislamiento de ARN y la síntesis de ADNc se realizaron según Tamayo-Ordóñez et al., 2015. El ARN se obtuvo a partir de una muestra de 100 mg de hoja de la parte basal de cada especie de *Agave* analizada, utilizando el método TRIZOL (Invitrogen, USA) siguiendo el protocolo del fabricante. La integridad del ARN se verificó en geles de agarosa al 1,3% y la cuantificación se realizó por espectrometría utilizando las relaciones A_{260}/A_{280} y A_{260}/A_{230} en NANODROP (NANODROP-1000, ThermoScientific, USA). Se digirió 1µg de ARN total con 1U RQ1 RNase-Free DNase I (PROMEGA) y DNase 1X buffer de reacción en un volumen final de 10 µL. Las muestras se incubaron a 37°C durante 30 min. Posteriormente, la DNase I se inactivó añadiendo 1 µL de RQ1 DNase Stop Solution y se incubó a 65°C durante 10min. La ausencia de contaminación por ADN se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa (1,3%) y PCR negativa, utilizando como plantilla 50 ng/µl de ARN tratado con DNase I. En esta PCR se incluyó una muestra de ADN genómico como control positivo.

El ADNc se sintetizó utilizando el sistema de transcripción inversa GoScript (PROMEGA, EE. UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizó un control positivo (ARN de control positivo de kanamicina de 1,2 Kb) proporcionado en el kit para estimar el rendimiento de la síntesis de ADNc. Las concentraciones de ADNc se verificaron mediante mediciones en NANODROP. Los ADNc obtenidos se almacenaron a -80°C hasta su uso.

Con el objetivo de descartar la fluorescencia originada a partir de productos de PCR inespecíficos y la formación de dímeros, se realizó un análisis de curva de fusión. Con el fin de eliminar la contaminación del ADN, siempre se incluyeron controles negativos para cada gen en los experimentos. La señal del SYBR green se estandarizó con una referencia pasivo (ROX) incluido en el SYBR Green PCR Máster Mix. Para el análisis de la expresión del gen *CesA*, utilizamos las mismas condiciones descritas anteriormente.

La expresión relativa del gen fue determinada por el método $\Delta\Delta Cq$ entre los genes diana y referencia (18S rDNA) (Nicot *et al.* 2005; Maroufi *et al.* 2010), por la siguiente ecuación: $\text{Expresión relativa} = (E_{\text{ref}})^{C_{\text{tref}}}/(E_{\text{target}})^{C_{\text{target}}}$ (Pfaffl 2001).

Los valores de número de copia de transcripciones (RT-qPCR absoluto) se obtuvieron extrapolando los valores de ct obtenidos a partir de ADNc en todas las especies de *Agave* con los valores de curvas estándar, preconstruidas.

2.2.7. ANÁLISIS DE LAS FIBRAS DE *Agave* MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO.

Los estudios microscópicos de las fibras de *A. tequilana*, *A. sisalana* y *A. fourcroydes* fueron analizados por Microscopía electrónica de barrido. Las fibras se obtenían manualmente rasgando o separando las fibras de las hojas. El proceso manual se realizó con instrumentos tradicionales, como un cuchillo sin filo, banco y mazo de madera (Hernández *et al.*, 2004).

Las muestras se montaron en trozos metálicos con cinta adhesiva conductora de carbono (Electron Microscopy Science) y se recubrieron con una capa de oro de 150 Å (Denton Vacuum Desk II). Las mediciones del grosor de la fibrilla de celulosa, el número de microfibrillas de celulosa que componen cada fibrilla y el área de apertura de las microfibrillas de celulosa se analizaron en el software AutoCad 2017. Las mediciones se realizaron en diez campos por muestra para cada especie. El análisis de muestras y el registro de imágenes se realizaron utilizando un microscopio electrónico de barrido (Jeol, JSM-6360LV). Los datos recolectados fueron sometidos a análisis estadístico mediante pruebas de Tukey evaluadas a $P > 0,05$.

2.2.8. ANÁLISIS HISTOLÓGICOS DE LAS FIBRAS DE *Agave*.

Los segmentos de hojas se fijaron en la solución FAA durante 4 días en ausencia de luz. Las muestras fueron deshidratadas con etanol a diferentes concentraciones (30%, 50%, 70%, 85% y 96%) y se incrustaron en una resina plástica de metacrilato de glicol (JB-4 Embedding Solution Polysciences. Los Ángeles, California, EE. UU.). Los tejidos se seccionan con un espesor de 2-4 μm en un microtomo rotacional HM 325 Microm y se tiñen con azul de toluidina (0,05%, 0,2 M, en acetato de sodio) para visualizar la organización celular, según lo descrito por Pérez-Núñez *et al.*, 2006, fueron analizados en un microscopio de luz de epifluorescencia Axio Scope A1, con cámara CSsc1 electrónica adjunta. Las imágenes fueron fotografiadas a 10x y 40x bajo campo brillante.

2.3. RESULTADOS

2.3.1. CONTENIDO DE CELULOSA

Las especies de agave productoras de fibra presentaron variabilidad inter-específica en cuanto al área foliar, la cual fue 2.5 y 1.8 veces mayor al comparar *A. sisalana* con *A. tequilana*, y *A. sisalana* con *A. fourcroydes*, respectivamente. Así mismo, la especie con mayor contenido de fibra (62%) fue *A. sisalana*, seguida de *A. fourcroydes* (53%) y *A. tequilana* (38%). Las diferencias fueron significativas (prueba de Student; $p \leq 0.05$) (cuadro 2.1).

Cuadro 2.1. Parámetros evaluados para cada especie de *Agave*.

	<i>A. tequilana</i> (2X)	<i>A. silanana</i> (5x)	<i>A. fourcroydes</i> (5X)
Longitud de la hoja (L) (cm)	70.3 ± 2 ^a	81.2 ± 1.3 ^b	72.7 ± 4 ^c
Ancho de la hoja (A) (cm)	4.1 ± 0.5 ^a	9.0 ± 0.6 ^b	5.5 ± 0.7 ^c
Area foliar (L x A) (cm²)	288.0 ± 11.6 ^a	730.5 ± 33.8 ^b	397.7 ± 21.2 ^c
Diametro de la planta (cm)	112.3 ± 6.3 ^a	177.3 ± 7.1 ^b	133.7 ± 10.3 ^c
Contenido de celulosa (%)	38 ± 0.6 ^a	62 ± 2 ^b	53 ± 2.6 ^c

^a, ^b, ^c corresponde a los valores significativamente diferentes con respecto a la desviación estándar (prueba t de Student; $p \leq 0.05$).

El análisis inter-específico presentó diferencias significativas en cada especie evaluada, *A. sisalana* presentó valores más altos en longitud de hoja, ancho de la hoja, diámetro de la planta y por ende mayor área foliar, en comparación con las especies de *A. fourcroydes* donde se observa valores mayores en todos los parámetros evaluados comparando con *A. tequilana*, que presenta los valores más bajos en todos los parámetros.

2.3.2. CUANTIFICACIÓN ASOLUTA Y RELATIVA DEL GEN *CesA*

El perfil de amplificación de una región parcial de la subunidad A del gen *CesA* entre especies se obtuvo utilizando cebadores específicos para *Agave* y se calculó el número de copias expresadas. El número de copias del gen *CesA* (Figura 2.1) mostró tres veces más copias en

A. sisalana (Ct 27,36) en comparación con *A. tequilana* (Ct 23,71) y *A. fourcroydes* (Ct 26,02), donde no se observaron diferencias significativas.

Por el contrario, los resultados observados en el análisis de expresión relativa (Figura 2.2) utilizando el gen de referencia 18S ribosomal, indicaron que *A. fourcroydes* presentó la mayor expresión relativa de *CesA*, la cual aumentó 5 veces en comparación con la expresión en *A. sisalana* y *A. tequilana*. Todos los datos presentaron un valor equivalente de desviación estándar.

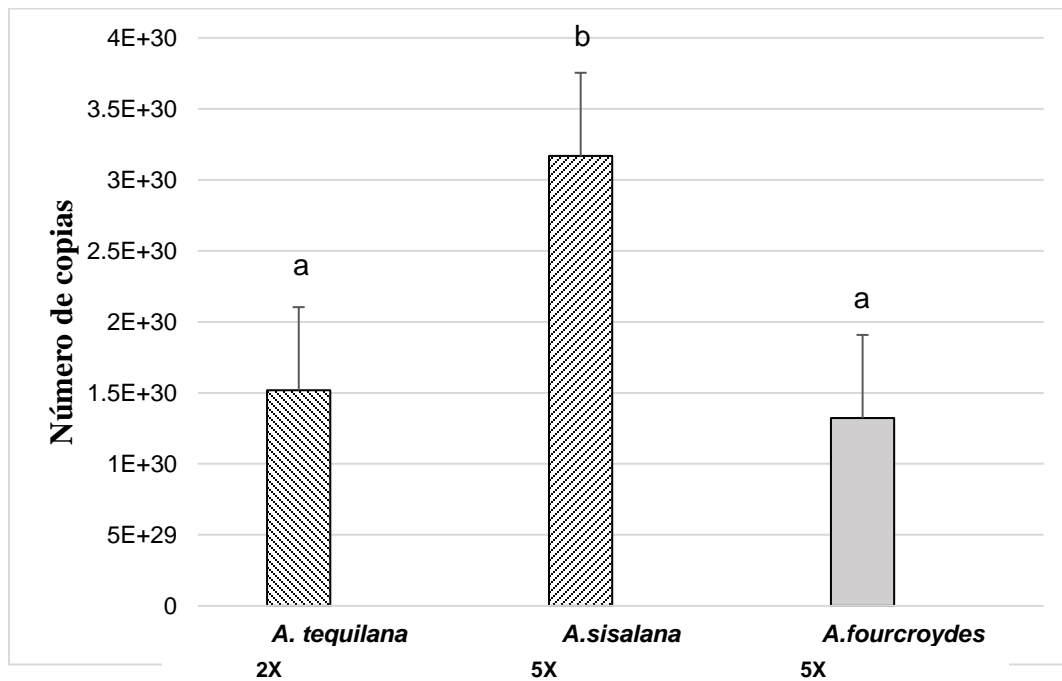


Figura 2.1. Número de copias evaluadas del gen *CesA* en diferentes especies de *Agave*, *A. tequilana*, *A. sisalana* y *A. fourcroydes*. Las barras y letras representan las diferencias significativas, (prueba de t Student; $p \leq 0.05$).

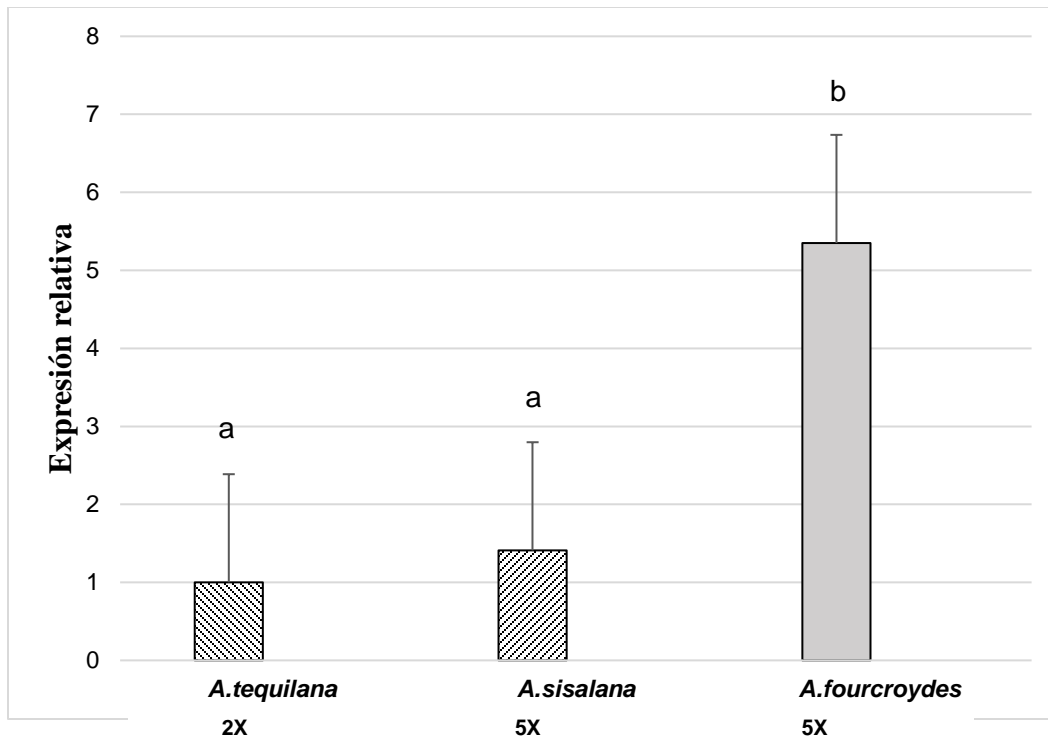


Figura 2.2. Análisis de la expresión relativa del gen *CesA* evaluada en diferentes especies de *Agave*, *A. tequilana*, *A. sisalana* y *A. fourcroydes*, Utilizando un gen de referencia 18S ribosomal. Las barras y letras representan las diferencias.

2.3.3. ESTRUCTURA DE FIBRA Y ANÁLISIS DE ORGANIZACIÓN

El análisis longitudinal de fibrillas de celulosa en *A. tequilana*, *A. sisalana* y *A. fourcroydes*, demostró que las fibrillas de *A. sisalana* de $252 \mu\text{m} \pm 4$ son más gruesas en comparación con las fibrillas de *A. fourcroydes* de $128 \mu\text{m} \pm 3$ y de *A. tequilana* de $129 \mu\text{m} \pm 5$ (Figura 2.3. A, D, G).

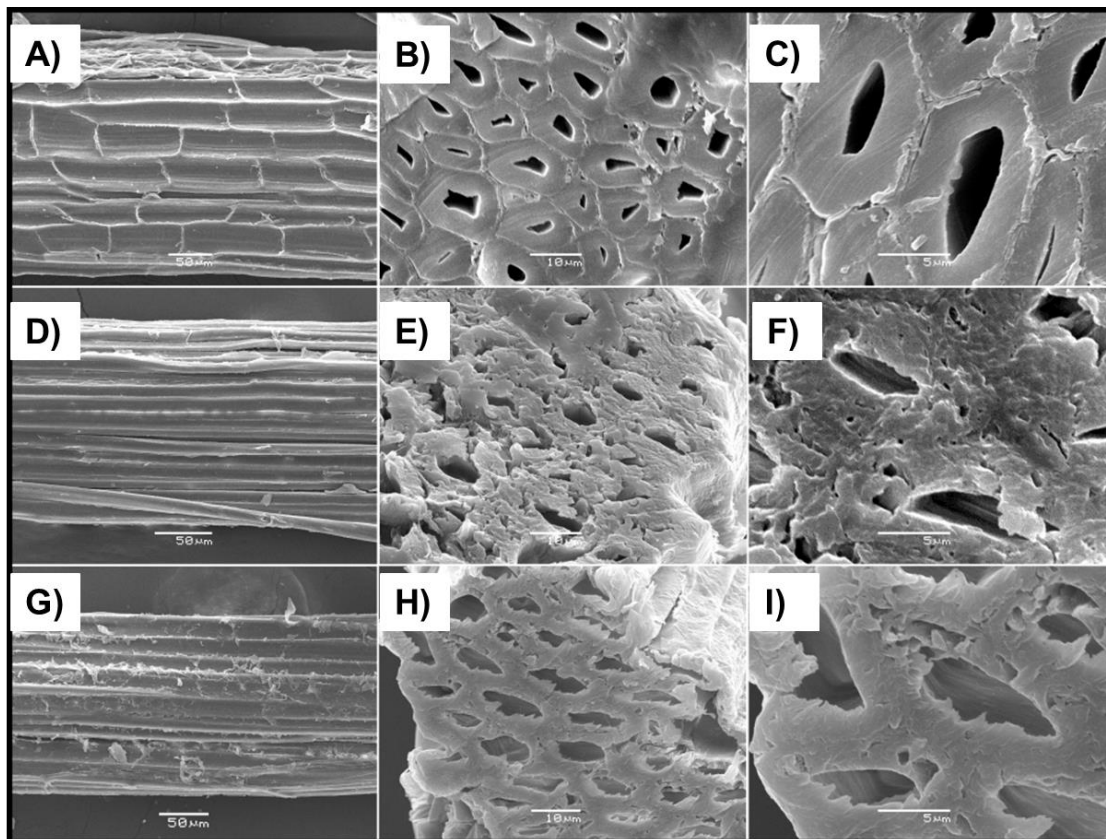


Figura 2.3. Análisis longitudinales de fibrillas de celulosa (A, D, G) a 50 μm y transversales (B, E, H) a 10 μm y (C, F, I) a 5 μm en diferentes especies de *Agave*, *A. tequilana* (G, H, I), *A. sisalana* (A, B, C) y *A. fourcroydes* (D, E, F).

En cuanto al número de microfibrillas de celulosa, *A. tequilana* presentó más microfibrillas (28 ± 2) en comparación con *A. fourcroydes* (21 ± 3) y *A. sisalana* (23 ± 2) (Figura 2.3. H, E, B). El área de apertura de las microfibrillas (23 a 26 μm) no mostró diferencias entre las tres especies de *Agave* analizadas (Figura 2.3. C, F, I).

Se realizó un análisis histológico para observar la estructura y organización de las células que componen la fibra. El análisis de los componentes celulares en las especies de *Agave* se muestra en la figura 2.4. En las secciones longitudinales a 100 μm , (2.4. A, D, G), se observaron diferencias en las células del parénquima, en *A. sisalana* (2.4 A) las células se observan más engrosadas, mientras que en *A. fourcroydes* y *A. tequilana* las células son isodiamétricas.

Los haces vasculares en *A. sisalana*, *A. fourcroydes* y *A. tequilana* se observaron totalmente diferenciados y definidos. Sobre la base de las secciones longitudinales a 20 μm (2.4.B, E, H),

la organización celular de las traqueidas de tipo espiralada y las fibras de esclerénquima mostró que *A. sisalana* y *A. fourcroydes*, no presentan diferencias en el grosor de cada célula. Las secciones transversales a 20 μm revelan que *A. sisalana* (2.4.C) y *A. fourcroydes* (2.4.F) no presentan diferencias en el tamaño de los haces vasculares, las fibras esclerénquima y el floema manteniendo una organización similar, En *A. tequilana* (2.4.I) las fibras del esclerénquima son más pequeñas y en menor proporción, comparadas con *A. sisalana* y *A. fourcroydes*.

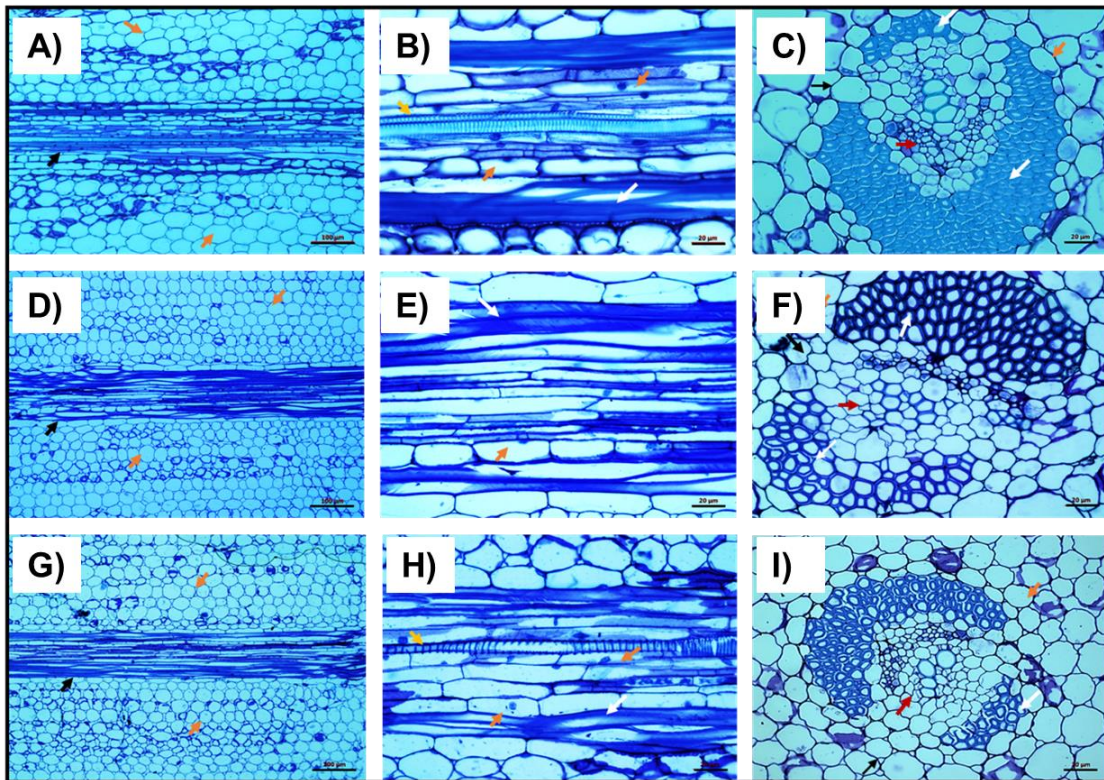


Figura 2.4. Estructura y organización de componentes celulares de la fibra, secciones longitudinales a 100 μm (A, D, G) y 20 μm (B, E, H, C, F, I), en diferentes especies de *Agave*, *A. tequilana* (G, H, I), *A. sisalana* (A, B, C) y *A. fourcroydes* (D, E, F), las flechas negras corresponden a los haces vasculares, flechas amarillas corresponde a las traqueidas de tipo espiralada, flechas naranjas corresponde a las células parenquimáticas, flechas blancas corresponde a las fibras del esclerénquima y las flechas rojas corresponden al floema.

2.3.4. ANÁLISIS DE LA SUBUNIDAD A DE LA PROTEÍNA CESA

Con el fin de identificar las características estructurales de la celulosa sintasa, se realizó la modelación de la secuencia consenso de la estructura terciaria de CESA en *Agave* y su comparación con la estructura terciaria a partir de varios genes utilizados para obtener fibra. El análisis mostró que las accesiones de proteínas anotadas como CESA tienen una identidad de secuencia superior al 21% con la subunidad A de *Rhodobacter sphaeroides* (Figura 2.5), a partir de ello, se definieron dos grupos con base en su estructura terciaria (designados Grupos I y II): el Grupo I incluyó el *Agave* L., *Populus tremuloides*, *Populus tomentosa*, *Linum usitatissimum*, *Corchorus capsularis*, *Phycollastachys edulis* y *Gossypium hirsutum*; y el Grupo II incluyó *Corchorus olitorius*, *Gossypium herbaceum* y *Boehmeria nivea* (Figura 2.6). Especies pertenecientes a los generos *Corchorus* y *Gossypium* están presentes en ambos grupos y mostraron dos tipos de estructura terciaria que podrían estar relacionadas con isoformas de los genes *CesA* descritos en estos géneros, y recientemente también descritos en soya y *Agave*.

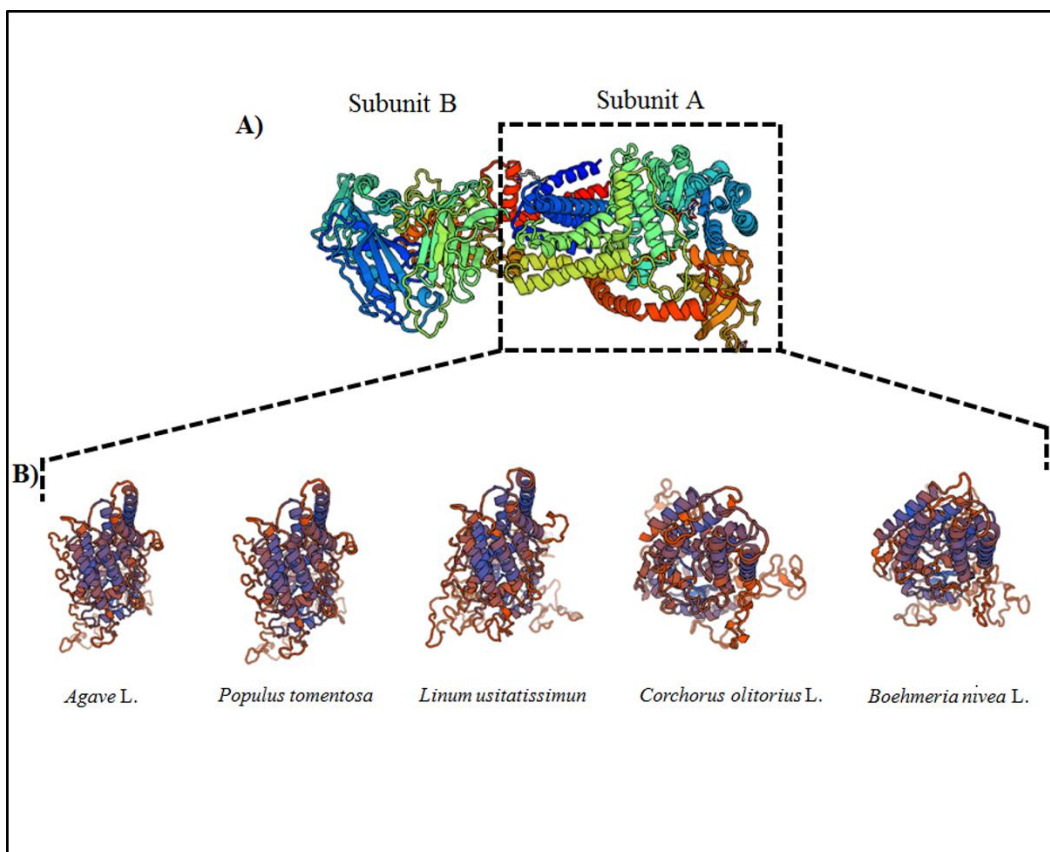


Figura 2.5. Modelamiento de la estructura terciaria de la subunidad catalítica A y B de celulosa sintasa en diferentes especies de plantas. A) estructura terciaria de las subunidades, B) estructura terciaria en las diferentes especies productoras de fibra.

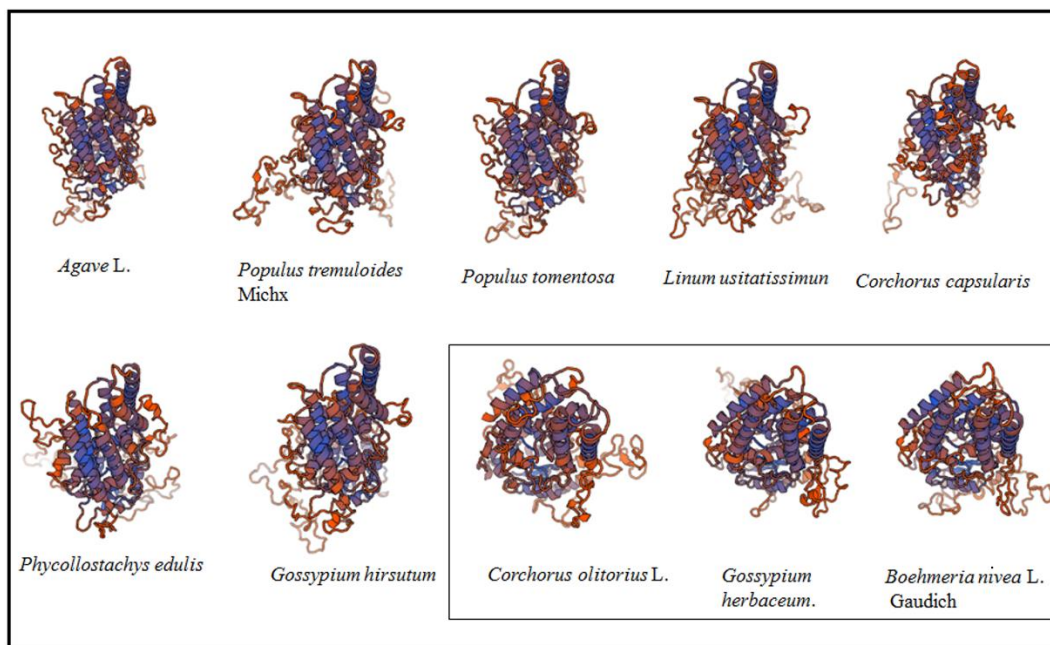


Figura 2.6. Modelamiento de la estructura terciaria de celulosa sintasa en diferentes especies de plantas productoras de fibras.

La red de haplotipos (Figura 2.7) fue modelada para identificar cambios microevolutivos entre ordenes Asparagales, Malphigiales, Poales, Malvales, Curcubitales y Rosales. En general, la construcción de la red mínima de haplotipos de la región parcial (α -hélice CESA), de especies de *Agave* y miembros del orden de plantas Poales, Rosales, Curcubitales, Malvales, Malghigiales fue apoyada por 146 mutaciones totales (52 discretas y 94 divergentes) y la formación de 29 haplotipos.

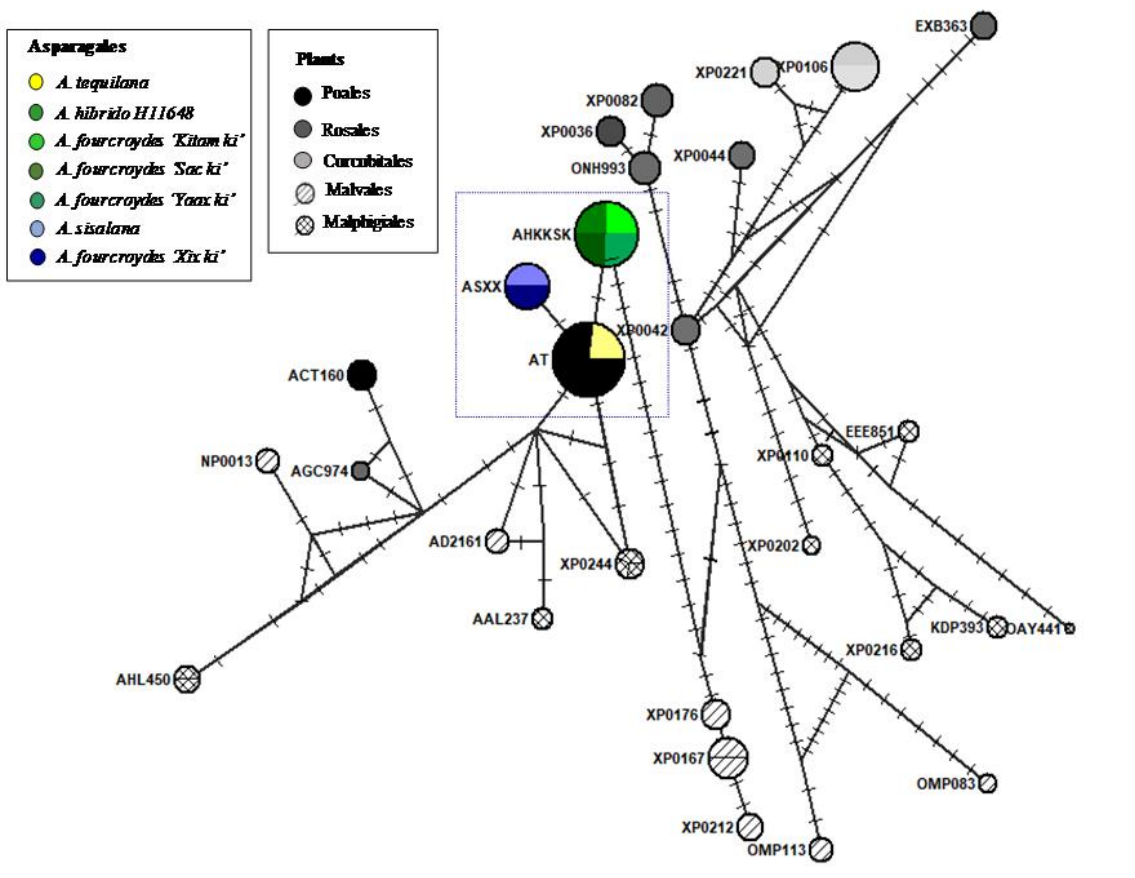


Figura 2.7. Red de haplotipos de especies de *Agave* comparadas con diferentes ordenes: Asparagales, Malphigiales, Poales, Malvales, Curcubitales y Rosales.

El análisis de la relación evolutiva de la α -hélice CESA (33 aa) indicó la conservación de los residuos de aminoácidos entre las especies de *Agave* (*A. fourcroydes*, *A. sisalana* y *A. híbrido* H11648), con excepción de *A. tequilana* (Figura 2.6). Los resultados presentaron la formación de 3 grupos de haplotipos, entre los que se agruparon: *A. sisalana* y *A. fourcroydes* 'Xix ki'; seguidos de *A. híbrido* AH11648, *A. fourcroydes* 'Kitam ki', *A. fourcroydes* 'Sac ki' y *A. fourcroydes* 'Yaax ki'. Se distinguió una relación intraespecífica entre *A. híbrido* H11648, *A. fourcroydes* 'Kitam ki', *A. fourcroydes* 'Sac ki' y *A. fourcroydes* 'Yaax ki'. Se observó la formación de un grupo exclusivo entre *A. tequilana* 'Azul' y especies del orden Poales como resultado de ciertas mutaciones compartidas entre las accesiones *Bambusa emeiensis* (AFG25777.1) y *Bambusa oldhamii* (AAY43222.1, AAY43220.1).

Este análisis permitió la discriminación de 7 haplotipos del orden Rosales (*Fragaria vesca* XP004296326.1, *Cicer arietinum* XP004498142.1, *Morus notabilis* EXB363045.1) de los cuales las accesiones de *Prunus* (XP003635328.1, XP008218356.1, ONH99326 .1) son cercanas

(cambios de aminoácidos de 2 a 3 puntos) y se derivan 2 haplotipos del orden Cucurbitales (*Cucumis melo* XP010644596.1 ['sativus' KGN44038.1], *Momordica charantia* XP022139561.1). Este análisis indicó un lento dinamismo genético en *Agave*, pero con una alta especialización genética en la región α - hélice CESA. De ahí se infiere que las especies de *Agave* tienen un camino evolutivo compartido con las accesiones *Populus tremuloides* (AAL23710.2), *Populus trichocarpa* (XP024443523.1) *Populus tremulosa* (AKE81080.1), *Jatropha curcas* (XP020539381.1), *Gossypium herbaceum* (ADZ16120. 1), *Gossypium hirsutum* (NP001314638.1), *Phyllostachys edulis* (ACT16001.1), *Boehmeria nivea* (AGC97433.2) y el haplotipo específico *Linum usitatissimum* (AHL45029.1). Este patrón evolutivo está apoyado por el análisis de similitud de aminoácidos de CESA de diferentes órdenes de Plantas (Asparagales, Poales, Rosales, Curcubitales, Malvales y Malghigiales) (Figura 2.7).

El análisis del cambio de secuencia aminoácídica en CESA presento un subgrupo que incluye accesiones de los géneros *Agave*, *Linum*, *Gossypium*, *Boehmeria* y *Populus* que se utilizan para la producción textil, la secuencia de *Agave* fue similar a *Populus*.

2.4 DISCUSIÓN

A nivel mundial, el interés y la demanda de fibras naturales y sus componentes se han incrementado, derivado de los beneficios que ofrecen al medio ambiente (Mylsamy., 2011; Mlik *et al.*, 2020). El componente mayoritario en las fibras naturales es la celulosa la cual está presente en porcentajes variables en diferentes especies como *Acer monspessulanum* (12%), *Pinus pinaster* (27%), *Miscanthus sinensis* (42%), *Corchurus capsularis* (63%), *Linum usitatissimum* (70%), *Boehmeria nivea* (86,5%) y *Gossypium hirsutum* (95%) (Rodríguez, 2006; Sing, 2006, Petisco *et al.*, 2005; De la Rosa *et al*, 2004; Fedeniuk *et al*, 1994).

Entre las especies de *Agave* más utilizadas para la producción de fibra, destacan el híbrido 11648, *A. americana* Lem, *A. fourcroydes* Lem, *A. lechuguilla* Torr y *A. sisalana* Perrine, entre otras (Huang *et al.*, 2019; Mayorga-Hernández *et al.*, 2004; Hulle *et al.*, 2015; Robert *et al.*, 1987). Los contenidos de fibra obtenidos de cada especie de *Agave* varían con la especie por el método en estudio (Hulle *et al.*, 2015, Thamae & Baillie, 2007, Sghaier *et al.*, 2012).

El porcentaje de celulosa en varias especies de *Agave* puede estar entre el 43% y el 80% (Mylsamy & Rajendran, 2011; García-Reyes & Rangel-Méndez, 2009; Cedeno-Cruz & Alvarez-Jacobs, 1999; Vieira *et al.*, 2002; McDougall *et al.*, 1993). En el presente estudio observamos valores en un rango dentro de lo reportado, el mayor porcentaje con el contenido de celulosa se

ha observado en *A. sisalana* y *A. fourcroydes*, debido a que son especies utilizadas para la producción de fibra, mientras que *A. tequilana* es una especie utilizada para la elaboración de bebidas alcohólicas, lo que indicaría que existen mecanismos especializados en la biosíntesis de celulosa para plantas productoras de fibras.

A. sisalana tiene mayor longitud de hoja, mayor ancho de hoja, mayor área foliar y mayor contenido de celulosa tal como se ha observado en otras especies de *Agave* (*A. salmiana*, *A. lechuguilla*, *A. americana*, *A. mapisaga*, *A. angustifolia* Haw., *A. tequilana*) se ha demostrado una relación a mayor ancho de la hoja, mayor área foliar y mayor contenido de fibras como fue descrito por Negrete *et al.*, (2010), por lo que se atribuye que el grosor de la hoja y el área foliar sean características distintivas para la obtención de plantas sobresalientes para fibra.

2.4.1. LA EXPRESIÓN DEL GEN *CesA* EN ESPECIES DE *Agave*

En los últimos años, con el rápido desarrollo de la ingeniería genética y la bioinformática, se han descubierto nuevos genes *CesA* en varias especies, así como su participación en la biosíntesis de la pared celular primaria y secundaria como en *Miscanthus x giganteus* donde analizaron genes *MgCesA*, involucrados en la biosíntesis de la pared celular (Zeng *et al.*, 2020). Los genes *CesA1*, *CesA3* y *CesA6* del sorgo están implicados en la formación de las paredes celulares primarias y desempeñan el mismo papel que en los reportados en *Arabidopsis*. Los genes *CesA4*, *CesA7* y *CesA9* son altamente homólogos a la formación de paredes celulares secundarias del arroz con los genes *CesA4*, *CesA7* y *CesA8* de *Arabidopsis* (Brian *et al.*, 2016). Según la evolución y relación entre especies, en *Miscanthus lutarioriparius*, el gen *MICesA7* puede estar implicado en la formación de la pared celular primaria, mientras que el gen *MICesA4* y el gen *MICesA9* pueden estar implicados en la formación de la pared celular secundaria (Li *et al.*, 2021). En el transcriptoma de *A.* híbrido reportado por Huang *et al.*, (2019) identifican cinco secuencias de genes *CesA* y observan expresión diferencial en las especies evaluadas, sin embargo, el enfoque no está dirigido a especies productoras de fibras, por lo que en este trabajo se evalúa la expresión de una secuencia aislada que corresponde a la región específica involucrada en la síntesis y traslocación de celulosa en especies productoras de fibra en *Agave*.

Un estudio reportado por Xing *et al.*, (2018) mencionan que debe haber regulaciones de transcripción complejas durante el desarrollo de la fibra, tal como los datos obtenidos en los análisis de cuantificación absoluta y relativa en este trabajo.

El análisis de la cuantificación absoluta del número de copias del gen *CesA* indicó una relación que podría asociarse con las diferencias en el tamaño del genoma de cada especie analizada. La poliploidía es un fenómeno biológico fundamental poco explorado en *Agave* L. el género tiene un número cromosómico básico de $n = 30$ y el nivel de ploidía de su especie varía de diploide ($2n = 2x = 60$) a octoploide ($2n = 8x = 240$) (Robert *et al.*, 2008; Moreno-Salazar *et al.*, 2007; Palomino *et al.*, 2015). El mantenimiento de múltiples copias en cada especie se ha descrito que es un mecanismo eficaz para resistir el riesgo de mutación. Más allá de eso, se ha encontrado que los *CesA* homólogos entre los subgenomas en las plantas poliploides pueden haber producido diferenciación funcional, que está relacionada con la domesticación (Zhang *et al.*, 2015). El aumento de genomas en estas especies podría provocar una desregulación de los genes como consecuencia de los cambios genéticos que se originan a partir de la poliploidía (Cheng *et al.*, 2018; Baduel *et al.*, 2018).

Con base en la comparación realizada entre especies de *Agave*, se observa que *A. fourcroydes* presentó una mayor expresión relativa del gen *CesA*. Por otro lado, las especies *A. sisalana* y *A. tequilana*, no presentaron diferencias significativas en la expresión de *CesA*. Lo anterior podría deberse que *A. sisalana* presenta otras isoformas de *CesA* que participan en la síntesis de celulosa y en el caso de *A. tequilana* podría deberse a que es una especie diploide, en esta especie se observaron valores bajos en número de copias y expresión relativa, debido a que se ha reportado más activa la regulación metabólica de la síntesis de fructanos lo que la ha llevado a tener mayor capacidad de producir y almacenarlos (Gross *et al.*, 2013) a diferencias de las fibras.

2.4.2. LA IMPORTANCIA DE LAS FIBRILLAS DE CELULOSA Y LA ORGANIZACIÓN DE CÉLULAS EN ESPECIES PRODUCTORAS DE FIBRAS.

En la industria textil, las fibras más delgadas permiten un mejor manejo, pero a veces la resistencia de la fibra se ve afectada (Páez, 2007), el estudio de las fibrillas celulósicas tiene un

campo de aplicación en el sector manufacturero, en áreas como plásticos, aplicaciones médicas y nuevas formulaciones de productos, se ha descrito que va a depender de las características que presenten para el tipo de aplicación que tendrán (Subramanian *et al.*, 2011).

Se han reportado diferentes modelos de la estructura en la organización de microfibrillas de celulosa en otras especies como *Pinus*, *Apium*, *Glycine*, *A. thaliana*, *Brachypodium* y *cladophora* (Fernández *et al.*, 2011; Thomas *et al.*, 2013 ; Newman *et al.*, 2013 ; Wang & Hong, 2016), si bien se puede representar una estructura promedio y el número de cadenas de celulosa puede no variar, pero aún no está claro hasta qué punto puede haber variación entre la estructura de microfibrillas individuales o incluso diferentes partes de ella (Tuner & Kumar., 2018). Observamos que en *Agave* el área de apertura de las microfibrillas no presentó diferencias entre las especies evaluadas, pero sí el número de microfibrillas en *A. tequilana* fue mayor que en *A. sisalana* y *A. fourcroydes*, todas las fibras mostraron el enrollamiento helicoidal de microfibrillas unidas entre sí por un material de unión (lignina), sin embargo las paredes celulares en *A. tequilana* se observaron delgadas lo que concuerda con lo reportado en especies de bajo contenido de fibras (Saxena *et al.*, 2011).

El análisis de los componentes celulares en las especies de *Agave* evaluadas presentó haces vasculares diferenciados y definidos según lo reportado por De la torre- Espinosa *et al.*, (2020), las células del parénquima desempeñan papeles funcionales en el almacenamiento, transporte de carbohidratos, defensa contra patógenos y proporciona soporte mecánico a la planta (Reiterer *et al.*, 2002; Spicer, 2014), *A. sisalana* y *A. fourcroydes* presentaron mayor células del parénquima, mientras que en *A. tequilana* se observan en menor proporción y tamaño. Atribuimos que una mayor cantidad de células del parénquima está relacionada con mayor contenido de celulosa. Las células de esclerénquima se encuentran donde una planta necesita fuerza y apoyo, como son las fibras (Crang *et al.*, 2018), de igual manera *A. sisalana* y *A. fourcroydes* presentan similitud en cuanto al grosor, el tamaño de cada célula y mantienen una organización y abundancia a diferencia de *A. tequilana*, en la que se observa una disminución para cada célula analizada en este estudio, lo que concuerdan con los análisis obtenidos de microscopía electrónica de barrido, respecto a las fibrillas de celulosa, que fueron mayoría para las variedades utilizadas para la fibra (*A. sisalana* y *A. fourcroydes*).

En *A. fourcroydes* se demostró que contiene fibrillas delgadas y largas de celulosa, un número de microfibrillas, células del esclerénquima y parénquima similares a lo observado en *A. sisalana*. Además, el porcentaje de celulosa fue de 53, siendo el segundo mayor porcentaje de celulosa reportado en esta investigación. La optimización del cultivo de *A. fourcroydes* podría competir con cultivos como *A. sisalana* y *A.* híbrido H11648, para obtención de fibras.

2.4.3. ESPECIALIZACIÓN GENÉTICA DE Cesa EN LOS CULTIVOS DE *Agave*.

El estudio del mecanismo de regulación de la síntesis y modificación de la pared celular vegetal ha sido uno de los campos más importantes de la biología del desarrollo vegetal (Cao *et al.*, 2019).

En *Arabidopsis* mutantes con pérdida de función *AtCesA3* y *AtCesA6* condujeron a una disminución de la celulosa (Cano *et al.*, 2003; Fagard *et al.*, 2000; Beeckman *et al.*, 2002). Las mutantes de pérdida funcional de *AtCesA4*, *AtCesA7* y *AtCesA8* mostraron un contenido reducido de celulosa en la pared celular secundaria, que generalmente se acompañaba de cambios en la estructura del xilema. Análisis posteriores revelaron que *AtCesA4*, *AtCesA7* y *AtCesA8* co-expresaron e interactuaron juntos (Persson *et al.*, 2007; Brown *et al.*, 2005; Timmers *et al.*, 2009).

Por otro lado, debido a la selección tradicional de caracteres específicos en *Agave*, explotados para la producción de fibra, es posible que ciertos genes relacionados con la biosíntesis de la pared celular hayan sufrido cambios genéticos que podrían afectar (positiva o negativamente) a la actividad de CESA (Tamayo-Ordoñez *et al.*, 2018). Especies de los géneros *Corchorus* y *Gossypium* están presentes en ambos grupos y mostraron dos tipos de estructura terciaria que podrían estar relacionadas con isoformas de los genes *CesaA* descritos en estos géneros, y recientemente también descritos en soja y *Agave* L. (Tamayo-Ordoñez *et al.*, 2017) a funcionalidad de cada proteína podría contribuir significativamente a las variaciones en la producción de celulosa que podrían estar relacionadas con la calidad de la fibra vegetal y el rendimiento de biopolímeros (Tamayo-Ordoñez *et al.*, 2018).

Los resultados previos sugieren que evolutivamente es posible que los cultivares utilizados para la producción de fibra tengan diferencias genéticas que los hagan ideales para este fin.

Indicando que la selección artificial que el hombre ha ejercido sobre estos cultivares para sus diferentes usos han contribuido a la especialización de genes relacionados con una determinada característica. En *Agave* la presencia de 3 grupos de haplotipos podría reflejar las

diferencias en el uso que el hombre ha ejercido sobre estas especies evaluadas. Si bien se ha utilizado *A. tequilana* para obtener azúcares, se ha demostrado una relación de su haplotipo con Poales y las otras variedades analizadas se han utilizado para obtener fibra, presentando haplotipos diferenciales.

CAPÍTULO III

Este capítulo está sometido a la revista Tropical and Subtropical Agroecosystems

3. EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE GENES *CesA* Y LA RELACIÓN CON EL CONTENIDO DE FIBRA EN HENEQUÉN

3.1. INTRODUCCIÓN

La pared celular de la planta es una estructura que está involucrada en la determinación de la morfogénesis, la arquitectura de la planta, el suministro de soporte mecánico para el cuerpo de la planta, la conducción de agua y nutrientes, la defensa contra el estrés biótico y abiótico, entre otras (Bacic *et al.*, 1988; Carpita y Gibeaut., 1993; Somerville *et al.*, 2004). Se divide en dos partes fundamentales: la pared celular primaria, la cual está asociada a los procesos de crecimiento celular (elongación y división) que determinan el tamaño de los tejidos y órganos y la pared celular secundaria, la cual se forma una vez que se ha detenido el crecimiento celular y está involucrada en el proceso de diferenciación y contribuye a la producción de biomasa en plantas (Keegstra., 2010; Schuetz *et al.*, 2013; Hu *et al.*, 2018). El polímero más abundante en la pared celular es la celulosa, formada por cadenas de glucosa unidas con enlaces β -1,4 que se sintetiza en la membrana plasmática mediante el complejo de celulosa sintasa (Muller & Brown., 1980; Cosgrove., 2005; McFarlane *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2016; Schneider *et al.*, 2016).

Se ha descrito que el gen de la celulosa sintasa (*CesA*) pertenece a una superfamilia, donde se han reportado hasta 50 genes (Richmond & Somerville., 2000; Hazen *et al.*, 2002). En cultivos económicamente importantes como *Hordeum vulgare*, *populus* y *Gossypium* la investigación se ha dirigido a identificar genes involucrados en la formación de la pared celular primaria: *CesA1*, *CesA3* y *CesA6* (o sus proteínas relacionadas CESA1, CESA3 y CESA6) (Arioli *et al.*, 1998; Appenzeller *et al.*, 2004; Joshi *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2013). Por su parte, en la formación de la pared secundaria están involucrados *CesA4*, *CesA7* y *CesA8* (Watanabe *et al.*, 2015).

Hay 10 genes *CesA* conocidos en *Arabidopsis* (*AtCesA1*, *AtCesA3*, *AtCesA6* y *AtCesA10*) que están involucrados en la síntesis de pared primaria, mientras que los genes *AtCesA4*, *AtCesA7* y *AtCesA8* coordinan la formación de la pared secundaria (Taylor *et al.*, 2003) y los genes *AtCesA2*, *AtCesA5* y *AtCesA9* tienen una función parcialmente redundante (Desprez *et al.*, 2007). En *Oryza sativa* se han reportado 11 genes *CesA1-CesA11* (Wang *et al.*, 2010), en *Hordeum vulgare*, 7 genes *CesA HvCesA1*, *HvCesA2*, *HvCesA3*, *HvCesA4*, *HvCesA6*, *HvCesA7* y *HvCesA8* (Burton *et al.*, 2004) y en *Populus trichocarpa* se han reportado 18 genes

CesA *CesA1*, *CesA2-1*, *CesA2-2*, *CesA3-1*, *CesA3-2*, *CesA4-1*, *CesA4-2*, *CesA5-1*, *CesA5-2*, *CesA6-1*, *CesA6-2*, *CesA7-1*, *CesA7-2*, *CesA8-1*, *CesA8-2* *CesA8-3*, *CesA9-1*, *CesA9-2* (Djerbi *et al.*, 2005).

En transcriptomas de *Agave* se han identificado genes *CesA* en *Agave tequilana*, *Agave deserti* y *Agave americana* (Gross *et al.*, 2013; Abraham *et al.*, 2016) y un estudio más reciente enfocado en genes *CesA*, es el reportado por Huang *et al.*, 2019, en *Agave* híbrido H11648, donde se identificaron 38 secuencias *CesA* y de éstas, se identificaron 5 genes de longitud completa *CesA1*, *CesA3*, *CesA4*, *CesA5* y *CesA7*.

Derivado de propiedades como la resistencia (Sydenstricker, *et al.*, 2003), la flexibilidad (Manikandan, *et al.*, 1996), su bajo costo de producción y la capacidad de ser biodegradables (Manikandan, *et al.*, 1996; Toriz & Young, 2002) el interés industrial por las fibras naturales ha ido en aumento. En contraste con ello, la industria de la fibra de henequén ha disminuido en los últimos cincuenta años y su comercio también se ha visto afectado, sin embargo, existen esfuerzos por parte de los países productores por retomar esta actividad, incursionando en nuevos productos y modernizando los procesos (FAO, 2009; Nava *et al.*, 2015).

En otras plantas como *Gossypium* y *Acacia mangium* se ha asociado la calidad y rendimiento de la fibra con el contenido de celulosa y la expresión de genes involucrados en la pared celular (Li *et al.*, 2013; Ren *et al.*, 2018).

Con base en lo anterior, el presente estudio se enfocó a determinar la relación de genes *CesA* con el contenido de fibra en henequén, para lo cual se determinó la expresión relativa de dos genes involucrados en la pared celular primaria (*CesA3* y *CesA5*) y un gen involucrado en la pared celular secundaria (*CesA4*) y se evaluó su relación con el contenido de fibra en plantas de diferentes alturas (contrastantes). La información obtenida sirve de base para la investigación futura enfocada en la selección temprana de individuos con alto contenido de celulosa, que a través del cultivo de tejidos vegetales representa una opción para el mejoramiento genético en beneficio de los productores de este cultivo.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. MATERIAL VEGETAL

La colecta del material vegetal de *A. fourcroydes* Lem. var. "Sac ki" (henequén) se realizó en la Hacienda Santa Teresa, ubicada en Telchac pueblo, en el estado de Yucatán, México (21° 20' 32" N, 89° 15' 45" O), tiene un tipo de suelo regosol, la humedad al 70 % y temperatura de 29 °C. La colecta se realizó por medio de un muestreo aleatorio simple, en una plantación comercial de 5 años, sin replante. Se consideraron 3 tamaños de plantas: bajas (B), de 83 cm, medias (M), de 117 cm y altas (A), de 147 cm, de cada tamaño de planta se colectaron muestras por triplicado, en total se seleccionaron 81 plantas.

2.2. CUANTIFICACIÓN DE CARACTERES MORFOMÉTRICOS

81 plantas seleccionadas fueron caracterizadas morfométricamente midiendo: altura de la planta, longitud de las hojas, porcentaje de peso seco y contenido de agua. Los datos fueron analizados estadísticamente como se mencionada en la sección 2.5 de análisis estadísticos.

2.3. CUANTIFICACIÓN DE FIBRA

La cuantificación de celulosa se realizó de acuerdo con la norma TAPPI para la medición de componentes químicos de materiales fibrosos celulósicos, donde se lleva a cabo una hidrólisis acida (H_2SO_4 al 2%), posterior una extracción alcalina (NaOH al 20%) y un blanqueo (Na^+ al 0.5 %), Las hojas de henequén, se secaron en un horno de convección (Thermo Scientific OGH180) a 100 °C, hasta obtener un peso constante, posteriormente se molieron en un molino de cuchillas (Brabender GmbH & Co. KG, Alemania) y luego se tamizaron en seco, en diferentes fracciones (mallas de 100 mm, 80 mm, 60 mm y 40 mm). La fracción de las mallas 40 y 60 mm fue retenida y utilizada para su posterior caracterización. Para determinar el contenido de humedad se aplicó el método ASTM D4442-92. Los análisis con disolventes orgánicos se realizaron utilizando los métodos TAPPI T-204 cm-0, Para la determinación de extractos acuosos se empleó el método T-207 cm-99 de la norma TAPPI. El contenido de lignina se determinó según el método Klason (lignina insoluble T-222 de TAPPI), mientras que la celulosa y la hemicelulosa se cuantificaron de acuerdo con el procedimiento descrito por Kumar *et al.*, 2009.

2.4. PCR EN TIEMPO REAL (EXPRESIÓN RELATIVA)

El aislamiento de ARN y la síntesis de ADNc se realizaron de acuerdo con Tamayo-Ordóñez *et al.*, 2015. El ARN de cada hoja se obtuvo partiendo de 200 mg de tejido fresco, utilizando el método de TRIZOL (Invitrogen, EE. UU.), siguiendo el protocolo del fabricante. La integridad del ARN se verificó por electroforesis en geles de agarosa al 1.2% y se cuantificó por espectrometría a 260 nm en un NANODROP (NANODROP-1000, ThermoScientific, EE. UU.). Se digirió 1 µg de ARN total con 1U de ADNasa libre de ARNasa (PROMEGA) y ADNasa I, en un volumen final de 10 µL. Las muestras tratadas e incubaron a 37°C durante 30 min. La ausencia de contaminación de ADN se verificó por electroforesis en gel de agarosa al 1.2% y PCR negativa.

El ADNc se sintetizó mediante el sistema de transcripción reversa GoScript (PROMEGA, EE. UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se usó un control positivo (ARN de control positivo de kanamicina de 1,2 Kb) proporcionado en el kit para estimar el rendimiento de la síntesis de ADNc. Las concentraciones de ADNc se verificaron por espectrometría a 260nm en un NANODROP. Los ADNc obtenidos se almacenaron a -80°C hasta su uso.

Para la estandarización de la expresión del gen ribosomal 18S, inicialmente se evaluó la especificidad de los cebadores. Se realizó una qPCR usando ADNc de cada muestra. La mezcla de reacción consistió en 50 µM MgCl₂, 10 µm DNTP's, 1 U de taq polimerasa, 10 pmol de cada cebador y 200 ng de ADNc, en un volumen final de 20 µl. Las condiciones de amplificación fueron de 94°C por 10 min, 35 ciclos de 94°C por 1 min, 64°C por 1 min y 72°C por 1 min y una extensión final a 72°C por 7 min. Se realizó una curva de fusión bajo las siguientes condiciones; 95°C 15 s, 60°C 1 min y 95°C 15 s, para descartar la formación de dímeros.

La expresión relativa del gen se determinó mediante el método $\Delta\Delta Cq$ entre los genes diana y de referencia (18S ribosomal) (Nicot *et al.*, 2005; Maroufi *et al.*, 2010), mediante la ecuación descrita por Pfaffl, 2001. La amplificación de los genes de celulosa sintasa se realizó empleando los cebadores reportados por Huang *et al.*, 2019 como se describe: *CesA3* (F: 3'-GTCCCACCACGCTACTCATC, R: 3'-GAGAACCGACCACACAACCA), *CesA4* (F: 3'-TTGTCTCCGGCTTGTCATC, R: 3'-AACTGGGGAGAGCTTGTTTCG) y *CesA5* (F: 3'-ATTTAAAGGTTCTGCGCCGC, R: 3'-TTTCCCGGTAAGCAAGCACA).

2.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando un análisis de varianza (ANOVA) empleando el paquete estadístico SAS ver. 9.0 (2000) y el programa Origin 9.1. Seguido de las pruebas estadísticas F se evaluaron en 0,05, las medias se compararon mediante pruebas de Tukey ($p \leq 0.05$), la prueba t de Student ($p \leq 0.05$) y evaluamos el coeficiente de correlación de Pearson.

3. RESULTADOS

3.1. CARACTERES MORFOMÉTRICOS Y CONTENIDO DE CELULOSA

Los resultados sobre los caracteres morfométricos y la composición de fibras (con base al peso seco) en Celulosa, hemicelulosa y lignina se presentan en el cuadro 3.1.

Cuadro 2.1 Plantas seleccionadas en la colecta del material vegetal.

Clave	Talla (cm)	Longitud de hoja (cm)	Peso seco (g)	Contenido de agua	Composición (% en g de peso seco)		
					Celulosa	Hemicelulosa	Lignina
B	83±8 ^a	74 ^a	33±6 ^a	83 ^a	8 ^a	0.5 ^a	2 ^a
M	117±6 ^b	109 ^b	108±8 ^b	77 ^b	25 ^b	3 ^b	4 ^b
A	147±13 ^c	139 ^c	196±10 ^c	75 ^b	48 ^c	3 ^b	8 ^c

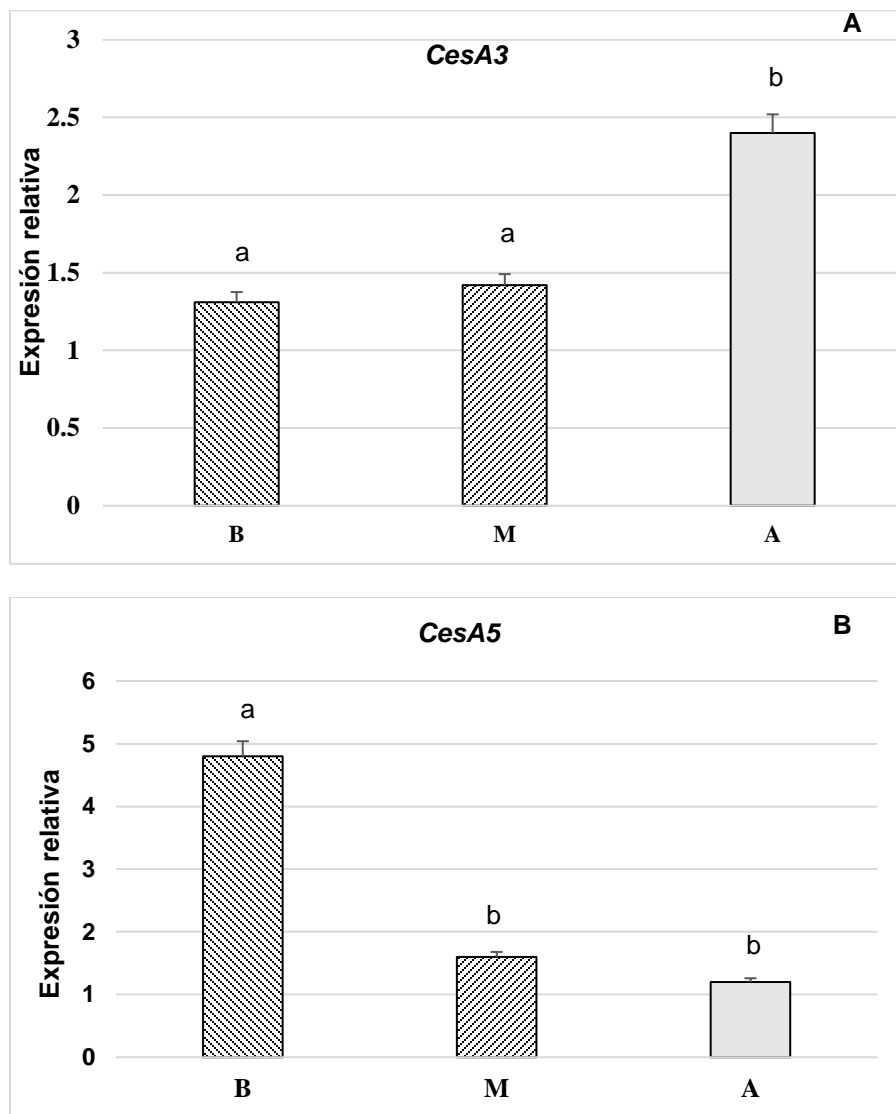
^{a, b, c} corresponde a los valores significativamente diferentes con respecto a la desviación estándar (prueba t de Student; $p \leq 0.05$).

La longitud promedio de las hojas de las plantas de diferentes alturas presentó diferencias significativas, observando una diferencia de hasta 1.8 veces superior en A comparado con B (Cuadro 3.1). Con relación al peso seco éste fue 6 veces superior en A y 3 veces superior en M, comparadas con B. El contenido de agua fue significativamente superior en B, mientras que no se observaron diferencias significativas entre M y A. En cuanto el contenido de celulosa éste fue 6 veces superior en A, comparado con B y 3.5 veces superior en M, comparado con B. El contenido de hemicelulosa en A y M fue 3 veces superior en comparación con B, mientras que el contenido de lignina fue 4 veces superior en A, comparado con B y 2 veces superior en A

comparado con M, misma tendencia observada en el contenido de lignina en M que fue 2 veces superior en comparación con B (Cuadro 3.1).

3.2. CUANTIFICACIÓN RELATIVA DE GENES *CesA*

Para el análisis de expresión relativa se evaluaron dos genes involucrados en pared celular primaria (*CesA3* y *CesA5*) y un gen de pared secundaria (*CesA4*), reportados por Huang *et al.*, 2019, y se utilizó el gen ribosomal 18S como gen de referencia (Figura 3.1 A-C).



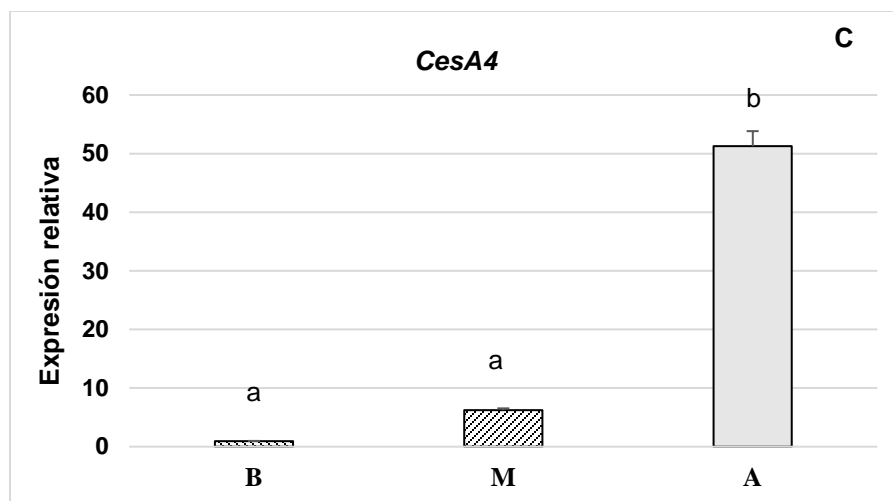


Figura 3.1 Estudio de la expresión relativa de genes de pared primaria en los incisos A y B (*CesA3* y *CesA5*) y pared secundaria en el inciso C (*CesA4*), en plantas de diferente longitud de hoja de henequén, las letras en mayúsculas representan: B: baja, M: media, A: alta, las letras a, b y c, representan valores significativamente diferentes (prueba t de Student; $p \leq 0.05$).

CesA4 involucrado en la síntesis de pared celular secundaria, presentó una alta expresión relativa en A, observando una expresión 50 veces superior en comparación con B y 8 veces superior en comparación con M, por su parte M presentó una expresión 5 veces superior comparada con B (Figura 3.1. C).

4. DISCUSIÓN

4.1. RELACIÓN ENTRE EL CONTENIDO DE CELULOSA Y LA LONGITUD DE LAS HOJAS EN HENEQUÉN

Agave es una especie de gran importancia económica, para la obtención de fibra se aprovechan diferentes especies como *A. angustifolia*, *A. fourcroydes*, *A. lechuguilla* y *A. sisalana* (Shahzhad *et al.*, 2022; García *et al.*, 2022; Hulle *et al.*, 2015; Robert *et al.*, 1987). Se han reportado porcentajes de celulosa en *Agave* entre 45 y 80% (Syafri *et al.*, 2022; Espino *et al.*, 2014). El contenido de celulosa de henequén obtenido en este trabajo presentó un valor similar con lo reportado por Espino *et al.*, 2014, por medio de los análisis de correlación se observó una relación directa, entre la altura de la planta, la longitud de las hojas con el contenido de celulosa, variando desde 8 hasta 48 %.

La hemicelulosa representa entre el 25 y el 35 % de la biomasa lignocelulósica en plantas (Kumar *et al.*, 2008), en diferentes especies de *Agave* los valores de hemicelulosa reportados

varían desde el 3 hasta el 28 %, (Vieira *et al.*, 2002; Cordeiro *et al.*, 2012), sin embargo, los resultados en este trabajo variaron de 0.5 a 3%, se ha reportado que la hemicelulosa está involucrada en el crecimiento de las plantas (Pauly *et al.*, 2013), por ende atribuimos que en la plantas de menor longitud (B), se observa un menor crecimiento, el cual repercute en el contenido de hemicelulosa, valores similares se han observado en *A. lechuguilla* y *A. fourcroydes* (Márquez *et al.*, 1996; Viera *et al.*, 2002), asimismo consideramos que la composición varía de acuerdo a la especie, donde los reportes de menor contenido de hemicelulosa ha sido en *A. fourcroydes*.

En especies de *Agave* se han reportado valores de 4 a 15 % de lignina (Vieira *et al.*, 2002; Myslami & Ragedra *et al.*, 2011; Liñán-Montes *et al.*, 2014), en comparación con los valores observados de henequén en este trabajo, variaron de 2 hasta 8 %, en otras especies se han obtenido valores de lignina entre 25 al 30 %, debido al tipo de extracción empleado por medio de métodos enzimáticos (Chavez-Sifontes *et al.*, 2013) , por lo que atribuimos que los valores bajos obtenidos en el estudio, son debido al método de extracción que empleamos.

Muñoz *et al.*, (2016), determinaron el contenido de celulosa, la longitud de las hojas y la altura de la planta en *A. lechuguilla*, *A. angustifolia*, *A. tequilana* y *A. salmiana*, sin observar una relación aparente entre el contenido de celulosa y la altura de la planta o la longitud de la hoja, en contraste con los resultados reportados y por medio de los análisis de correlación en el presente trabajo observamos que a mayor longitud de la hoja, mayor fue el contenido de celulosa, similar a lo reportado para *Arabidopsis* (Li *et al.*, 2011). Hasta nuestro conocimiento, este es el primer trabajo donde se presenta una relación directa entre la altura de la planta-longitud de la hoja con el contenido de celulosa en *A. fourcroydes*.

El contenido de agua fue similar a lo reportado en estudios previos y varió de un 75 a un 83%, un valor similar a lo reportado previamente (Muñoz *et al.*, 2016) en especies de *Agave* (80%). Cabe mencionar que la composición química de fibras de *Agave* depende de su origen biológico y edad, así como del método de extracción (Cordeiro *et al.*, 2012).

4.2. EXPRESIÓN DE GENES *CesA* INVOLUCRADOS EN LA BIOSÍNTESIS DE PARED PRIMARIA Y SECUNDARIA EN HENEQUÉN.

En diferentes especies como *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa* (Taylor *et al.*, 2004; Heidari *et al.*, 2019), *Zea Mays* (Appenzeller *et al.*, 2004), *Sorghun bicolor*, *Populus trichocarpa* (Djerbi *et al.*, 2005), *Boehmeria nivea* (Liu *et al.*, 2013), *Gossypium hirsutum* (Li *et al.*, 2013), *Linum*

ussitasium (Galinousky *et al.*, 2014), *Eucaliptus grandis* (Ranik & Maybourg, 2006), *Agave* Híbrido 11648 (Huang *et al.*, 2019), se han descrito genes involucrados en la biosíntesis de pared celular primaria y secundaria.

En *Saccharum* spp. se describió que *CesA4* es un gen clave en la biosíntesis de pared celular, presentó una mayor expresión en los entrenudos con mayor fibra (Kasirajan *et al.*, 2018), de manera similar a lo observado en este trabajo donde en el análisis de expresión *CesA4* presentó una expresión relativa 50 veces superior en plantas con mayor altura, en comparación con los otros genes evaluados. En *Arabidopsis* se ha descrito que *CesA4* es un gen esencial para la síntesis de celulosa en la pared celular secundaria (Taylor *et al.*, 2003), por consiguiente se han reportado estudios en tabaco, donde se demostró que todos los genes *CesA* responsables de la formación de la pared secundaria pueden interactuar entre sí, pero solo el gen *CesA4* se encuentra relacionado en la formación de homodímeros (Timmers *et al.*, 2009). Por ende sugieren que *CesA4* está involucrado uniendo los diferentes complejos en la estructura de la roseta para la síntesis de celulosa (Atanassov *et al.*, 2009).

Los análisis de transcripción han revelado que los genes con una función similar tienden a estar coordinados transcripcionalmente (Stuart *et al.*, 2003). Genes *CesA* de biosíntesis de pared primaria y secundaria muestran patrones de expresión similares (Brown *et al.*, 2005; Persson *et al.*, 2005), esto coincide con los resultados que obtuvimos con *CesA3* y *CesA4*, en donde se observó la misma tendencia de mayor expresión relativa en plantas con mayor altura.

El análisis de expresión de transcritos en *Panicum virgatum* L. reveló que *CesA4* se expresa en todos los tejidos analizados, pero la expresión fue mayor en los tallos. Los tejidos de tallo y hoja están compuestos predominantemente por paredes celulares secundarias que contienen altas cantidades de celulosa y lignina, que son valiosas para aplicaciones de biomasa (Li *et al.*, 2017).

Por otra parte, el análisis de expresión del gen *CesA5*, el cual está involucrado en la síntesis de la pared celular primaria, presento una correlación inversa, debido que se observó una mayor expresión en las plantas de menor longitud (B), este gen (*CesA5*) se ha caracterizado en *Arabidopsis* como un gen redundante, presentando mayor expresión en plántulas jóvenes, por lo que se asocia con la producción de biomasa durante el crecimiento (Hu *et al.*, 2018).

En el estudio reportado por (Huang *et al.*, 2019), *CesA3* y *CesA5* presentaron una mayor expresión en *A. tequilana* y *CesA4* presentó mayor expresión en el híbrido 11648, siendo una planta que se utiliza para la producción de fibra.

Li *et al.*, (2013) analizaron las diferentes etapas de desarrollo del fruto en *Gossypium hirsutum*, evaluando el contenido de celulosa y la expresión de genes de pared primaria. Ellos determinaron una relación en donde a mayor expresión del gen *CesA3*, mayor contenido de celulosa, exclusivamente en la etapa de la maduración, sin embargo, en hipocótilos, tallo y raíz no se presentó esta tendencia. De igual manera evalúan la expresión del gen *CesA5* y no se observa esta relación entre el contenido de celulosa con la expresión, obteniendo resultados similares en este trabajo donde la expresión de *CesA3* y *CesA4* presentan una tendencia a mayor contenido de fibra, mayor fue la expresión de estos genes, sin embargo, para *CesA5*, el comportamiento fue inverso. A futuro estos genes podrían utilizarse de base para selección de individuos con mayor contenido de celulosa o menor contenido de celulosa, dependiendo el gen a considerar.

Nuestros datos en conjunto sugieren que las plantas con mayor altura presentan hojas más largas, con mayor contenido de celulosa y bajo contenido de hemicelulosa y lignina y estas características se relacionan con elevados niveles de expresión relativa de los genes *CesA3* y *CesA4* y bajo nivel de expresión relativa del gen *CesA5*, bajo las condiciones analizadas. El análisis de la tendencia de la expresión podría ser empleado en la selección temprana de individuos sobre productores de fibra, inclusive individuos que presenten un perfil de crecimiento mayor, todo ello de la mano del cultivo de tejidos como herramienta para propagar masivamente líneas clonales generadas a partir de individuos sobresalientes seleccionados empleando estos resultados.

CAPÍTULO IV

DISCUSIÓN, CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS

4.1. DISCUSIÓN

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, en la industria farmacéutica, entre otros (Good-Avila, 2006; Hulle *et al* 2015). Debido a que se propagan vegetativamente, con excepción del híbrido H11648 (*A. angustifolia* x *A. amaniensis* x *A. amaniensis*) (Lock, 1962) desarrollado a mediados del siglo pasado, los *Agaves* no 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 (Hulle *et al.*, 2015; Msahli *et al.*, 2006; Mayorga-Hernández *et al.*, 2004; Castorena-Sánchez *et al*, 1991; 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, se desconoce qué tipo de relación presenta el contenido de fibra con la expresión de genes codificantes de celulosa sintasa, como se ha demostrado en otras especies de plantas como *Gossypium hirsutum*, *Linum usitatissimum*, *Populus trichocarpa* y *Boehmeria nivea*. Con la finalidad de obtener información de cómo se relaciona la expresión de genes con la producción de fibra en *Agave*, en este trabajo abordamos el estudio de la expresión de genes (*CesA*) en *A. fourcroydes*, caracterizamos tres especies para poder comparar las fibras con el henequén y posteriormente evaluamos individuos de diferentes tamaños (bajo ,medio y alto) para poder determinar si existe una relación entre características morfométricas de la plantas, los genes evaluados y el contenido de celulosa, de esta manera

se propone un marcador que nos permite seleccionar individuos sobresalientes de fibras de henequén.

Tal como se presentó en el capítulo II y III de esta tesis, se caracterizó la cantidad de fibra a nivel intraespecífico (*A. sisalana*, *A. tequilana* y *A. fourcroydes*) , donde se determinaron valores superiores en contenido de celulosa en *A. sisalana* y *A. fourcroydes*, también se determinó el contenido de celulosa en plantas de diferente tamaño en *A. fourcroydes* de 147, 117 y 83 cm presentaron 48, 25 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 de genes *CesA3* y *CesA4*, involucrados en la biosíntesis de pared celular primaria y pared celular secundaria respectivamente, además se evaluó el nivel de expresión de una región parcial de la subunidad A del gen de *CesA*.

La morfología y el contenido total de células presentes en hojas de *A. sisalana* y *A. fourcroydes*, fueron similares comparadas con *A. tequilana*, encontrando mayor número y tamaño de células en *A. sisalana* y *A. fourcroydes* (figura 2.3), esto podría que también en plantas con hojas de mayor tamaño en *A. fourcroydes*, se presente células más grandes y por ende mayor contenido de celulosa. Como consecuencia de la alta demanda de celulosa, estaría implicado que en estas plantas exista una mayor expresión de genes involucrados en la formación de la pared primaria y secundaria (figura 3). Todos los cambios moleculares y fenotípicos en estas plantas podrán relacionarse a una mayor calidad de fibra, ya que las hojas de mayor tamaño contienen mayor porcentaje de celulosa, Haigler *et al.*, (2005) menciona que la calidad está dada por la longitud y el contenido de celulosa en plantas.

Por otra parte, la selección artificial que el hombre ha ejercido sobre estas especies (*A. sisalana* y *A. fourcroydes*) podemos inferir que ha contribuido a la especialización de genes relacionados con las fibras, como observamos en el análisis de red haplotipos (figura 2.6).

En la siguiente figura presentamos un modelo en el cual se presenta las tendencias observadas en este trabajo.

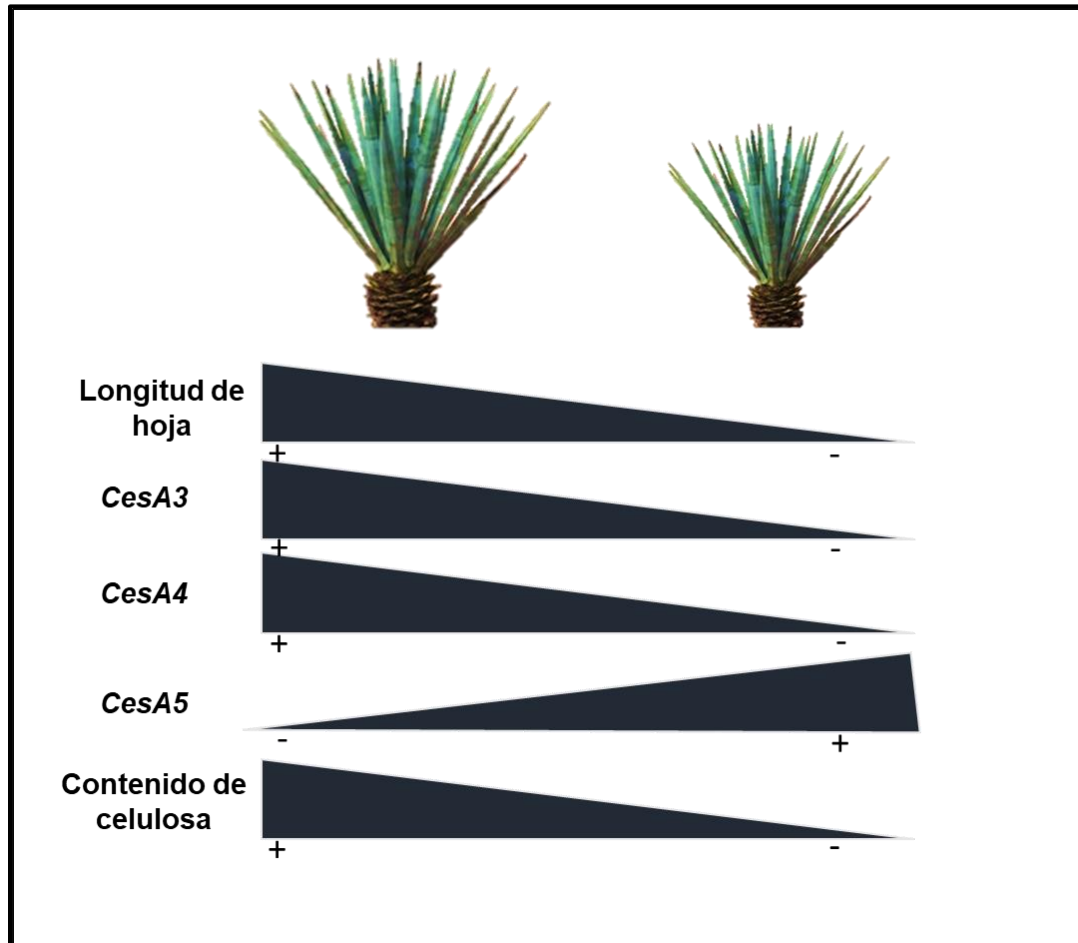


Figura 4.1. Modelo de plantas de mayor tamaño vs plantas de menor tamaño, comparando los niveles de expresión de los genes *CesA* y el contenido de celulosa.

Las plantas de mayor altura presentaron mayor longitud de hojas y mayor contenido de celulosa, al evaluar los niveles de expresión de genes involucrados en la biosíntesis de pared celular primaria y pared celular secundaria, ambos perfiles de expresión presentaron una tendencia que podría ser considerada para seleccionar individuos con mayor contenido de fibra o viceversa.

4.1. CONCLUSIONES GENERALES

En esta investigación, según metodologías evaluadas en las fibras, las especies de *A. sisalana* y *A. fourcroydes* son promisorias para la extracción de fibrillas de celulosa, actualmente la especie utilizada para esta industria es *A. sisalana*, sin embargo, debido a estudios genéticos sobre *CesA* en *A. fourcroydes* promete tener características importantes para la producción de fibra. Las plantas de henequén con mayor altura presentan hojas más largas, con mayor contenido de celulosa y bajo contenido de hemicelulosa y lignina. *CesA4*, involucrado en la

biosíntesis de pared celular secundaria, presento una correlación directa entre el nivel de expresión más alto con plantas de mayor altura y mayor contenido de celulosa, un patrón similar, pero con menor expresión fue *CesA3*, involucrado en la biosíntesis de pared celular primaria, por el contrario, la expresión en el gen *CesA5* fue inversa, ya que se presentó una mayor expresión en las plantas de menor longitud, derivado de ello se propone que la expresión de estos tres genes en conjunto pueden servir como posibles marcadores de selección en henequén. Aunque faltarían más estudios involucrados con la expresión de estos genes en las diferentes etapas del desarrollo de la fibra de henequén, su relación con la edad biológica y la aplicación para selección temprana a nivel de invernadero o vivero, aún faltan más estudios, como evaluar la funcionalidad de cada proteína CESA, lo que podría contribuir significativamente a las variaciones en la producción de celulosa.

4.2. PERSPECTIVAS

A pesar de que en este trabajo asociamos la tendencia de la expresión de los genes *CesA*, con el contenido de celulosa y algunas características morfológicas de las plantas, consideramos que sería de importancia la búsqueda de más genes involucrados en la síntesis de la pared celular primaria y la pared celular secundaria, así como el estudio de genes CSL (como celulosa sintasa) que han sido ampliamente reportados en la formación de la fibra. El desarrollo de marcadores moleculares relacionados con estos genes permitiría un programa de mejora, para seleccionar individuos sobresalientes de fibra, inclusive seleccionar desde una edad temprana, por medio del cultivo *in vitro*.

En la última década, nuestra comprensión de las funciones de las proteínas CESA ha mejorado notablemente. Sin embargo, quedan muchas preguntas importantes relacionadas con las funciones relacionadas: ¿Cuál es la arquitectura de la red transcripcional que controla la expresión de estos genes? ¿Qué proteínas están presentes en los complejos de enzimas sintetizadoras de carbohidratos que probablemente contienen estas proteínas y cómo se regulan estos complejos? ¿Qué factores influyen en los procesos de síntesis de polisacáridos (iniciación, elongación y terminación)? ¿Cuáles son los roles y factores fisiológicos que influyen en las estructuras de los polisacáridos sintetizados por las proteínas CESA? Un grupo de investigación muestra que las familias CSLA y CSLC (genes como celulosa sintasa) se pueden estudiar con éxito usando expresión heteróloga y genética directa e inversa.

La evaluación de la función, es decir, la confirmación de la reacción específica catalizada por cada uno de los genes plantea un desafío aún mayor. El análisis de mutantes por sí solo, tal como se lleva a cabo actualmente, puede decir si el gen es crítico para un proceso específico como la síntesis de celulosa, pero no puede definir exactamente qué reacción está siendo catalizada por el producto génico en estudio. Sin embargo, la determinación de la función además de las consecuencias de la sobreexpresión de los genes individuales es fundamental para el desarrollo de estrategias para diseñar patrones alterados de deposición de celulosa en plantas de cultivo importantes.

BIBLIOGRAFÍA

- Abraham, P.E.; Yin, H.; Borland, A.M.; Weighill, D.; Lim, S.D.; De Paoli, H.C.; Engle, N.; Jones, P.C.; Agh, R.; Weston, D.J. 2016. Transcript, protein and metabolite temporal dynamics in the CAM plant Agave. *Nature Plants*, 2, 16178. DOI: <https://doi.org/10.1038/nplants.2016.178>
- Abramson, M., Shoseyov, O., & Shani, Z. (2010). Plant cell wall reconstruction toward improved lignocellulosic production and processability. *Plant Science*, 178(2), 61-72.
- Abdurakhmonov IY, Buriev ZT, Saha S, Jenkins JN, Abdulkarimov A, Pepper AE. Phytochrome RNAi enhances major fibre quality and agronomic traits of the cotton *Gossypium hirsutum* L. *Nat Commun*. 2014;5:1–10.
- 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), 287-299. DOI: <https://doi.org/10.1023/B:CELL.0000046417.84715.27>
- 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. DOI: [10.1126/science.279.5351.717](https://doi.org/10.1126/science.279.5351.717)
- Atanassov, I.I., Pittman, J.K. and Turner, S.R. 2009. Elucidating the mechanisms of assembly and subunit-interaction of the cellulose synthase complex of *Arabidopsis* secondary cell walls. *Journal Biological Chemistry* 284, 3833–3841. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.M807456200>
- Avci, U., Pattathil, S., Singh, B., Brown, V. L., Hahn, M. G., & Haigler, C. H. (2013). Cotton fiber cell walls of *Gossypium hirsutum* and *Gossypium barbadense* have differences related to loosely-bound xyloglucan. *PLoS One*, 8(2), e56315.

-
- Baduel, P., Bray, S., Vallejo-Marin, M., Kolář, F., & Yant, L. (2018). The " Polyploid Hop": shifting challenges and opportunities over the evolutionary lifespan of genome duplications. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 6.
- Bacic, A., Harris, P. and Stone, B. 1988. Structure and function of plant cell walls. In *The Biochemistry of Plants*, J. Priess, ed (New York/London/San Francisco: Academic Press), pp. 297– 371.
- Bandel HJ, Forster P, Röhl A (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16, 37– 48.
- Ben Mlik, Y., Jaoudi, M., Khoffi, F., Slah, M., & Durand, B. (2020). Study the Effect of Chemical and Enzymatic Extraction Methods on the Kenaf Fibers Properties. *Journal of Natural Fibers*, 1-10.
- Beeckman, T.; Przemeck, G.K.; Stamatiou, G.; Lau, R.; Terryn, N.; De Rycke, R.; Inze, D.; Berleth, T. Genetic complexity of cellulose synthase a gene function in Arabidopsis embryogenesis. *Plant Physiol.* 2002, 130, 1883–1893
- Biasini, M., Bienert, S., Waterhouse, A., Arnold, K., Studer, G., Schmidt, T., & Schwede, T. (2014). SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic acids research*, 42(W1), W252-W258
- Bischoff V, Cookson SJ, Wu S, Scheible WR (2009) Thaxtomin A affects CESA-complex density, expression of cell wall genes, cell wall composition, and causes ectopic lignification in Arabidopsis thaliana seedlings. *J Exp Bot* 60: 955–965
- Bledzki, A.K. y Gastan, J. 1999. Composites reinforced with cellulose-based fibres. *Progress in Polymer Science* 24, 221-274. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0079-6700\(98\)00018-5](https://doi.org/10.1016/S0079-6700(98)00018-5)
- Brian M., William R., Curtis W., and John M., 2016, Dynamics of biomass partitioning, stem gene expression, cell wall biosynthesis, and sucrose accumulation during development of Sorghum bicolor, *The Plant Journal*, 88(4): 662-680
- Brown, D. M., Zeef, L. A. H., Ellis, J., Goodacre, R., & Turner, S. R. 2005. Identification of novel genes in *Arabidopsis* involved in secondary cell wall formation using expression
-

profiling and reverse genetics. *Plant Cell* 17, 2281–2295. DOI:
<https://doi.org/10.1105/tpc.105.031542>

Burton, R. A., Shirley, N. J., King, B. J., Harvey, A. J., & Fincher, G. B. 2004. The CesA gene family of barley. Quantitative analysis of transcripts reveals two groups of co-expressed genes. *Plant physiology*, 134(1), 224-236. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.103.032904>

Casas, A., Blancas, J., Otero-Arnaiz, A., Cruse-Sanders, J., Lira, R., Avendaño, A., ... & Rangel-Landa, S. (2016). Evolutionary ethnobotanical studies of incipient domestication of plants in Mesoamerica. In *Ethnobotany of Mexico* (pp. 257-285). Springer, New York, NY.

Cano-Delgado, A.; Penfield, S.; Smith, C.; Catley, M.; Bevan, M. Reduced cellulose synthesis invokes lignification and defense responses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 2003, 34, 351–362

Carpita NC (1996) Structure and biogenesis of the cell walls of grasses. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47: 445–476

Carpita, N.C., and Gibeaut, D.M. 1993. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *The Plant Journal* 3: 1– 30. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113X.1993.tb00007.x>

Crang, R., Lyons-Sobaski, S., & Wise, R. (2018). Parenchyma, collenchyma, and sclerenchyma. In *Plant anatomy* (pp. 181-213). Springer, Cham.

Cao, S., Cheng, H., Zhang, J., Aslam, M., Yan, M., Hu, A., ... & Qin, Y. (2019). Genome-wide identification, expression pattern analysis and evolution of the Ces/Csl gene superfamily in pineapple (*Ananas comosus*). *Plants*, 8(8), 275.

Cedeño Cruz, M., & Alvarez-Jacobs, J. (1999). Production of tequila from agave: historical influences and contemporary processes. *The alcohol textbook: A reference for the beverage, fuel and industrial alcohol industries*, 223-245

- Cheng, F., Wu, J., Cai, X., Liang, J., Freeling, M., & Wang, X. (2018). Gene retention, fractionation and subgenome differences in polyploid plants. *Nature plants*, 4(5), 258-268.
- Chávez-Sifontes, M., & Domine, M. E. 2013. Lignina, estructura y aplicaciones: métodos de despolimerización para la obtención de derivados aromáticos de interés industrial. *Avances en ciencias e Ingeniería*, 4(4), 15-46.
- Colunga-GarcíaMarín, P. 2003. The domestication of henequen (*Agave fourcroydes* Lem.). The lowland Maya area: three millennia at the human-wildland interface, 439-446.
- Colunga-GarcíaMarín, P., & May-Pat, F. 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*, 84(11), 1449-1465.
- Cordeiro LG, El-Aouar AA, de Araujo BCV. 2012. Energetic characterization of malt bagasse by calorimetry and thermal analysis. *Journal of thermal análisis calorimetry*. DOI:10.1007/s109730122630x
- Cosgrove D.J. 2005. Growth of plant cell wall. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 6: 850–861. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrm1746>
- Desprez, T., Juraniec, M., Crowell, E. F., Jouy, H., Pochylova, Z., Parcy, F., & Vernhettes, S. 2007. Organization of cellulose synthase complexes involved in primary cell wall synthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(39), 15572-15577. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0706569104>
- Derbyshire, M. K., Gonzales, N. R., Lu, S., He, J., Marchler, G. H., Wang, Z., & Marchler-Bauer, A. (2015). Improving the consistency of domain annotation within the Conserved Domain Database. *Database*, 2015.
- Djerbi, S., Lindskog, M., Arvestad, L., Sterky, F., & Teeri, T. T. 2005. The genome sequence of black cottonwood (*Populus trichocarpa*) reveals 18 conserved cellulose synthase (CesA) genes. *Planta*, 221(5), 739-746. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00425-005-1498-4>
-

- De Rodriguez, N. L. G., Thielemans, W., & Dufresne, A. (2006). Sisal cellulose whiskers reinforced polyvinyl acetate nanocomposites. *Cellulose*, 13(3), 261-270.
- De la Torre-Espinosa, Z.Y., Barredo-Pool, F., Castaño de la Serna, E. et al. Active telomerase during leaf growth and increase of age in plants from *Agave tequilana* var. Azul. *Physiol Mol Biol Plants* 26, 639–647 (2020).
- Djerbi, S., Aspeborg, H., Nilsson, P., Sundberg, B., Mellerowicz, E., Blomqvist, K., & Teeri, T. T. (2004). Identification and expression analysis of genes encoding putative cellulose synthases (CesA) in the hybrid aspen, *Populus tremula* (L.)× *P. tremuloides* (Michx.). *Cellulose*, 11(3-4), 301-312.
- Escamilla-Treviño, L. L. (2012). Potential of plants from the genus *Agave* as bioenergy crops. *Bioenergy Research*, 5(1), 1-9.
- Espino, E., Cakir, M., Domemek, S., Román-Gutiérrez, A. D., Belgacem, N., & Bras, J. 2014. Isolation and characterization of cellulose nanocrystals from industrial by-products of *Agave tequilana* and barley. *Industrial Crops and Products*, 62, 552-559. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.09.017>
- Francucci, G., Vázquez, A., & Rodríguez, E. S. (2012). Key differences on the compaction response of natural and glass fiber preforms in liquid composite molding. *Textile Research Journal*, 82(17), 1774-1785.
- Fagard, M.; Desnos, T.; Desprez, T.; Goubet, F.; Refregier, G.; Mouille, G.; McCann, M.; Rayon, C.; Vernhettes, S.; Höfte, H. PROCUSTE1 Encodes a Cellulose Synthase Required for Normal Cell Elongation Specifically in Roots and Dark-Grown Hypocotyls of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2000, 12, 2409–2423
- Fernandes AN, Thomas LH, Altaner CM, Callow P, Forsyth VT, Apperley DC, Kennedy CJ, Jarvis MC. 2011 Nanostructure of cellulose microfibrils in spruce wood. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 108, E1195–E1203
- Festucci-Buselli, R. A., Otoni, W. C., & Joshi, C. P. (2007). Structure, organization, and functions of cellulose synthase complexes in higher plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 19(1), 1-13.
-

- Galinousky, D. V., Anisimova, N. V., Raiski, A. P., Leontiev, V. N., Titok, V. V., & Khotyleva, L. V. 2014. Cellulose synthase genes that control the fiber formation of flax (*Linum usitatissimum* L.). *Russian journal of genetics*, 50(1), 20-27. DOI: <https://doi.org/10.1134/S1022795414010050>
- García, F. P., Méndez, J. P., Muñoz, E. J., Sandoval, O. A. A., & Laguna, R. R. 2022. Taxonomic, physical and morphological characterization of four species of agave with potential for the production of cellulose fibers from the leaves. *South Florida Journal of Development*, 3(1), 1277-1301. DOI: <https://doi.org/10.46932/sfjdv3n1-099>
- Gross, S.M.; Martin, J.A.; Simpson, J.; Abraham-Juarez, M.J.; Wang, Z.; Visel, A. 2013. *De novo* transcriptome assembly of drought tolerant CAM plants, *Agave deserti* and *Agave tequilana*. *BMC Genomics*. 14. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-563>
- Gou JY, Wang LJ, Chen SP, Hu WL, Chen XY. Gene expression and metabolite profiles of cotton fiber during cell elongation and secondary cell wall synthesis. *Cell Res*. 2007;17: 422–434.
- Hazen, S. P., Scott-Craig, J. S., & Walton, J. D. 2002. Cellulose synthase-like genes of rice. *Plant physiology*, 128(2), 336-340. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.010875>
- Hall, T. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In *Nucleic Acids Symp. Ser.* (Vol. 41, pp. 95-98).
- Heidari, P., Ahmadzadeh, M., Izanlo, F., & Nussbaumer, T. 2019. In silico study of the CESA and CSL gene family in *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa*: Focus on post-translation modifications. *Plant Gene*, 19, 100189. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.plgene.2019.100189>
- Hernández, E. M., Kipping, D. R., Laurel, H. O., Carrillo, A. R. Q., & Orozco, A. A. (2004). Análisis comparativo en la calidad de fibra de *Agave lecheguilla* torr., procesada manual y mecánicamente. *Agrociencia*, 38(2), 219-225.

-
- Howells, G.; Huttly, R.M.; Vickers, A.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. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0337628100>
- Hu H.Z., Zhang R., Feng S.Q., Wang Y.M., Wang Y.T., Fan C.F. 2018. Three AtCesA6-like members enhance biomass production by distinctively promoting cell growth in *Arabidopsis*. *Plant Biotechnology Journal*. 16: 976–988. DOI: <https://doi.org/10.1111/pbi.12842>
- Huang, X., Xiao, M., Xi, J., He, C., Zheng, J., Chen, H., & Yi, K. 2019. De novo transcriptome assembly of *Agave* H11648 by Illumina sequencing and identification of cellulose synthase genes in *Agave* species. *Genes*, 10(2), 103. DOI: <https://doi.org/10.3390/genes10020103>
- Huang, X., Wang, B., Xi, J., Zhang, Y., He, C., Zheng, J., ... & Yi, K. (2018). Transcriptome comparison reveals distinct selection patterns in domesticated and wild *Agave* species, the important CAM plants. *International journal of genomics*, 2018.
- Hulle, A., Kadole, P., & Katkar, P. (2015). *Agave Americana* leaf fibers. *Fibers*, 3(1), 64-75. DOI: <https://doi.org/10.3390/fib3010064>
- Joshi, C. P., Thammannagowda, S., Fujino, T., Gou, J. Q., Avci, U., Haigler, C. H. & Peter, G. F. 2011. Perturbation of wood cellulose synthesis causes pleiotropic effects in transgenic aspen. *Molecular plant*, 4(2), 331-345. DOI: <https://doi.org/10.1093/mp/ssq081>
- Kasirajan, L., Hoang, N. V., Furtado, A., Botha, F. C., & Henry, R. J. 2018. Transcriptome analysis highlights key differentially expressed genes involved in cellulose and lignin biosynthesis of sugarcane genotypes varying in fiber content. *Scientific reports*, 8(1), 1-16. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30033-4>
- Keegstra K. 2010. Plant cell walls. *Plant Physiology*. 154: 483–486. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.110.161240>
- Kumar R, Mago G, Balan V, Wyman CE. 2009. Physical and chemical characterizations of corn stover and poplar solids resulting from leading pretreatment technologies.
-

BioresourceTechnology 00:3948–3962. DOI:

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.01.075>

- Kumar, A., Wang, L., Dzenis, Y. A., Jones, D. D., & Hanna, M. A. 2008. Thermogravimetric characterization of corn stover as gasification and pyrolysis feedstock. *Biomass and bioenergy*, 32(5), 460-467. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2007.11.004>
- Li, Y., He, Y., Lin, Y., Wan, T., Li, M., & Chen, Z. (2021). Bioinformatics Analysis of Cellulose Synthase Cesa Gene from *Miscanthus lutarioriparius*. *Molecular Plant Breeding*, 12.
- Li, F., Xie, G., Huang, J., Zhang, R., Li, Y., Zhang, M. 2017. OsCESA9 conserved-site mutation leads to largely enhanced plant lodging resistance and biomass enzymatic saccharification by reducing cellulose DP and crystallinity in rice. *Plant Biotechnol. J.* 15, 1093–1104. doi: 10.1111/pbi.12700
- 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. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00425-013-1868-2>
- Li, M., Bahn, S. C., Guo, L., Musgrave, W., Berg, H., Welti, R., & Wang, X. 2011. Patatin-related phospholipase pPLAIII β -induced changes in lipid metabolism alter cellulose content and cell elongation in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 23(3), 1107-1123. DOI: <https://doi.org/10.1105/tpc.110.081240>
- Liñán-Montes, A., de la Parra-Arciniega, S.M., Garza-González, M.T. 2014. Characterization and thermal analysis of agave bagasse and malt spent grain. *J Therm Anal Calorim* 115, 751–758. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10973-013-3321-y>
- Liu Z.Y., Schneider R., Kesten C., Zhang Y., Somssich M., Fernie A.R. 2016. Cellulose–microtubule uncoupling proteins prevent lateral displacement of microtubules during cellulose synthesis in *Arabidopsis*. *Developmental Cell* 38: 305–315. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2016.06.032>
-

-
- Liu, X., Zhao, B., Zheng, H. J., Hu, Y., Lu, G., Yang, C. Q., ... & Zhou, Y. (2015). *Gossypium barbadense* genome sequence provides insight into the evolution of extra-long staple fiber and specialized metabolites. *Scientific reports*, 5, 14139.
- Liu, T., Zhu, S., Tang, Q., Chen, P., Yu, Y., & Tang, S. 2013. De novo assembly and characterization of transcriptome using Illumina paired-end sequencing and identification of *CesA* gene in ramie (*Boehmeria nivea* L. Gaud). *BMC genomics*, 14(1), 1-11. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-125>
- Lu S, Li L, Yi X, Joshi CP, Chiang VL. Differential expression of three eucalyptus secondary cell wall-related cellulose synthase genes in response to tension stress. *J Exp Bot*. 2008; 59:681–695.
- Madadi, M., Penga, C., & Abbas, A. (2017). Advances in genetic manipulation of lignocellulose to reduce biomass recalcitrance and enhance biofuel production in bioenergy crops. *J Plant Biochem Physiol*, 5(182), 2.
- Manikandan, K.C.; Diwan, S.M. & Sabu, T. 1996. Tensile properties of short sisal fiber reinforced polystyrene composites. *J Appl Poly Sci*: 1483–1497.
DOI: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4628\(19960531\)60:9<1483::AID-APP23>3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4628(19960531)60:9<1483::AID-APP23>3.0.CO;2-1)
- Maroufi, A., Van Bockstaele, E., & De Loose, M. 2010. Validation of reference genes for gene expression analysis in chicory (*Cichorium intybus*) using quantitative real-time PCR. *BMC molecular biology*, 11(1), 1-12. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-11-15>
- McFarlane, H. E., Döring, A., & Persson, S. 2014. The cell biology of cellulose synthesis. *Annual review of plant biology*, 65, 69-94. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050213-040240>
- McDougall, G. J., Morrison, I. M., Stewart, D., Weyers, J. D. B., & Hillman, J. R. (1993). Plant fibres: botany, chemistry and processing for industrial use. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 62(1), 1-20.
-

- 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.
<http://www.autexrj.org/No1-2006/0170.pdf>
- Mayorga-Hernández, E., Rössel-Kipping, D., Ortiz-Laurel, H., Quero-Carrillo, A. R., & Amante-Orozco, A. (2004). Comparative analysis of the quality of agave lecheguilla torr. Fiber, processed manually and mechanically. *Agrociencia*, 38 (2), 219-225.
- Megiatto Jr, J. D., Silva, C. G., Rosa, D. S., & Frollini, E. (2008). Sisal chemically modified with lignins: correlation between fibers and phenolic composites properties. *Polymer Degradation and Stability*, 93(6), 1109-1121.
- Moreno-Salazar SF, Esqueda MA, Martínez J, Palomino G. Nuclear genome size and karyotype of *Agave angustifolia* and *A. rhodacantha* from Sonora, México. *Rev Fitotec Mex.* 2007; 30:13–23.
- Morgan, J. L., Strumillo, J., & Zimmer, J. (2013). Crystallographic snapshot of cellulose synthesis and membrane translocation. *Nature*, 493(7431), 181-186.
- Munasinghe, H. T., Winterstein-Beckmann, A., Schiele, C., Manzani, D., Wondraczek, L., Afshar, S., ... & Ebendorff-Heidepriem, H. (2013). Lead-germanate glasses and fibers: a practical alternative to tellurite for nonlinear fiber applications. *Optical Materials Express*, 3(9), 1488-1503.
- Mueller S.C., Brown R.M. 1980. Evidence for an intramembrane component associated with a cellulose microfibril-synthesizing complex in higher plants. *Journal of Cell Biology*. 84: 315–326. DOI: <https://doi.org/10.1083/jcb.84.2.315>
- Muñoz, E. J., Prieto-García, F., Méndez, J. P., Sandoval, O. A. A., & Laguna, R. R. 2016. Caracterización fisicoquímica de cuatro especies de agaves con potencialidad en la obtención de pulpa de celulosa para elaboración de papel. *Dyna*, 83(197), 232-242.
DOI: <https://doi.org/10.15446/dyna.v83n197.52243>
-

- Mylsamy, K., & Rajendran, I. (2010). Investigation on physio-chemical and mechanical properties of raw and alkali-treated *Agave americana* fiber. *Journal of Reinforced Plastics and composites*, 29(19), 2925-2935.
- Myslami, K., & Rajendran, I. 2011. The mechanical properties, deformation and thermomechanical properties of alkali treated and untreated *Agave* continuous fibre reinforced epoxy composites. *Materials & Design*, 32(5), 3076-3084. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2010.12.051>
- Nava-Cruz, N. Y., Medina-Morales, M. A., Martinez, J. L., Rodriguez, R., & Aguilar, C. N. 2015. *Agave* biotechnology: an overview. *Critical reviews in biotechnology*, 35(4), 546-559. DOI: <https://doi.org/10.3109/07388551.2014.923813>
- Nawaz, M. A., Rehman, H. M., Baloch, F. S., Ijaz, B., Ali, M. A., Khan, I. A., ... & Yang, S. H. (2017). Genome and transcriptome-wide analyses of cellulose synthase gene superfamily in soybean. *Journal of plant physiology*, 215, 163-175.
- Negrete, L. A. P. (2010). Extraction of agave fibers to make paper and crafts.
- Newman RH, Hill SJ, Harris PJ. 2013 Wide-angle X-ray scattering and solid-state nuclear magnetic resonance data combined to test models for cellulose microfibrils in mung bean cell walls. *Plant Physiol.* 163, 1558–1567
- Nicot, N., Hausman, J. F., Hoffmann, L., & Evers, D. 2005. Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. *Journal of experimental botany*, 56(421), 2907-2914. DOI: <https://doi.org/10.1093/jxb/eri285>
- Omadjela, O., Narahari, A., Strumillo, J., Mérida, H., Mazur, O., Bulone, V., & Zimmer, J. (2013). BcsA and BcsB form the catalytically active core of bacterial cellulose synthase sufficient for in vitro cellulose synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(44), 17856-17861.
- Páez Moscoso, J. C. (2007). Obtención de compuestos de polidropileno reforzado con fibras de abacá mediante moldeo por compresión (Bachelor's thesis, QUITO/EPN/2007).

-
- Palomino G, Martínez J, Méndez I, Cepeda-Cornejo V, Barba-González R, Rodríguez-Garay B. Nuclear genome size and cytotype analysis in *Agave parviflora* Torr. subsp. *flexiflora* Gentry (Asparagales, Asparagaceae). *Caryologia*. 2015;68: 159–168.
- Pauly, M., Gille, S., Liu, L. 2013. Hemicellulose biosynthesis. *Planta* 238, 627–642. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00425-013-1921-1>.
- Pfaffl, M. W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. *Nucleic acids research*, 29(9), e45-e45. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>
- Pérez-Núñez MT, Chan JL, Sáenz L, et al. Improved somatic embryogenesis from *Cocos nucifera* (L.) plumule explants. *Vitr Cell Dev Biol Plant*. 2006;42:37–43
- Persson, S.; Paredez, A.; Carroll, A.; Palsdottir, H.; Doblin, M.; Poindexter, P.; Khitrov, N.; Auer, M.; Somerville, C.R. Genetic evidence for three unique components in primary cell-wall cellulose synthase complexes in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2007, 104, 15566–15571
- Persson, S., Wei, H., Milne, J., Page, G. P., & Somerville, C. R. 2005. Identification of genes required for cellulose synthesis by regression analysis of public microarray data sets. *Proceedings of the National Academy of Sciences. U.S.A.* 102, 8633–8638. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0503392102>
- Phitsuwan, P., Sakka, K., & Ratanakhanokchai, K. (2013). Improvement of lignocellulosic biomass in planta: a review of feedstocks, biomass recalcitrance, and strategic manipulation of ideal plants designed for ethanol production and processability. *Biomass and bioenergy*, 58, 390-405.
- Ranik, M., & Myburg, A. A. 2006. Six new cellulose synthase genes from *Eucalyptus* are associated with primary and secondary cell wall biosynthesis. *Tree physiology*, 26(5), 545-556. DOI: <https://doi.org/10.1093/treephys/26.5.545>
- Reiterer A., Burgert I., Sinn G. & Tschegg S. (2002) The radial reinforcement of the wood structure and its implication on mechanical and fracture mechanical properties - A comparison between two tree species. *Journal of Materials Science* **37**, 935– 940.
-

- Ren, J., Yin, Y., Chen, D. 2018. Cloning and analysis of cellulose synthase genes (*CesA*) in *Acacia mangium*. *Tree Genetics & Genomes* 14, 85 <https://doi.org/10.1007/s11295-018-1299-0>
- Richmond, T. A., & Somerville, C. R. 2000. The cellulose synthase superfamily. *Plant physiology*, 124(2), 495-498. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.124.2.495>
- 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. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00040731>
- Robert ML, Lim KY, Hanson L, Sánchez-Teyer F, Bennett MD, Leitch AR, Leitch IJ. Wild and agronomically important *Agave* species (Asparagaceae) show proportional increases in chromosome number, genome size, and genetic markers with increasing ploidy. *Bot J Linn Soc.* 2008;158:215–222.
- Robertson, I. G., & Cortés, M. O. C. (2017). Teotihuacan pottery as evidence for subsistence practices involving maguey sap. *Archaeological and Anthropological Sciences*, 9(1), 11-27.
- Ruan YL, Llewellyn DJ, Furbank RT. Suppression of sucrose synthase gene expression represses cotton fiber cell initiation, elongation, and seed development. *Plant Cell.* 2003;15: 952–964.
- Rubio-Piña, J., Quiroz-Moreno, A., & Sánchez-Teyer, L. F. (2016). A quantitative PCR approach for determining the ribosomal DNA copy number in the genome of *Agave tequila* Weber. *Electronic Journal of Biotechnology*, 22, 9-15.
- Samanta, P., Sadhukhan, S., & Basu, A. (2015). Identification of differentially expressed transcripts associated with bast fibre development in *Corchorus capsularis* by suppression subtractive hybridization. *Planta*, 241(2), 371-385.
- Sarkar, S., & Jha, A. K. (2017). Research for sisal (*Agave* sp.) fibre production in India.
- Saxena, M., Pappu, A., Haque, R., Sharma, A. (2011). Sisal Fiber Based Polymer Composites and Their Applications. In: Kalia, S., Kaith, B., Kaur, I. (eds) *Cellulose Fibers: Bio- and*

Nano-Polymer Composites. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-17370-7_22

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.

Stewart, J. R. (2015). *Agave as a model CAM crop system for a warming and drying world. Frontiers in plant science*, 6, 684.

Schuetz M., Smith R., Ellis B. 2013. Xylem tissue specification, patterning, and differentiation mechanisms. *Journal of Experimental Botany*. 64: 11–31. DOI: <https://doi.org/10.1093/jxb/ers287>

Spicer R. (2014) Symplasmic networks in secondary vascular tissues: parenchyma distribution and activity supporting long-distance transport. *Journal of Experimental Botany* 65, 1829– 1848.

Syafri, E., Sari, N. H., Mahardika, M., Amanda, P., & Ilyas, R. A. 2022. Isolation and characterization of cellulose nanofibers from *Agave gigantea* by chemical-mechanical treatment. *International Journal of Biological Macromolecules*, 200, 25-33. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.12.111>

Stuart, J. M., Segal, E., Koller, D., & Kim, S. K. 2003. A gene-coexpression network for global discovery of conserved genetic modules. *Science* 302, 249–255. DOI: [10.1126/science.1087447](https://doi.org/10.1126/science.1087447)

Schneider R., Hanak T., Persson S., Voigt C.A. 2016. Cellulose and callose synthesis and organization in focus, what's new? *Current Opinion Plant Biology*. 34: 9–16. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2016.07.007>

Shahzad, S., Hussain, M., Arfan, M., & Munir, H. 2022. physiological and biochemical attributes of *Agave sisalana* resilient adaptation to climatic and spatio-temporal

conditions. *Pakistan Journal Botany*, 54(1), 169-178. DOI:

[http://dx.doi.org/10.30848/PJB2022-1\(15\)](http://dx.doi.org/10.30848/PJB2022-1(15))

Somerville, C., Bauer, S., Brininstool, G., Facette, M., Hamann, T., Milne, J., Osborne, E., Paredes, A., Persson, S., Raab, T., Vorwerk, S., and Youngs, H. 2004. Toward a systems approach to understanding plant cell walls. *Science* 306: 2206– 2211. DOI: [10.1126/science.1102765](https://doi.org/10.1126/science.1102765)

Somerville, C. Cellulose synthesis in higher plants 2006. The annual review of cell and developmental biology, 22, 53-78. DOI: https://doi.org/10.1146/annul_review_cell_biology.22.022206.160206

Sydenstricker, T.H.D.; Mochnaz, S. M. & Amico S.C. 2003. Pull-out and other evaluations in sisal-reinforced polyester biocomposites. *Polymer testing*, Vol. 22(4):375-380. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0142-9418\(02\)00116-2](https://doi.org/10.1016/S0142-9418(02)00116-2)

Tamayo-Ordóñez, Y. J., Narvaez-Zapata, J. A., & Sánchez-Teyer, L. F. 2015. Comparative characterization of ribosomal DNA regions in different *Agave* accessions with economical importance. *Plant molecular biology reporter*, 33(6), 2014-2029. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11105-015-0895-5>

Tamayo-Ordóñez, M. C., Ayil-Gutiérrez, B. A., Tamayo-Ordóñez, Y. J., Rodríguez-Zapata, L. C., Monforte-González, M., De la Cruz-Arguijo, E. A., ... & Sánchez-Teyer, L. F. (2018). Review and in silico analysis of fermentation, bioenergy, fiber, and biopolymer genes of biotechnological interest in *Agave L.* for genetic improvement and biocatalysis. *Biotechnology progress*, 34(6), 1314-1334.

Tamayo-Ordóñez, Y. J., Ayil-Gutiérrez, B. A., Sánchez-Teyer, F. L., De la Cruz-Arguijo, E. A., Tamayo-Ordóñez, F. A., Córdova-Quiroz, A. V., & Tamayo-Ordóñez, M. C. (2017). Advances in culture and genetic modification approaches to lipid biosynthesis for biofuel production and in silico analysis of enzymatic dominions in proteins related to lipid biosynthesis in algae. *Phycological Research*, 65(1), 14-28.

Tamayo-Ordóñez, M. C., Rodríguez-Zapata, L. C., Narvaez-Zapata, J. A., Tamayo-Ordóñez, Y. J., Ayil-Gutiérrez, B. A., Barredo-Pool, F., & Sánchez-Teyer, L. F. (2016). Morphological features of different polyploids for adaptation and molecular

characterization of CC-NBS-LRR and LEA gene families in Agave L. *Journal of Plant Physiology*, 195, 80-94.

Tamayo-Ordóñez, Y. J., Narvaez-Zapata, J. A., & Sánchez-Teyer, L. F. (2015). Comparative characterization of ribosomal DNA regions in different Agave accessions with economical importance. *Plant molecular biology reporter*, 33(6), 2014-2029.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution*, 30(12), 2725-2729.

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. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0337628100>

Taylor, N. G., Gardiner, J. C., Whiteman, R., & Turner, S. R. 2004. Cellulose synthesis in the *Arabidopsis* secondary cell wall. *Cellulose*, 11(3), 329-338. DOI: <https://doi.org/10.1023/B:CELL.0000046405.11326.a8>

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

Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic acids research*, 22(22), 4673-4680.

Timmers, J., Vernhettes, S., Desprez, T., Vincken, J. P., Visser, R. G., & Trindade, L. M. 2009. Interactions between membrane-bound cellulose synthases involved in the synthesis of the secondary cell wall. *FEBS letters*, 583(6), 978-982. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.02.035>

-
- Thomas LH, Forsyth VT, Sturcova A, Kennedy CJ, May RP, Altaner CM, Apperley DC, Wess TJ, Jarvis MC. 2013 Structure of cellulose microfibrils in primary cell walls from collenchyma. *Plant Physiol.* 161, 465–476.
- Turner, S., & Kumar, M. (2018). Cellulose synthase complex organization and cellulose microfibril structure. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 376(2112), 20170048.
- Toriz, G., Denes, F., & Young, R. A. 2002. Lignin-polypropylene composites. Part 1: Composites from unmodified lignin and polypropylene. *Polymer Composites*, 23(5), 806-813. DOI: <https://doi.org/10.1002/pc.10478>
- 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. DOI. <https://doi.org/10.1023/A:1020158128506>
- Wang, L., Guo, K., Li, Y., Tu, Y., Hu, H., Wang, B. & Peng, L. 2010. Expression profiling and integrative analysis of the CESA/CSL superfamily in rice. *BMC plant biology*, 10(1), 1-16. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-282>
- Wang T, Hong M. 2016 Solid-state NMR investigations of cellulose structure and interactions with matrix polysaccharides in plant primary cell walls. *J. Exp. Bot.* 67, 503–514
- Watanabe, Y., Meents, M. J., McDonnell, L. M., Barkwill, S., Sampathkumar, A., Cartwright, H. N. & Mansfield, S. D. 2015. Visualization of cellulose synthases in *Arabidopsis* secondary cell walls. *Science*, 350(6257), 198-203. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2021.03.004>
- Whelan, J. A., Russell, N. B., & Whelan, M. A. (2003). A method for the absolute quantification of cDNA using real-time PCR. *Journal of immunological methods*, 278(1-2), 261-269.
- Xing Huang, Bo Wang, Jingen Xi, Yajie Zhang, Chunping He, Jinlong Zheng, Jianming Gao, Helong Chen, Shiqing Zhang, Weihuai Wu, Yanqiong Liang, Kexian Yi, "Transcriptome Comparison Reveals Distinct Selection Patterns in Domesticated and Wild Agave Species, the Important CAM Plants", *International Journal of*
-

Genomics, vol. 2018, ArticleID 5716518, 12 pages, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/5716518>

Yuan, J. S., Burris, J., Stewart, N. R., Mentewab, A., & Stewart, C. N. (2007, December). Statistical tools for transgene copy number estimation based on real-time PCR. In *BMC bioinformatics* (Vol. 8, No. 7, pp. 1-12). BioMed Central.

Zhang, J., Huang, G. Q., Zou, D., Yan, J. Q., Li, Y., Hu, S., & Li, X. B. (2018). The cotton (*Gossypium hirsutum*) NAC transcription factor (FSN1) as a positive regulator participates in controlling secondary cell wall biosynthesis and modification of fibers. *New Phytologist*, 217(2), 625-640.

Zeng, X., Sheng, J., Zhu, F., Wei, T., Zhao, L., Hu, X., ... & Jin, S. (2020). Genetic, transcriptional, and regulatory landscape of monolignol biosynthesis pathway in *Miscanthusx giganteus*. *Biotechnology for biofuels*, 13(1), 1-14.