



COLEGIO DE POSTGRADUADOS
INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS CAMPECHE

POSTGRADO EN BIOPROSPECCIÓN Y SUSTENTABILIDAD AGRÍCOLA EN EL
TRÓPICO

**Análisis del proceso de acumulación de compuestos
lignocelulósicos en fibras de hojas de *Agave
fourcroydes* Lem.**

DALIA CAROLINA MORÁN VELÁZQUEZ

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

SIHOCHAC, CHAMPOTÓN, CAMPECHE

2021



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

MÉXICO-PUEBLA-SAN LUIS POTOSI-TABASCO-VERACRUZ-CÓRDOBA-CAMPECHE

CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALÍAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACIÓN

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el que suscribe **Dalia Carolina Morán Velázquez**, Alumna de esta institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta institución, bajo la dirección del Profesor **Fulgencio Alatorre Cobos**, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis “**Análisis del proceso de acumulación de compuestos lignocelulósicos en fibras de hojas de *Agave fourcroydes* Lem.**” y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos que se pueden derivar serán registrados a nombre del Colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, El Consejero o Director de Tesis y El que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta institución.

Sihochac, Champotón, Campeche a 25 de Febrero de 2021.

I.Bt. **Dalia Carolina Morán Velázquez**


Vo.Bo. Dr. **Fulgencio Alatorre Cobos (consejero)**

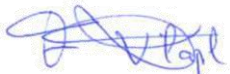
La presente tesis, titulada: **Análisis del proceso de acumulación de compuestos lignocelulósicos en fibras de hoja de *Agave fourcoides* Lem**, realizada por la alumna: **Dalia Carolina Morán Velázquez**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

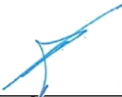
MAESTRA EN CIENCIAS


BIOPROSPECCIÓN Y SUSTENTABILIDAD AGRÍCOLA EN EL TRÓPICO

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO: 
DR. FULGENCIO ALATORRE COBOS

DIRECTOR: 
DR. FRANCISCO JAVIER VILAPLANA DOMINGO

ASESOR: 
DR. ALFREDO SÁNCHEZ VILLARREAL

ASESORA: 
DRA. CLAUDIA ANAHÍ PÉREZ TORRES

Sihochac, Champotón, Campeche a 25 de Febrero de 2021

ANÁLISIS DEL PROCESO DE ACUMULACIÓN DE COMPUESTOS LIGNOCELULOSICOS EN FIBRAS DE HOJAS DE *Agave fourcroydes* Lem

Dalia Carolina Morán Velázquez, MC
Colegio de Postgraduados, 2021

RESUMEN

El *Agave fourcroydes* Lem., comúnmente conocido como henequén, es una planta de gran relevancia económica y cultural en la Península de Yucatán debido al comercio de sus fibras. En la actualidad, el interés creciente de sus fibras naturales a nivel mundial ha provocado un renacer de la investigación sobre fibras en agave, especialmente en los mecanismos moleculares involucrados en la síntesis y acumulación de los compuestos lignocelulósicos que conforman las fibras. El objetivo de este trabajo fue analizar el proceso de desarrollo de la fibra de hoja en henequén, así como la dinámica de acumulación sus componentes estructurales (carbohidratos y lignina), durante tres diferentes etapas de desarrollo. Los abordajes experimentales incluyeron técnicas de histología, HPAEC-PAD, pirolisis-MBMS, y qRT-PCR. Los análisis histológicos mostraron diferencias en el proceso de desarrollo de fibras estructurales y de cinta por primera vez. La cuantificación de monosacáridos y subunidades de lignina reveló cambios asociados con el desarrollo de las fibras, lo cual fue también confirmado por histoquímica. Cinco genes seleccionados relacionados a pared celular, e involucrados en las rutas de biosíntesis de celulosa (*CESA1*, *CESA7*, *SUS2*) y lignina (*CCR2* y *CAD1*) mostraron expresión diferencial en raíz, rizomas, piña, hoja, tallo floral y flores. La alta expresión de *CESA7* y *CAD5* en células de parénquima adyacentes a la fibra sugiere además un mecanismo de lignificación del esclerénquima (fibras) similar al que ocurre para xilema.

Palabras clave: Desarrollo de fibras, lignina, celulosa, hemicelulosa

ANALYSIS OF THE PROCESS OF DEPOSITION OF LIGNOCELLULOSIC COMPOUNDS IN FIBERS OF *Agave fourcroydes* Lem

Dalia Carolina Morán Velázquez, MC
Colegio de Postgraduados, 2021

ABSTRACT

Agave fourcroydes Lem. is a species that has had a great economic and cultural relevance in the Peninsula of Yucatán due to its fiber trade. At present, a growing interest on natural fibers worldwide has produced a stark renown research interest to increase our understanding on Agave fibers, especially the molecular mechanisms underlying in the synthesis and deposition of the lignocellulosic compounds that make up fibers. The work aimed to analyze the process of fiber development and deposition of structural components during three different stages of development of leaf in *A. fourcroydes*. Histochemistry was used to monitor fiber development while cellulose, hemicellulose, and lignin contents were quantified by HPAEC-PAD and pyrolysis-MBMS. Expression level of genes related to cell wall were determined by RT-qPCR assays. Histology analysis revealed a gradual and contrasting differentiation for structural and ribbon fibers in agave leaf for the first time. Cellulose, hemicellulose components, total lignin and monomers showed levels associated to leaf development. *CESA1*, *CESA7*, and *SUS2*, genes involved with cellulose biosynthesis, and *CCR2* y *CAD1*, related to lignin monomers, were differentially expressed in roots, rhizome, stem, leaves, flower stem, and flowers. Additionally, high expression of *CESA7* and *CAD5* in parenchyma cells surrounding fibers suggests a lignification process of sclerenchyma fiber similar to that one reported for xylem.

Key words: fiber development, lignin, cellulose, hemicellulose

DEDICATORIA

*Con amor y gratitud a mi familia
cuyo apoyo ha sido profundo y sincero.*

AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT por el apoyo financiero que me otorgó para la realización de este trabajo.

Al proyecto de fronteras de la ciencia otorgado al Dr. Fulgencio Alatorre Cobos y titulado: "Study of molecular mechanisms underlying the biosynthesis and deposition of structural carbohydrates during the cell wall development in Agave sp: implications for the use of waste agave leaves for biofuel production" (clave 1049).

Al Colegio de Postgraduados, campus Campeche por todas las facilidades concedidas para la realización del posgrado.

A mi asesor el Dr. Fulgencio Alatorre Cobos a quien agradezco enormemente por haberme orientado e instruido profesionalmente, y por permitirme ser parte de su equipo de trabajo.

Al Dr. Francisco J. Vilaplana Domingo por su valiosa colaboración en este trabajo como codirector y por recibirme en su laboratorio para la realización de los análisis de carbohidratos.

Al Dr. Alfredo Sánchez Villarreal y a la Dra. Claudia Anahí Pérez Torres por sus colaboraciones y acertadas sugerencias durante la realización de este trabajo como parte del consejo particular.

A la Dra. Mercedes Guadalupe López Pérez por su preciada colaboración y sugerencias en los experimentos de análisis de carbohidratos.

Al Dr. Jorge M. Santamaría por su amabilidad de darnos un espacio en su laboratorio para la extracción de RNA's.

Al Dr. Jose Luis Villalpando Aguilar por su gran apoyo en las colectas y en la extracción de RNA's.

A Amaranta Girón Ramírez por su apoyo y colaboración en los análisis de qRT-PCR.

A la Dra. Hilda Araceli Zavaleta Mancera por su colaboración en los análisis histológicos.

A la Dra. Eliana Josefina Noguera Savelli por sus acertadas observaciones y por su apoyo como sinodal.

A Rodrigo por su cariño y compañía durante este trayecto en mi vida.

De manera particular a mis padres María y Ernesto; a mis hermanas Diana, Esthefania y Karen; y a mis queridos sobrinos Alex y Vale por su amor, paciencia y apoyo incondicional.

A mi querida amiga María Magaña Tzuc por todos los buenos e inolvidables momentos vividos.

A mis compañeros y amigos del Colegio de Postgraduados quienes compartieron su tiempo conmigo.

CONTENIDO

RESUMEN	¡Error! Marcador no definido.
ABSTRACT.....	¡Error! Marcador no definido.
AGRADECIMIENTOS.....	vi
LISTA DE CUADROS.....	xi
LISTA DE FIGURAS.....	xii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	2
2.1 Fibras naturales	2
2.1.1 Clasificación de las fibras naturales de acuerdo a su origen.....	2
2.1.2 Ontogenia y desarrollo de las fibras naturales	4
2.2 Aspectos morfológicos de las fibras duras: el caso de <i>Agave spp.</i>	6
2.2.1 Subclasificación morfológica de fibras duras de agave.....	8
2.3 Composición química de las fibras vegetales	10
2.3.1 Características generales de los principales componentes químicos de las fibras duras de agave: celulosa, hemicelulosa y lignina.....	12
2.3.2 Celulosa	12
2.3.3 Hemicelulosa.....	13
2.3.4 Lignina.....	14
2.4 Biosíntesis de lignina	17
2.5 Proceso de lignificación de tejidos vegetales	22
2.5.1 El papel de la lignina durante la formación del tejido de xilema	24
2.5.2 Teoría cooperativa de la lignificación	25
III. JUSTIFICACIÓN	30
V. OBJETIVOS	32

5.1 Objetivo general.....	32
5.2 Objetivos particulares	32
VI. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	33
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	34
7.1 Colecta de material vegetal para perfilado de monosacáridos y análisis histológicos.....	34
7.2 Análisis de acumulación de compuestos lignocelulósicos en fibra y tejido parenquimatoso de hoja de <i>Agave fourcroydes</i> Lem.....	37
7.2.1 Fraccionamiento de hojas	37
7.2.2 Cuantificación de celulosa mediante perfilado de monosacáridos	37
7.3 Cuantificación de lignina.....	39
7.3.1 Espectroscopía infrarroja de fibras y tejido parenquimatoso de <i>A. fourcroydes</i> en tres diferentes etapas de desarrollo	39
7.3.2 Cuantificación de lignina por py-MBMS.....	40
7.4 Análisis histológico del desarrollo de las fibras en hojas.....	41
7.4.1 Colecta de material y fijación química.....	41
7.4.2 Deshidratación del tejido vegetal.....	43
7.4.3 Inclusión en resina JB-4 y obtención de cortes histológicos.....	43
7.4.4 Análisis de las secciones histológicas transversales de hojas de <i>A. fourcroydes</i>	43
7.5 Análisis histoquímicos para celulosa y lignina en cortes histológicos transversales de hojas de <i>Agave fourcroydes</i> Lem.	44
7.6 Análisis de expresión de genes involucrados en la ruta de biosíntesis de celulosa y lignina.....	44
7.6.1 Colecta de material vegetal.....	44
7.6.2 Extracción y análisis de RNA total aislado	45

7.6.3 Síntesis de DNA complementario (cDNA).....	46
7.6.4 Control de calidad del cDNA sintetizado	47
7.6.5 Oligonucleótidos para ensayos tipo qPCR	47
7.6.6 Ensayos qPCR.....	48
7.7 Análisis de estadístico.....	49
VIII.RESULTADOS Y DISCUSIÓN	50
8.1 Cuantificación de celulosa en tejido parenquimatoso y fibras de <i>Agave fourcroydes</i> Lem.....	50
8.2 Cuantificación de lignina en tejido parenquimatoso y fibras de hoja de <i>Agave fourcroydes</i> Lem.....	54
8.3 Análisis por espectroscopia infrarroja media de fibras y tejido parenquimatoso de <i>Agave fourcroydes</i> Lem. en diferentes etapas de desarrollo.	57
8.4 Análisis histológico del desarrollo de las fibras de esclerénquima en cuatro diferentes etapas de crecimiento de bulbilos de <i>Agave fourcroydes</i> Lem.	61
8.5 Análisis del patrón de acumulación de lignina en las fibras de esclerénquima en cuatro diferentes etapas de desarrollo de plantas de bulbito de <i>Agave fourcroydes</i> Lem.....	71
8.6 Análisis de expresión por qRT-PCR de genes involucrados en la ruta de biosíntesis de celulosa y lignina en diferentes tejidos de <i>Agave fourcroydes</i> Lem.	77
8.6.1 Análisis de expresión de los genes <i>SUS2</i> , <i>CESA1</i> , <i>CESA7</i> , <i>CCR2</i> y <i>CAD5</i> en raíz, rizomas, piña, hoja, tallo floral y flores de <i>Agave fourcroydes</i> Lem.	79
8.6.2 Análisis de expresión de los genes <i>SUS2</i> , <i>CESA1</i> , <i>CESA7</i> , <i>CCR2</i> y <i>CAD5</i> en hojas y en el tejido adyacente a las fibras.....	82

IX CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	85
9.1 Conclusiones	85
9.2 Perspectivas	86
X. LITERATURA CITADA	87
XI. ANEXOS	99

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Composición química de fibras naturales	10
Cuadro 2. Contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina en fibras de diferentes especies de Agaves.	11
Cuadro 3. Oligonucleótidos utilizados para los análisis tipo qPCR.....	48
Cuadro 4. Los picos utilizados para el análisis FT-IR y posibles asignaciones de tejido parenquimatoso, fibras de bulbilos y fibras de hijuelos y plantas adultas de <i>A. fourcroydes</i> Lem. reportados por Bezazi <i>et al.</i> 2014	59
Cuadro 5. Rendimiento y pureza del RNA total extraído de raíz, rizomas, piña, hoja, tallo floral y flores (análisis 1), y hojas y tejido adyacente a fibras (análisis 2) de <i>A. fourcroydes</i> Lem.....	78
Cuadro 6. Altura de los bulbilos utilizados en los análisis histológicos y perfiles de carbohidratos y lignina.	99
Cuadro 7. Altura de los hijuelos y plantas adultas utilizadas en los análisis histológicos y perfiles de carbohidratos y lignina.....	99
Cuadro 8. Resultados de los análisis estadísticos del perfil de carbohidratos en tejido parenquimatoso bulbilos.	99
Cuadro 9. Resultados de los análisis estadísticos del perfil de carbohidratos en fibras de bulbilos.	100

Cuadro 10. Resultados de los análisis estadísticos del perfil de carbohidratos en hijuelos y plantas adultas.	100
Cuadro 11. Resultados de los análisis estadísticos del perfil de acumulación de lignina en tejido parenquimatoso bulbilos.....	101
Cuadro 12. Resultados de los análisis estadísticos del perfil de acumulación de lignina en fibras bulbilos.	101
Cuadro 13. Resultados de los análisis estadísticos del perfil de acumulación de lignina en hijuelos y plantas adultas.	101
Cuadro 14. Prueba de medias del análisis de expresión de genes biosintéticos de lignina y celulosa en diferentes tejidos de <i>A. fourcroydes</i> Lem.	102
Cuadro 15. Prueba de medias del análisis de expresión de genes biosintéticos de lignina y celulosa en hoja y tejido adyacente a fibra de <i>A. fourcroydes</i> Lem.....	102
Cuadro 16. Análisis estadísticos de los datos morfométricos de bulbilos analizados.	102
Cuadro 17. Análisis estadísticos de los datos morfométricos de hijuelos t plantas adultas analizadas.....	102

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación de fibras vegetales	3
Figura 2. Esquema representativo de las estructuras típicas de fibras y esclereidas.	4
Figura 3. Micrografías tomadas por microscopio electrónico de barrido de fibras de <i>Cocos nucifera</i> , <i>Zea mays</i> , <i>Corchorus capsularis</i> , <i>Attalea funifera</i> y <i>Agave sisalana</i>	6
Figura 5. Micrografías tomadas por microscopio electrónico de barrido de un haz de fibra de bagazo de <i>A. angustifolia</i>	8
Figura 6. Esquema de los diferentes tipos de fibras en <i>Agave sisalana</i>	9

Figura 7. Estructura química de las cadenas de celulosa	13
Figura 8. Principales monómeros de hemicelulosa	14
Figura 9. Estructura química de la lignina (A); y sus tres monómeros esenciales que la conforman (B).....	16
Figura 10. Ruta de biosíntesis de los monómeros esenciales de la lignina.....	18
Figura 11. Esquema de los diferentes tipos de células lignificadas en plantas superiores.....	24
Figura 12. Diferentes niveles de lignificación cooperativa y autónoma dependiendo de los tipos de células estudiadas: elementos traqueales de xilema, fibras de xilema y células endodérmicas	28
Figura 13. Los genes relacionados con el metabolismo de lignina son expresados preferencialmente en células vecinas o en las células en lignificación en <i>Arabidopsis thaliana</i> L.....	29
Figura 14. Estrategia experimental de trabajo para el cumplimiento del objetivo general.	33
Figura 15. Colecta y preparación de material vegetal.	35
Figura 16. Graficas de los datos morfométricos de las plantas analizadas.	36
Figura 17. Secciones representativas de hoja de <i>A. fourcroydes</i> Lem. utilizadas para el análisis histológico del desarrollo de fibras.	42
Figura 18. Metodología de extracción de RNA de hoja de <i>A. fourcroydes</i> Lem. .	46
Figura 20. Análisis de lignina total y sus subunidades a lo largo del desarrollo de la fibra en <i>A. fourcroydes</i>	56
Figura 21. Espectros FTIR de muestras de tejido parenquimatoso (A), fibras de hoja de bulbilos (B), fibra de hoja de hijuelos y plantas adultas (C) de <i>A. fourcroydes</i>	58
Figura 22. Micrografía de cortes histológicos de hoja de <i>A. fourcroydes</i> Lem. y la clasificación de fibras analizadas en cuatro diferentes etapas de desarrollo.	62

Figura 23. Desarrollo de los diferentes tipos de fibras de hoja de bulbilos de <i>A. fourcroydes</i> en cuatro etapas de crecimiento.....	66
Figura 24. Cinética espacio-temporal del desarrollo de las fibras de <i>A. fourcroydes</i> Lem.	67
Figura 25. Fibras estructurales ubicadas en la parte adaxial de hoja en cuatro diferentes etapas de crecimiento de <i>A. fourcroydes</i> Lem.....	68
Figura 26. Fibras de cinta en cuatro diferentes etapas de crecimiento de <i>A. fourcroydes</i>	69
Figura 27. Fibras estructurales ubicadas en la parte abaxial de hoja en cuatro diferentes etapas de crecimiento de <i>A. fourcroydes</i> Lem.....	70
Figura 28. Análisis del patrón de acumulación de lignina en los diferentes tipos de fibras de hoja <i>A. fourcroydes</i> Lem.en cuatro diferentes etapas de crecimiento de por autofluorescencia..	73
Figura 29. Fibras estructurales ubicadas en la parte adaxial de hoja en cuatro diferentes etapas de crecimiento de <i>A. fourcroydes</i> Lem.....	74
Figura 30. Fibras de cinta en cuatro diferentes etapas de crecimiento de <i>A. fourcroydes</i> Lem.....	75
Figura 31. Fibras estructurales ubicadas en la parte abaxial de hoja en cuatro diferentes etapas de crecimiento de <i>A. fourcroydes</i> Lem.....	76
Figura 32. Análisis de la integridad de los RNAs extraídos de <i>A. fourcroydes</i> Lem.....	78
Figura 33. Análisis de expresión por qRT-PCR en tiempo real de los genes involucrados en la síntesis de celulosa y lignina.....	81
Figura 34. Análisis de expresión por qRT-PCR en tiempo real de los genes involucrados en la síntesis de celulosa y lignina.....	84

I. INTRODUCCIÓN

Las fibras naturales son un recurso que ha sido utilizado a lo largo de la historia por muchos años para la elaboración de múltiples productos como telas, cuerdas, redes de pescar, entre otros. Los Agaves han resultado ser plantas potenciales para la producción de fibras naturales, tal es el caso del *Agave fourcroydes* Lem. que fue aprovechado en la producción masiva de fibras en México durante años. Actualmente, este tipo de fibras han tenido un buen desarrollo en la industria de termoplásticos, lo que ha ocasionado que se despierte el interés hacia estas fibras. La mayoría de investigaciones actuales en fibras de *A. fourcroydes* Lem. están enfocadas principalmente a su composición química, propiedades físicas y morfológicas. Sin embargo, aún se carece de información relacionada con la descripción de los factores moleculares que se encuentran involucrados en la formación de fibras como son los genes que participan en las rutas de biosintéticas de los compuestos lignocelulósicos que las conforman. También se conoce poco acerca de cómo ocurre la acumulación de estos compuestos en las paredes secundarias de las fibras durante su formación. La importancia de conocer más acerca de los aspectos moleculares y metabolómicos de las fibras podría contribuir a un mejor aprovechamiento tanto de las fibras como del cultivo en general del *A. fourcroydes*.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Fibras naturales

Las fibras naturales son uno de los materiales más antiguos del mundo utilizados por el hombre debido a sus diversas propiedades como resistencia, rigidez, flexibilidad y durabilidad, así también por la facilidad de obtenerlas y su abundancia en la naturaleza (Bhattacharyya *et al.*, 2015; Kılınç *et al.*, 2017). Tiempo atrás, las fibras tuvieron un papel muy importante en la economía para los países que las comercializaban, pues muchas de las necesidades que el hombre cubría con la exploración de nuevas fibras naturales; con ellas se elaboraban diversos productos como cuerdas o hilos que se implementaban para crear redes de pescar, costales, telas, entre otros (Kılınç *et al.*, 2017). Actualmente, las fibras naturales son consideradas un recurso renovable y una alternativa para ser utilizadas principalmente como materiales de refuerzos y biopolímeros, con la intención de reemplazar materiales sintéticos y mejorar la calidad de los materiales sintéticos que son complementados con fibras naturales. Debido a que las fibras naturales tienen características físicas que superan a las fibras sintéticas, sus aplicaciones se siguen diversificado hacia diferentes áreas, siendo ahora también utilizadas en partes de automóviles y aeronaves, materiales de construcción, muebles y embalaje, biopolímeros, cosméticos, productos químicos finos, entre otros (Sanjay *et al.*, 2016).

2.1.1 Clasificación de las fibras naturales de acuerdo a su origen

Las fibras naturales son clasificadas según su origen en: fibras animales, minerales y vegetales. Las fibras animales están constituidas principalmente de proteínas (Omar Faruk *et al.*, 2012) e incluyen pelo de animales, fibra de seda y fibra aviar. Entre las más utilizadas se encuentran la lana, alpaca, mohair, plumas, angora y seda. Por otra parte, como su nombre lo indica las fibras minerales son obtenidas a partir de ciertos minerales y están clasificadas en fibras de asbesto, fibras

cerámicas, y fibras metálicas. Algunas de las fibras minerales son ligeramente modificadas (Chandramohan y Marimuthu, 2011; Bhattacharyya *et al.*, 2015).

Las fibras vegetales están conformadas por compuestos lignocelulósicos y tienen una morfología similar. Las fibras están conformadas por muchas células que poseen un lumen y paredes celulares primarias y secundarias. Cada célula que conforma el haz de fibra está unida por las laminillas medias. Las diferencias que distinguen a los diversos tipos de fibras vegetales son el número de células que conforman al haz de fibras, el tamaño de las paredes celulares, la longitud y el diámetro de la fibra, y estas características influyen en sus propiedades físicas (Fidelis *et al.*, 2013; Hidalgo-Reyes *et al.*, 2015). De manera general, las fibras vegetales se pueden clasificar en cinco tipos de acuerdo al órgano o tejido de donde se obtienen. En la Figura 1 se muestra esta clasificación y algunos ejemplos para cada caso (Güven *et al.*, 2016).

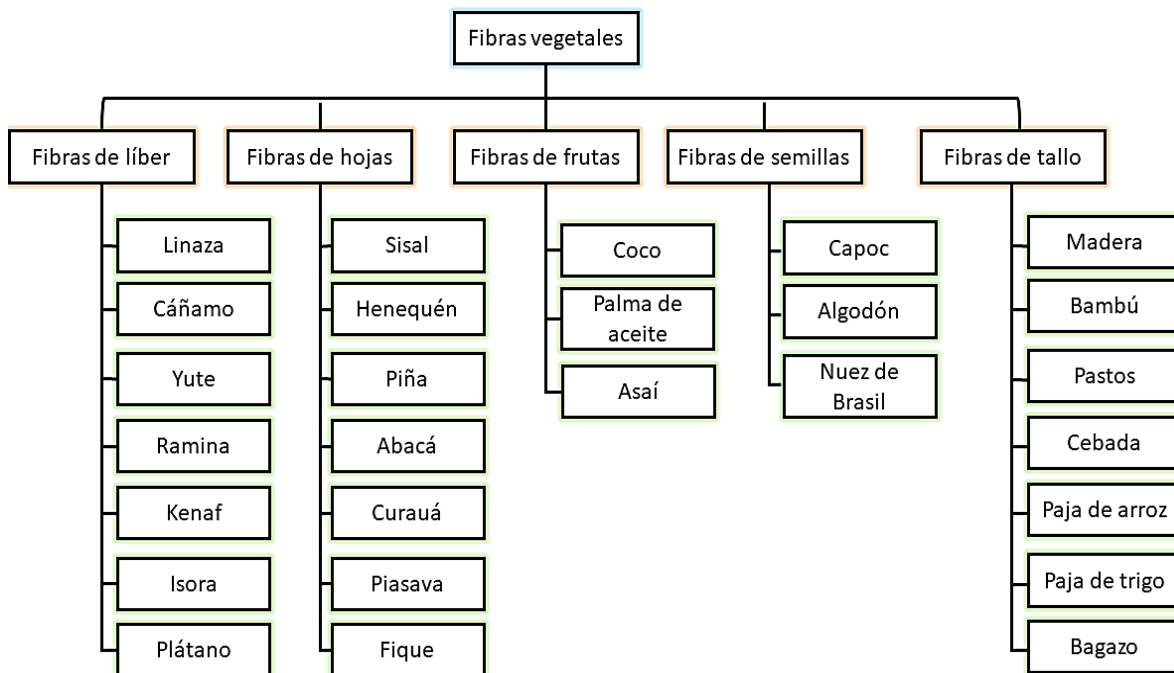


Figura 1. Clasificación de fibras vegetales (Güven *et al.*, 2016).

2.1.2 Ontogenia y desarrollo de las fibras naturales

El tejido de esclerénquima está conformado por dos tipos de células comúnmente lignificadas; fibras y esclereidas (Figura 2). Las fibras son células muy alargadas, que se caracterizan por tener una pared celular secundaria gruesa y que se pueden presentar en tallos, raíces y asociadas a haces vasculares en las hojas. Por otra parte, las esclereidas se encuentran en diferentes formas (esféricas, ovales o cilíndricas) (Figura 2) y están presentes en diversos tejidos vegetales como peridermis, corteza, xilema, floema, hojas y frutos (Van Dam *et al.*, 2003; López y Yahia, 2019). Se sabe que el tejido de esclerénquima maduro, junto con los tejidos circundantes (xilema), proporciona un soporte manteniendo la morfología establecida de la planta (López y Barclay, 2017).

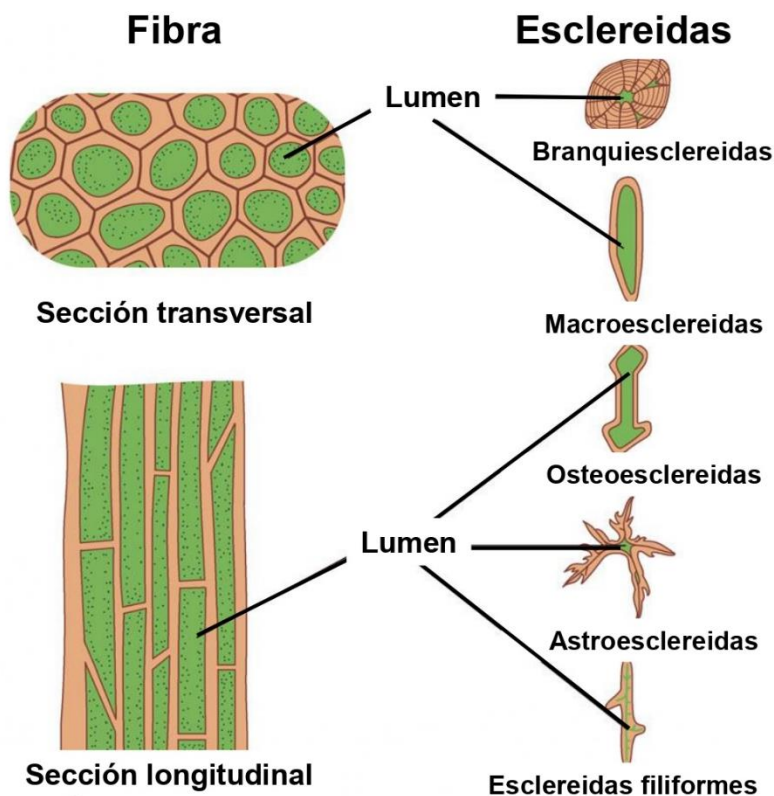


Figura 2. Esquema representativo de las estructuras típicas de fibras y esclereidas. Se muestran las formas típicas para ambos tipos de células de esclerénquima (Flores-Vindas, 1994).

Las fibras vegetales se pueden clasificar de acuerdo a su posición dentro o fuera del xilema. Las fibras asociadas a xilema o fibras libriformes son comúnmente conocidas como fibras xilarias. Se sabe que este tipo de fibras se desarrollan a partir de los tejidos meristemáticos. Por otro lado, se encuentran las fibras extraxilares que son las fibras que se localizan fuera del xilema y se pueden encontrar dentro de la corteza, el floema o en la periferia de los haces vasculares (Van Dam *et al.*, 2003).

La formación de fibras incluye desde la división celular hasta la maduración y la muerte celular. Durante este proceso se pueden distinguir diferentes etapas: a) iniciación, b) elongación, y c) formación de pared celulares y maduración. Durante cada una de estas etapas surgen cambios característicos anatómicos, bioquímicos y genéticos moleculares específicos. La formación de fibras inicia de forma temprana antes de que el órgano de la planta donde se producen se haya alargado por lo que pueden crecer en longitud de manera simétrica junto con las células vecinas que continúan dividiéndose. La elongación de las células que constituyen a las fibras ocurre a partir de la extensión de la pared celular en toda la superficie o por extensiones localizadas. Posteriormente, se procede a la síntesis de las paredes celulares que corresponde a la deposición de metabolitos, principalmente de celulosa y hemicelulosa. Por último, la maduración de las fibras consiste en el engrosamiento de paredes celulares y muerte celular (Van Dam *et al.*, 2003). En la Figura 3, se presenta la microestructura de algunos tipos de fibras vegetales.

Actualmente, existen plantas modelos que permiten estudiar el proceso de formación de fibras blandas, como *Linum usitatissimum* L., *Cannabis sativa* L., *Boehmeria nivea* L. y *Hibiscus cannabinus* L. (Van Dam *et al.*, 2003). Así como también el proceso de formación de fibras duras, que son aquellas que provienen de hojas, por ejemplo, *Agave sisalana* Perrine ex Engelm., *Agave fourcroydes* Lem., *Musa textiles* Née., y *Yucca* ssp. (Van Dam *et al.*, 2003).

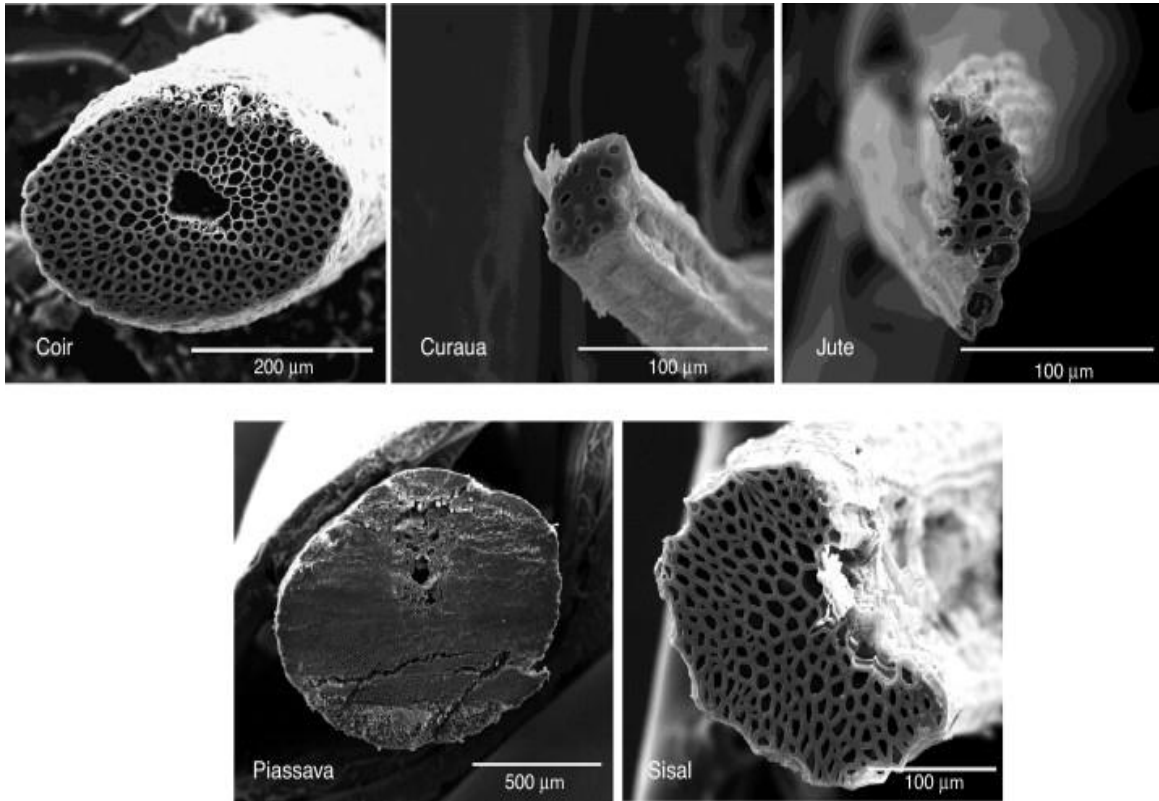


Figura 3. Micrografías tomadas por microscopio electrónico de barrido de fibras de *Cocos nucifera* L., *Zea mays* L., *Corchorus capsularis* L., *Attalea funifera* Mart. ex Spreng. y *Agave sisalana* Perrine ex Engelm. (Fidelis *et al.*, 2013).

2.2 Aspectos morfológicos de las fibras duras: el caso de *Agave* spp.

Algunas especies de agaves como *A. fourcroydes* Lem., *A. sisalana* Perrine ex Engelm., *A. lechuguilla* Torr. y *A. americana* L. se caracterizan por su alto contenido de fibras duras. En *A. sisalana* Perrine ex Engelm., una hoja presenta aproximadamente de 700 a 1400 haces de fibras. La longitud de sus fibras oscila de los 0.5 a 1.5 metros y su diámetro es de alrededor de 200 μm . Cada fibra está integrada por numerosas fibras individuales alargadas, o células de fibra, que tienen un diámetro de alrededor de 6–30 μm (de Andrade *et al.*, 2008; Fidelis *et al.*, 2013). Las células que conforma el haz de fibras se componen de cuatro partes principales; la pared primaria, la pared secundaria gruesa, la pared terciaria y el lumen (Figura 4A). Estas células están unidas por medio de laminillas medias (LM), que consisten

principalmente de pectinas. Las paredes celulares de estas fibras se conforman de varias capas de estructuras fibrilares que se encuentran unidas a la lignina. En la pared primaria, las fibrillas tienen una estructura reticulada, mientras que en la pared secundaria externa las fibrillas están dispuestas en espirales. La pared terciaria delgada más interna tiene una estructura fibrilar paralela y encierra al lumen (de Andrade *et al.*, 2008).

Otras características que menciona de Andrade *et al.*, 2008 acerca de las fibras de sisal es que cada fibra contiene numerosas fibras individuales alargadas, o células de fibra, que tienen un diámetro de alrededor de 6–30 μm (Figura 4B).

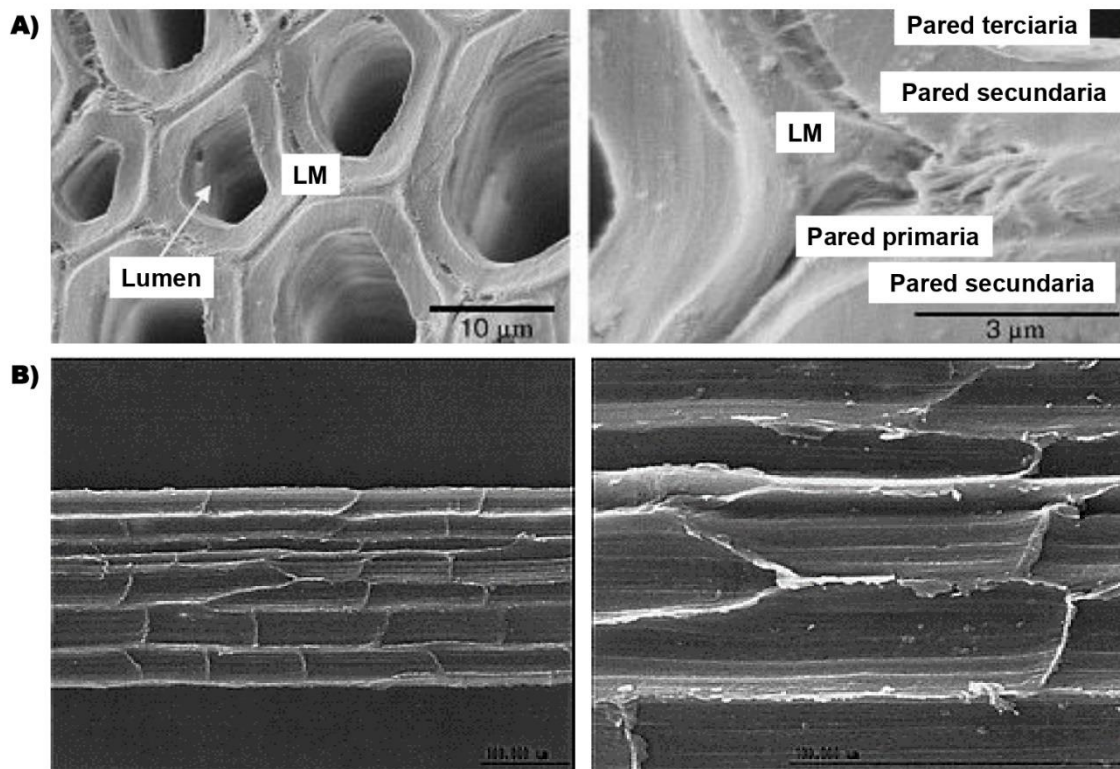


Figura 4. Micrografías tomadas por microscopio electrónico de barrido de una fibra de Perrine ex Engelm.) Células de fibra con lumen, láminas medias y paredes celulares (de Andrade *et al.*, 2008). B) Corte longitudinal de una fibra técnica de sisal (Oksman *et al.*, 2002).

Estudios sobre la morfología de fibras de *A. angustifolia* Haw. reportan que el haz de fibras presenta una ranura en forma de “C” (similar al haz de fibra de *A. sisalana* Perrine ex Engelm.). Este haz agrupa alrededor de 190 - 210 fibras, que están separadas por una lámina central (Figura 5A y B). Al igual que las fibras de *A. sisalana* Perrine ex Engelm. las paredes celulares de las fibras de *A. angustifolia* Haw. se conforman por pared primaria y secundaria. Asimismo, las células de los haces de fibras están unidas por una lámina media (Hidalgo-Reyes *et al.*, 2015).

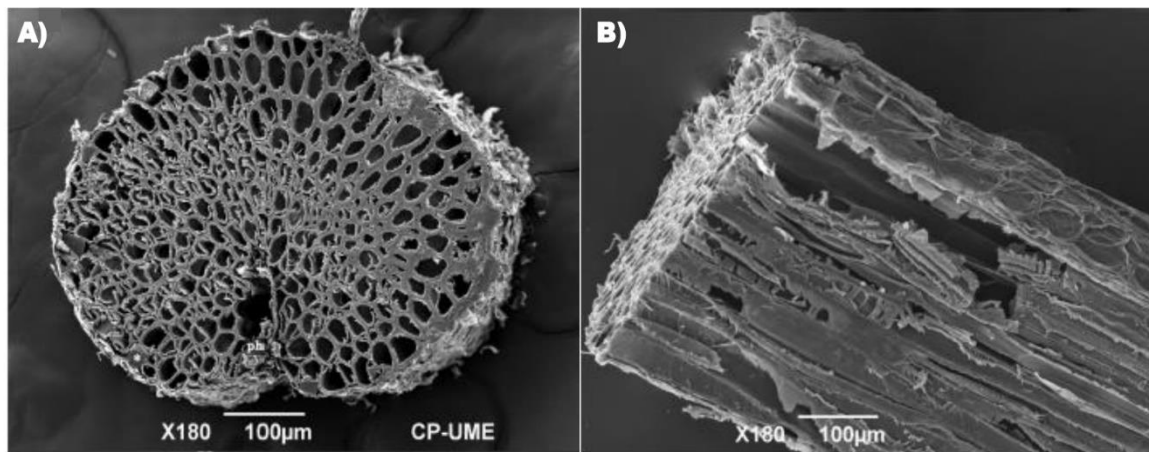


Figura 5. Micrografías tomadas por microscopio electrónico de barrido de un haz de fibra de bagazo de *A. angustifolia* Haw. A) Sección transversal y B) sección longitudinal (Hidalgo-Reyes *et al.*, 2015).

2.2.1 Subclasificación morfológica de fibras duras de agave

Dentro de la hoja del sisal es posible reconocer tres tipos básicos de fibras: fibras estructurales, de cinta y de xilema (Figura 6A y B) (Li *et al.*, 2000; de Andrade *et al.*, 2008). Las fibras estructurales o mecánicas le dan a la hoja rigidez y se encuentran en la periferia de la hoja (Figura 6C). Estas fibras son de gran importancia comercialmente debido a su resistencia durante el proceso de extracción. Las fibras del arco o de cinta crecen en asociación con los tejidos conductores de la planta (Figura 6D) y generalmente se encuentran la parte central de la hoja. Estas fibras se extienden desde la base hasta la punta de la planta y tienen buena resistencia mecánica. Por último, las fibras de xilema crecen opuestas a las fibras de cinta y están conectadas a ellas a través de los tejidos conductores (Figura 6B). Estas

fibras están compuestas de células de paredes delgadas, son más débiles que las fibras estructurales y de arco, y comúnmente se rompen durante el proceso de extracción de fibra (Bisanda *et al.*, 1992; Li *et al.*, 2000; de Andrade *et al.*, 2008).

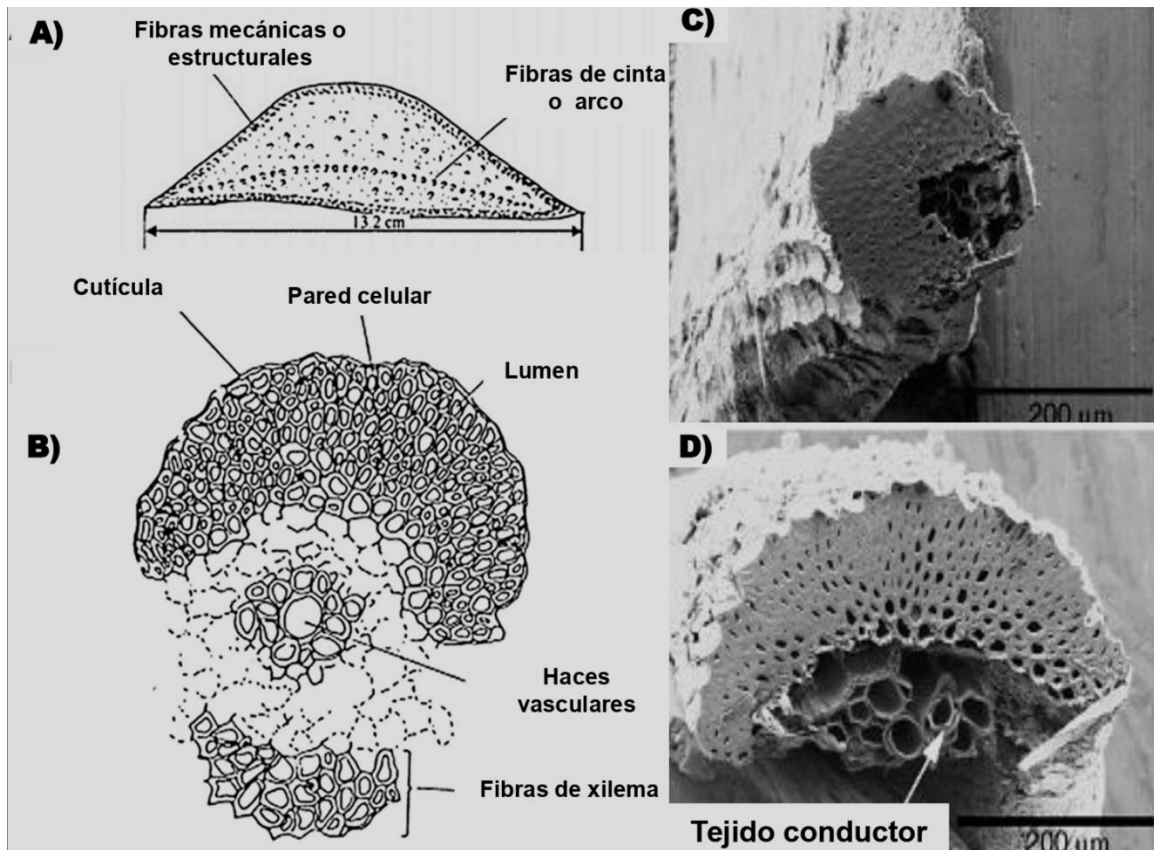


Figura 6. Esquema de los diferentes tipos de fibras en *Agave sisalana* Perrine ex Engelm. A) Sección transversal de una hoja de *A. sisalana* Perrine ex Engelm. B) Corte transversal de un haz de fibra de cinta (Li *et al.*, 2000). C) Micrografía de una fibra estructural. D) Micrografía de una fibra de cinta (de Andrade *et al.*, 2008).

2.3 Composición química de las fibras vegetales

Las fibras vegetales están conformadas principalmente por celulosa, hemicelulosa, lignina, pectina y ceras. La concentración de estos compuestos en las fibras cambia dependiendo de la especie de la planta. El Cuadro 1 muestra la concentración de los compuestos químicos de algunas fibras vegetales. Se observa que el compuesto mayoritario en todas las especies analizadas es la celulosa, seguido por el componente de hemicelulosa, y en tercer lugar lignina. Pectinas y ceras se hallan en menor proporción respecto al resto de componentes de pared celular, y solo están presentes en algunas fibras de ciertas especies.

Cuadro 1. Composición química de fibras naturales (Komuraiah, 2014).

Nombre de la fibra	Celulosa (%)	Hemicelulosa (%)	Lignina (%)	Pectina (%)	Ceras (%)
Abacá	62.5	21	12	0.8	3
Algodón	89	4	0.75	6	0.6
Bambú	34.5	20.5	26	-	-
Cáñamo	81	20	4	0.9	0.8
Capoc	13.16	-	-	-	-
Coco	46	0.3	45	4	-
Curauá	73.6	5	7.5	-	-
Esparto	45.4	38.5	14.9	-	2
Henequén	60	28	8	-	0.5
Isora	74	-	23	-	1.09
Kenaf	53.5	21	17	2	-
Linaza	70.5	16.5	2.5	0.9	-
Ortiga	86	10	-	-	4
Phormim	67	30	11	-	-
Piassava	28.6	25.8	45	-	-
Piña	80.5	17.5	8.3	4	-

Plátano	62.5	12.5	7.5	4	-
Ramio	72	14	0.8	1.95	-
Sisal	60	11.5	8	1.2	-
Yute	67	16	9	0.2	0.5

En el caso de Agaves, las fibras están compuestas principalmente por celulosa, hemicelulosa y lignina. En el Cuadro 2 se muestra la composición para fibras de *A. fourcroydes* (henequén). Esta composición de la fibra depende de varios factores, como la especie de agave, condiciones climáticas y de suelo, edad de la planta, entre otros. Estos cambios en la composición química también afectan las propiedades físicas y mecánicas de las fibras. En el Cuadro 2 también se muestra la composición química de fibras de algunas especies de agaves que han sido aprovechadas para la producción de fibras naturales (Hulle *et al.*, 2015). De las especies listadas, aquellas típicamente usadas para extracción de fibras (*A. lechuguilla* Torr. y *A. fourcroydes* Lem.) presentan fibras con un mayor contenido de celulosa, pero interesantemente con un menor contenido de hemicelulosa y alto porcentajes de lignina.

Cuadro 2. Contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina en fibras de diferentes especies de Agaves.

Especies	Tejido	Celulosa (% p/p)	Hemicelulosa (% p/p)	Lignina (% p/p)	Referencia
<i>Agave americana</i>	Fibras de hoja	68.4	15.7	4.9	Mylsamy y Rajendran, 2010
<i>Agave lechuguilla</i>	Fibras de hoja	79.8	3 – 6	15.3	Vieira <i>et al.</i> , 2002
<i>Agave fourcroydes</i>	Fibras de hoja	77.6	4-8	13.1	(Fuqua <i>et al.</i> , 2012; Malkapuram <i>et al.</i> , 2009)

<i>Agave sisalana</i>	Fibras de hoja	71	11.7	8.7	Sahu y Gupta, 2017
-----------------------	----------------	----	------	-----	--------------------

2.3.1 Características generales de los principales componentes químicos de las fibras duras de agave: celulosa, hemicelulosa y lignina

2.3.2 Celulosa

La celulosa es un polisacárido que se encuentra de forma natural en las plantas, y es considerado el componente estructural básico y más abundante de las paredes celulares de plantas y en todas las fibras vegetales. Este biopolímero está conformado por moléculas de D-anhidro glucosa (C₆H₁₁O₅), unidas por enlaces glucósidos β-1,4 (Figura 7). La unión de estas moléculas forman paquetes llamados microfibrillas que son los principales elementos que soportan la carga de las paredes celulares. La celulosa se presenta en formas alomorfos (cristalinas) y amorfas (no organizada) y ambas forman una estructura fibrosa organizada (Lee *et al.*, 2014). La celulosa cristalina se forma como resultado de los de enlaces de hidrógeno intermoleculares e intramoleculares y fuerzas de van der Waals (Polk *et al.*, 2019). Esta estructura cristalina facilita la alta resistencia mecánica de una microfibrilla y regula las propiedades físicas de las fibras naturales como resistencia, rigidez y estabilidad a las fibras (Delmer *et al.*, 1995; Lerouxel *et al.*, 2006; Komuraiah, 2014; McNamara, *et al.*, 2015; Polk *et al.*, 2019).

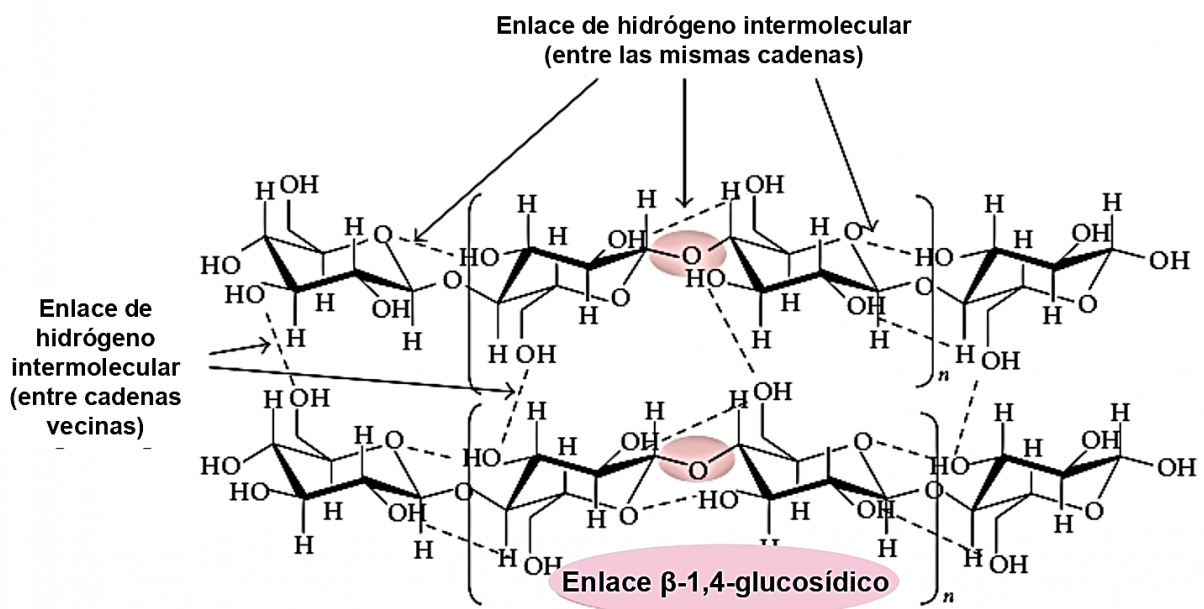


Figura 7. Estructura química de las cadenas de celulosa (Lee *et al.*, 2014).

2.3.3 Hemicelulosa

Las hemicelulosas son principalmente polímeros heterogéneos de pentosas (xilosa, arabinosa), hexosas (manosa, glucosa, galactosa), ácido 4-O metil glucrónico y residuos de ácido galacturónico (Figura 8). También se encuentran pequeñas cantidades de ramosa en algunas maderas duras (Mamman *et al.*, 2008). Todos ellos son polisacáridos que están unidos en cadenas de ramificación relativamente cortas. Están relacionados con las microfibrillas de celulosa, incrustando la celulosa en una matriz. Las hemicelulosas son muy hidrofílicas, y sus pesos moleculares son más bajos que la celulosa (Komuraiah *et al.*, 2014) y pueden representar hasta un tercio de la masa seca de paredes celulares o del contenido lignocelulósicos. El contenido de hemicelulosa en una planta puede depender de la especie analizada (Mamman *et al.*, 2008; Pauly *et al.*, 2013).

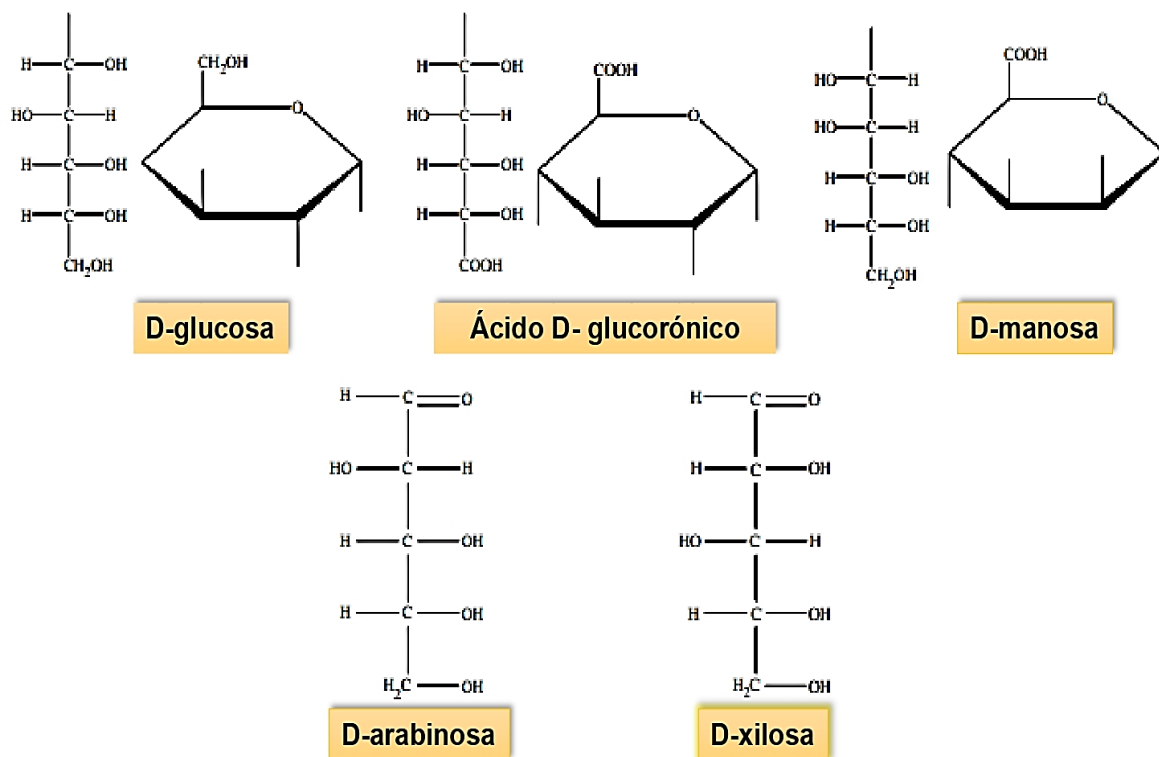


Figura 8. Principales monómeros de hemicelulosa (Mamman *et al.*, 2008)

2.3.4 Lignina

La lignina es un polímero natural, el segundo compuesto más abundante en el reino vegetal después de la celulosa, que se encuentra en las paredes celulares de las plantas para impartir principalmente rigidez. Se conoce que la lignina está relacionada con la estructura celular y que sirve también para evitar la pérdida de agua al brindar impermeabilidad en la pared celular y proteger así la planta de algunas enfermedades. Asimismo, la lignina juega un papel importante en la morfogénesis de plantas, sin que los mecanismos implicados estén aún claros (Moore *et al.*, 2006; Komuraiah *et al.*, 2014).

Estructuralmente la lignina está conformada principalmente por tres monómeros básicos o monolignoles, que corresponden a alcoholes de hidroxicinamilo: alcohol coniferílico, alcohol sinapílico y alcohol *p*-cumarílico (Figura 9) (Vanholme *et al.*, 2010). La distribución de estos monómeros varía considerablemente entre los

taxones y especies de plantas. En las gimnospermas, la lignina se compone principalmente de unidades G, mientras que para el caso de las dicotiledóneas y se compone principalmente de unidades G y S (Boerjan *et al.*, 2003; Gui *et al.*, 2020). En monocotiledóneas, especialmente en pastos, la lignina incorpora unidades G y S, parcialmente en conjunto con grupos γ -acilo (por ejemplo, γ -*p*-cumaratos y ferulados) (Gui *et al.*, 2020). Se ha reportado también que la composición de lignina es distinta entre los diferentes tipos de células, como en los vasos y las fibras, aunque la estimación cuantitativa en estos tejidos específicos sigue siendo un desafío (Boerjan *et al.*, 2003; Nakashima *et al.*, 2008).

La acumulación de los monolignoles se realiza predominantemente durante la formación de las paredes secundarias de las células, haciéndolas rígidas e impermeables. Además del fenómeno de la deposición de lignina programada en el desarrollo de la planta, la biosíntesis de estos biopolímeros, también puede ser inducida por diversas condiciones de estrés biótico y abiótico, como heridas, infección por patógenos, estrés metabólico y perturbaciones en la estructura de la pared celular (Boerjan *et al.*, 2003; Moore *et al.*, 2006; Vanholme *et al.*, 2010). La acumulación de lignina además de proteger a los polisacáridos de la pared celular, genera una mayor resistencia a la degradación y en consecuencia es un factor limitante en la conversión de la biomasa vegetal en pulpa o biocombustibles. La eliminación de lignina de la biomasa vegetal es un proceso costoso, por lo tanto, los esfuerzos de investigación ahora están dirigidos a diseñar plantas que depositen menos lignina o sinteticen ligninas que sean más susceptibles a la degradación química (Vanholme *et al.*, 2010).

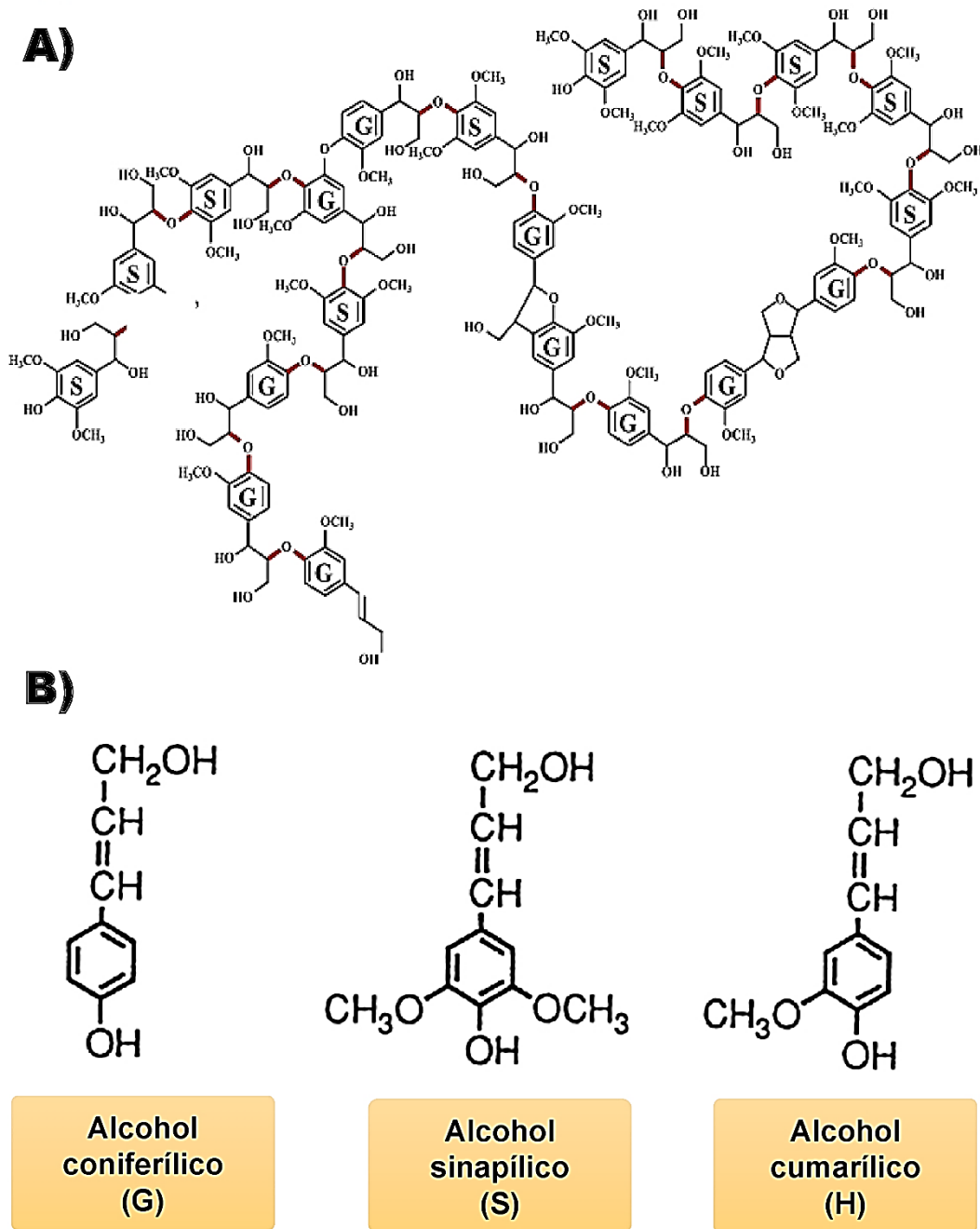


Figura 9. Estructura química de la lignina (A); y sus tres monómeros esenciales que la conforman (B) (Betts *et al.*, 1991; Dixon y Barros, 2019).

2.4 Biosíntesis de lignina

La ruta de biosíntesis de los monolignoles ha sido bien estudiada en varias especies de plantas como *Arabidopsis thaliana* L. y *Populus* spp. (Zhang *et al.*, 2020). Estos monómeros (*p*-cumarílico, coniferílico y alcohol sinapílico) se sintetizan a partir del aminoácido fenilalanina a través de las vías generales de fenilpropanoides y específicas de monolignoles. El aminoácido fenilalanina se deriva de la vía biosintética del ácido shikímico, presente en plástidos. La actividad de la enzima FENILALANINA AMONIACO LIASA (PAL) convierte a fenilalanina y a la tirosina (en pastos la tirosina funciona como sustrato adicional) en ácidos cinámico y *p*-cumárico, respectivamente (Figura 10).

Para la biosíntesis de alcoholes de los monolignoles, el ácido carboxílico debe reducirse, y para los alcoholes coniferílico y sinapílico, el anillo aromático es metoxilado. La reducción del resto de ácido carboxílico se realiza a través de la actividad de las enzimas 4CL, CCR y CAD, produciendo así sucesivamente CoA-tioéster, aldehído y alcohol. El anillo aromático se hidroxila a través de CITOCROMO P450s (CYP450s; C4H, C3H y F5H) y es 3-O-metilado y 5-O-metilado por las enzimas O-metiltransferasas (CCoAOMT y COMT) (Figura 10) (Vanholme *et al.*, 2019; Zhong *et al.*, 2019). Los monolignoles sintetizados se transportan entonces a través de la membrana plasmática hacia las paredes celulares, donde son oxidados por lacasas y peroxidasas para formar radicales libres que luego se polimerizan en lignina.

Algunas características que destacan de la ruta fenilpropanoides es la aparición de intermedios de éster shikimato. Anteriormente se creía que estos intermedios no eran necesarios para la biosíntesis de los alcoholes, pero ahora se reconocen como los sustratos preferidos para la 3-hidroxilación por la enzima C3H. Por otra parte, también se cree que la aparición de intermedios de éster shikimato podrían tener un papel en la regulación de la ruta. Otra característica de la ruta es que varias enzimas (4CL, CCR, CAD, HCT, COMT y F5H) tienen múltiples sustratos. Todo esto ocasiona que la ruta tenga una estructura similar a una cuadrícula, en la cual el flujo

hacia el coniferilo y el alcohol sinapílico puedan fluir a través de diferentes rutas paralelas (Figura 10) (Vanholme *et al.*, 2019).

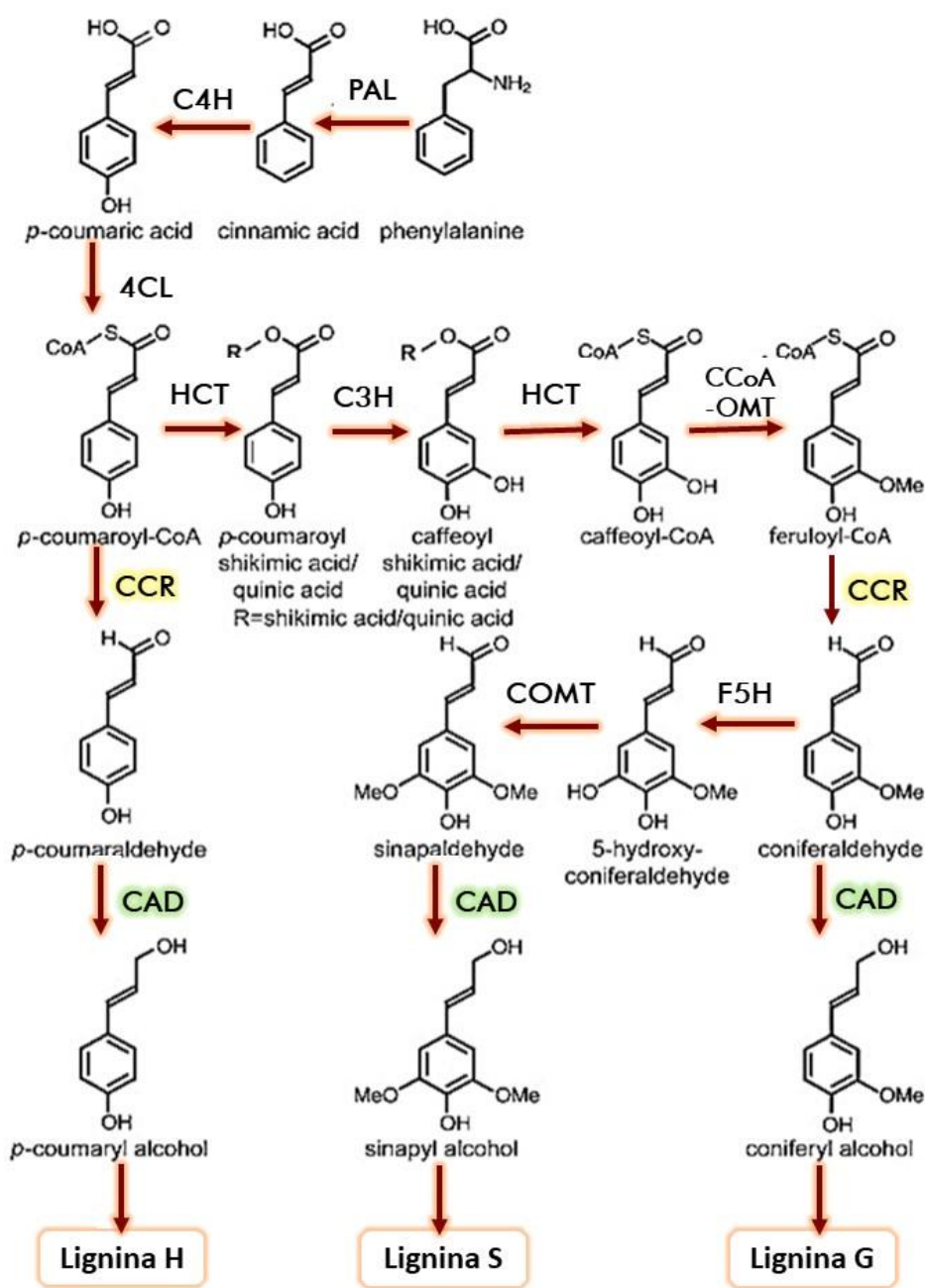


Figura 10. Ruta de biosíntesis de los monómeros esenciales de la lignina. PAL, FENILALANINA AMONIO-LIASA; TAL, TIROSINA AMONIO-LIASA; C4H, CINAMATO 4-HIDROXILASA; 4CL, 4-COUMARATO: CoA LIGASA; HCT, p-HIDROXICINAMICO-CoA: QUINATO/SHIKIMATO p-HIDROXICINAMICO TRANSFERASA; C3H, p-CUMARATO 3-HIDROXILASA; CCoAOMT, CAFEOIL-CoA O-METHILTRANSFERASA; CCR, CINAMOIL-CoA REDUCTASA; F5H,

FERULATO 5-HIDROXILASA; COMT, ÁCIDO CAFEICO O-METHILTRANSFERASA; CAD, CINAMIL ALCOHOL DEHIDROGENASA (Vanholme *et al.*, 2010).

La investigación actual sobre los mecanismos moleculares que controlan la ruta biosintética de lignina se centra principalmente en tres aspectos: primero, los genes estructurales en la ruta del fenilpropanoide, cuyos niveles de expresión afectan la síntesis y el contenido de lignina. Estos genes incluyen *PAL*, *C4H*, *C3H* y *4CL*. Segundo, genes en la ruta sintética específica de lignina, cuya expresión influye mucho en la composición de los monómeros de lignina: *COMT*, *CCoAOMT* y *F5H*. Tercero, los genes en las rutas posteriores de la síntesis de lignina, que son los principales responsables de la reducción de monómeros y afectan en gran medida la síntesis de los monómeros de lignina: *CCR*, *CAD*, y *POD* (Tang *et al.*, 2019).

Diversos estudios han identificado genes clave para la acumulación de lignina en muchas especies de plantas. En *Linum usitatissimum* L. los genes *CCoAOMT*, *4CL*, *COMT* y *F5H* son esenciales para el desarrollo del xilema. En *Fagopyrum esculentum* Moench., *PAL*, *4CL*, *C4H*, *CAD*, *CCoAOMT* y *CCR* son indispensables para la acumulación de lignina en tallos. También se han reportado algunos genes clave como *CCoAOMT*, *COMT*, *4CL*, *CCR*, *CAD*, *PAL*, *C4H*, *C3H*, *4CL1* y *4CL3*, expresándose en xilema y floema (Tang *et al.*, 2019). Asimismo, se ha encontrado que los genes *PAL*, *C4H* y *4CL* juegan papeles importantes en el contenido de lignina tanto en *A. thaliana* L. como en *Populus* spp. (Zhang *et al.*, 2020). Se ha encontrado que el gen *CAD2* se expresa en todas las células lignificantes, incluidos elementos de vasos, fibras de xilema y células de parénquima paratraqueal de los tejidos de xilema en el tallo y raíz floral de *A. thaliana* L. (Baghdady *et al.*, 2006). En *Populus* se ha reportado que los genes *CAD2* y *AldOMT2* son altamente expresados en la maduración de xilema y cambium (Kim *et al.*, 2019), mientras que HCT está involucrado en la producción de monolignoles metoxilados que son precursores de la lignina de las unidades G y S (Zhang *et al.*, 2020). En *Hibiscus cannabinus* L. se ha encontrado que los genes *4CL*, *HCT*, *C3H*, *CCoAOMT*, *CCR*, *F5H*, *COMT* y *CAD* pueden estar directamente involucrados en la biosíntesis de

lignina (Ryu *et al.*, 2015). En *Raphanus sativus* L., la expresión de *Rs4CL5* y *RsF5H* en la hoja, y *Rs4CL5*, *RsCCoAOMT1* y *RsCOMT* en la raíz correlaciona con cambios en el contenido de lignina, lo que sugiere que estos genes podrían ser críticos para la biosíntesis de este biopolímero en *R. sativus* L. (Feng *et al.*, 2017). El gen *CCR* en *A. thaliana* L. se expresa en las flores y hojas además se encuentra altamente expresado en tejidos como los tallos, acorde con su función biológica en la síntesis de lignina y el rol de este compuesto en la dureza de la pared celular en órganos de soporte (Lauvergeat *et al.*, 2001).

El gen *CAD* codifica a la enzima DESHIDROGENASA DE ALCOHOL CINNAMÍLICO (CAD), la cual cataliza la conversión de los aldehídos de cinamilo correspondientes en alcohol de cinamilo. Este es el último paso en la síntesis de monolignoles antes de su polimerización en las paredes celulares (Ma *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2020). Investigaciones recientes han reportado que el silenciamiento del gen *CAD* es una estrategia prometedora para disminuir el contenido de lignina en la biomasa lignocelulósica (Acker *et al.*, 2017). Actualmente, este gen se ha caracterizado en plantas modelo como *A. thaliana* L. y *Populus*, y en otras especies como *Aralia cordata* Thunb., *Nicotiana tabacum* L., *Eucalyptus gunnii* Hook., *Eucalyptus globulus* Labill., *Pino taeda* L., *Medicago sativa* L. y *Fragaria x ananassa* Duch. (Ma *et al.*, 2010). También se han evaluado diferentes isoformas de *CAD* en *Linum usitatissimum*, en el cual se reportó a *LuCAD6* como el más abundante en plántulas y tallos maduros, *LuCAD3* en hojas y *LuCAD4* en tallos (Preisner *et al.*, 2018). En el genoma de *Pyrus bretschneideri* Rehder. se identificaron 31 *CCR* y 26 *CAD* de los cuales se encontró que *PbCAD2* y *PbCCR1* participan en la síntesis de lignina de células del hueso de este fruto (Cheng *et al.*, 2017).

Los genes similares a *CAD* (*CAD*-like genes) pueden existir en múltiples isoformas. Para el caso de gimnospermas, se cree que la enzima *CAD* está codificado por un solo gen y que es altamente específico para la reducción de aldehído de coniferilo y con una actividad catalítica menor hacia el aldehído de sinapilo. Por el contrario, en angiospermas, *CAD* pudiera tener múltiples isoformas que tienen una afinidad

significativa por los aldehídos de coniferilo y sinapilo. En *Arabidopsis* se han identificado nueve homólogos del gen *CAD*, pero solo tres (*AtCAD5*, *AtCAD4* y *AtCAD1*) demostraron ser las principales enzimas involucradas en la biosíntesis de monolignoles (Kim *et al.*, 2004; Sibout *et al.*, 2005).

Para el caso de las monocotiledóneas existen poca información acerca del gen *CAD*. Actualmente, existen estudios sobre *CAD* en diferentes especies como *Oryza sativa* L. y *Sorghum bicolor* L. que han demostrado que *OsCAD2* y *SbCAD2* son genes cruciales en la ruta de la biosíntesis de lignina, respectivamente (Ma *et al.*, 2010). En *Triticum aestivum* L. se encontró que el gen *TaCAD1* es la isoforma de *CAD* predominante y responsable de la síntesis de lignina en el tallo (Ma *et al.*, 2010). En *Saccharum officinarum* L. se encontró que *C3H*, *F5H* y *CAD* favorecen la biosíntesis de unidades S, las cuales confieren rigidez, impermeabilidad y resistencia a la biodegradación de las paredes celulares (Kasirajan *et al.*, 2018). Recientemente, a partir de un análisis de ortología se encontraron 7 genes *CAD* ortólogos expresados en dos especies de Agave; *A. tequilana* Weber y *A. deserti* Engelm (Maceda-López, 2020).

De acuerdo a análisis filogenéticos se conoce que los genes *CAD* se dividen en tres clases: Clase I, II y III (Guo *et al.*, 2010; Tang *et al.*, 2014; Park *et al.*, 2018). La clase I comprende los *CAD bona fide*, para lo cual, el estudio de Maceda-López, 2020 se encontró a los genes *AqCAD5* de *A. tequilana* Weber y *AdCAD5* de *A. deserti*. Por lo que comprende a lo previamente reportado, que, aunque las familias de genes *CAD* pueden ser multigénicas, solo uno o dos genes se agrupan en la clase I. También se ha demostrado que los miembros *CAD* de la clase I participan en la acumulación de lignina en la pared celular secundaria durante el crecimiento y desarrollo de las plantas (Guo *et al.*, 2010; Tang *et al.*, 2014; Park *et al.*, 2018).

Por otra parte, en la clase II se reportó que se agrupan el resto de los genes encontrados de *AqCAD* y *AdCAD* a excepción de *AqCAD1*, *AqCAD7*, *AdCAD1* y *AdCAD7*. Los *CAD* incluidos en este grupo como *TaCAD1* de trigo, *OsCAD3*, 5, 6,

7, 8A, 8B, 8C, 8D y 9 de arroz, *AtCAD2*, 3, 7 y 8 de *A. thaliana* L., y *SbCAD4* de *S. bicolor* L. ha demostrado que codifica para proteínas CAD catalíticamente activas (Kim *et al.*, 2004; Sattler *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2018). La clase III es un pequeño grupo de *CAD*, incluidos *OsCAD1* y 4, *ZmCAD2* y *AtCAD1* (Guo *et al.*, 2010; Park *et al.*, 2018). En el caso de agave se encontró que *AqCAD1*, *AqCAD7*, *AdCAD1* y *AdCAD7* se encuentran en esta clase.

2.5 Proceso de lignificación de tejidos vegetales

Las células vegetales están delimitadas por paredes que definen las formas de las células, tejidos, órganos y, en última instancia, toda la estructura de la planta. Las paredes celulares se clasifican en primaria y secundaria. Las paredes primarias están compuestas de celulosa, hemicelulosa y pectinas, y se forman en la célula durante la citocinesis, depositándose continuamente alrededor de las células en donde se modifican durante la expansión celular, y son ubicuas en todos los tipos de células. Las paredes secundarias se depositan después de la expansión celular en algunos tipos de células especializadas, como las traqueidas, los vasos; también se forman en las fibras y las esclereidas, ambas denominadas colectivamente esclerénquima (Figura 2). Las paredes celulares secundarias, en contraste con las primarias, están compuestas principalmente de celulosa, hemicelulosas y lignina, con una menor cantidad de proteínas estructurales y enzimas. La composición de las paredes secundarias varía de acuerdo a las especies de plantas y diferentes tipos de células (Zhong *et al.*, 2019).

La lignificación de la pared celular secundaria puede ocurrir durante la diferenciación de distintos tipos de células. Se ha reportado que las paredes secundarias lignificadas sólo están presentes en las plantas vasculares, incluidas las plantas vasculares sin semillas, las gimnospermas y las angiospermas. Algunos ejemplos de tejidos especializados que sintetizan pared celular secundaria son: las fibras extraxilares en los tallos, fibras de xilema, vainas de semillas, endodermis de las raíces, endotelio de anteras, fibras (tricomas) de algodón, semillas, esclereidas en hojas y capas de semillas de algunas especies (Meents *et al.*, 2018; Crang *et al.*,

2018). En la Figura 11 se muestra el papel que tiene la lignina en diferentes células de plantas superiores: como barrera de transporte, en transporte de agua y nutrientes, para soporte mecánico, para protección y dispersión de semillas, y como respuesta a factores bióticos y abióticos.

A medida que las células sintetizan la pared secundaria toda la maquinaria biosintética de la pared celular cambia en respuesta a las cascadas transcriptómicas, como es el caso de las traqueidas, fibras o vasos. Brevemente, los sucesos por los que pasa la célula durante la síntesis de la pared secundaria son: la transición de pared primaria a pared secundaria, la síntesis de pared secundaria predominada por la producción de polisacáridos, la maduración de pared secundaria predominada por la lignificación y frecuentemente, la muerte celular programada (Meents *et al.*, 2018). Se sabe que, en diferentes tejidos lignificados, el último paso de la síntesis de la pared celular secundaria es el depósito de lignina. (Barros *et al.*, 2015; Meents *et al.*, 2018; Zhong *et al.*, 2019).

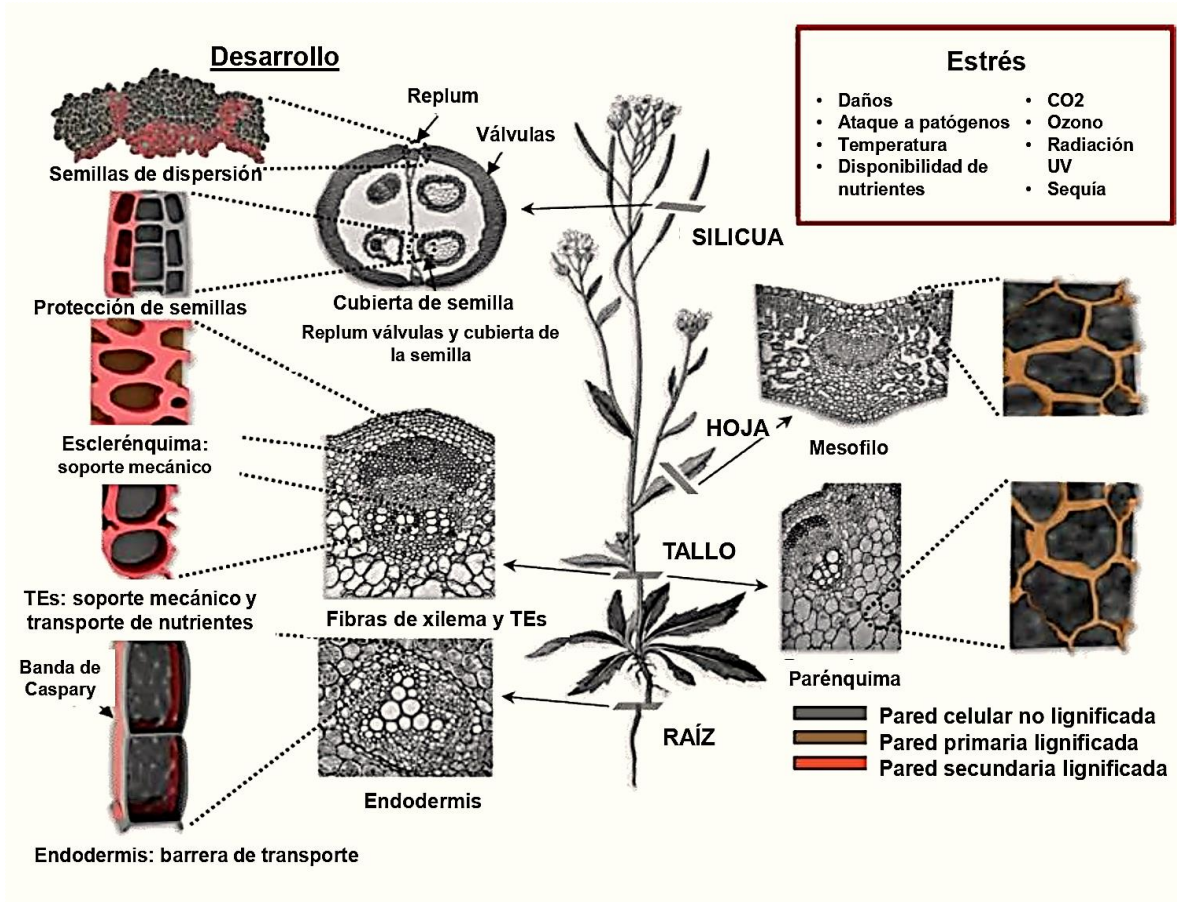


Figura 11. Esquema de los diferentes tipos de células lignificadas en plantas superiores (Barros *et al.*, 2015).

2.5.1 El papel de la lignina durante la formación del tejido de xilema

El sistema vascular, xilema y floema, de las plantas tiene dos funciones principales: distribuir agua, fotosintatos y moléculas bioactivas (proteínas, mRNAs, RNAs no codificantes) a lo largo de la planta, y dar resistencia mecánica a sus órganos. El tejido de xilema está conformado por vasos que están compuestos de elementos traqueales apilados, que básicamente son células muertas y huecas con paredes celulares secundarias lignificadas. El desarrollo de los elementos traqueales son el resultado de la diferenciación de las células del procambium y cambium y se programan a la muerte celular para convertirse en funcionales *post-mortem*. Muchos de los estudios reportados sobre xilogénesis fueron obtenidos a partir de la planta

Zinnia elegans L. y *Arabidopsis thaliana* L., como es la señalización hormonal y bioquímica, las rutas metabólicas y los factores moleculares y genéticos de la regulación de la diferenciación de los vasos de xilema (Iakimova *et al.*, 2017).

Actualmente se sabe que la diferenciación de elementos traqueales ocurre a partir de varias etapas, que van desde la deposición de polisacáridos en la pared celular secundaria (en su mayoría celulosa y xilano), la muerte celular programada autónoma y que finalmente concluye con la lignificación *post-mortem*, la cual refuerza las paredes laterales compuestas principalmente de monómeros G de lignina y con la autólisis del contenido celular (Barros *et al.*, 2015; Iakimova *et al.*, 2017).

2.5.2 Teoría cooperativa de la lignificación

La deposición de lignina en los tejidos primarios está restringida a los engrosamientos de la pared celular secundaria y se encuentra ausente en las paredes celulares primarias de los elementos traqueales (ET) de plantas como *Zinnia elegans* L., *A. thaliana* L. y *Coleus blumei* L. En contraste, en los tejidos secundarios la acumulación de lignina se presenta tanto en las paredes celulares secundarias como en primarias. Se ha descrito que la lignificación de los ET comienza en la esquina de la lámina media de la célula y continúa gradualmente a través de las capas de la pared celular secundaria (Barros *et al.*, 2015).

Se ha demostrado en *A. thaliana* L. y *Z. elegans* L. que el proceso de lignificación de las paredes secundarias de los ET ocurre *post-mortem*. En cultivos celulares de *Z. elegans* L., la lignificación *post-mortem* de los ET se lleva a cabo a través de una interacción celular directa con células vecinas que proporcionan tanto monómeros de lignina como especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) a los ET muertos. Se cree que los mecanismos que permiten a las células vecinas exportar monolignoles a los ET podrían explicarse, en parte, a la existencia de transportadores activos. Por otro lado, la producción de ROS depende directamente de la enzima NADPH oxidasa localizada en la membrana plasmática que exporta

activamente superóxido al apoplasto de los ET. Este superóxido es dismutado por la enzima superóxido dismutasa apoplástica en oxígeno y peróxido de hidrógeno. Después de esto, las fenoloxidasas (lacasas dependientes de O_2 y peroxidadas dependientes de H_2O_2) usan sustratos proporcionados por las células vecinas para polimerizar la lignina en las paredes celulares secundarias de los ET muertos. Se hipotetiza también que los mecanismos que controlan la interacción de los ET con sus células vecinas para que inicie la lignificación dependen de genes que responden a la progresión de la muerte programada de los elementos traqueales (Ménard *et al.*, 2015; Serk *et al.*, 2015; Smith *et al.*, 2017).

En la Figura 12 se ilustran los diferentes niveles de lignificación cooperativa y autónoma de algunos tipos de células que han sido estudiadas como los ETs, fibras de xilema y células endodérmicas (Barros *et al.*, 2015). En la Figura 12A se observan las distintas etapas de la formación de los elementos traqueales y el proceso de lignificación *post-mortem* través de las células de la periferia del parénquima y que proporcionan monolignoles, lacasas/peroxidadas (LAC/PRX) y O_2/H_2O_2 sintetizadas por las enzimas NADPH oxidasa y superóxido dismutasa (SOD). También se puede observar cómo los ETs pueden sintetizar monolignoles e incorporar las enzimas LAC/PRX en la pared celular secundaria antes de la muerte celular programada. Por otro lado, en la Figura 12B se muestra la diferenciación y lignificación cooperativa parcial de las fibras de xilema, donde se muestra que los monolignoles, las enzimas lacasas/peroxidadas y ROS son sintetizadas conjuntamente por fibras de xilema y células parenquimatosas cercanas para la deposición de lignina en las fibras de xilema. Por último, en la Figura 12C, se describe como ocurre la lignificación autónoma en células endodérmicas durante la formación de la banda de Caspary, se muestra la formación del dominio de la banda de Caspary por las proteínas CASP (proteínas del dominio de la membrana de la tira de Caspary) y la localización de ESB1 (Enhancer de suberina 1) en la zona de la banda de Caspary. Posteriormente, H_2O_2 (producido por NADPH oxidasa y SOD), los monolignoles (exportados por transportadores ABCG) y PRX se suministran a la zona de la banda de Caspary (Barros *et al.*, 2015).

Previo a la actividad de las enzimas encargadas de la polimerización de las subunidades de lignina, se ha reportado que existen expresión preferencial en los tejidos lignificados (xilema o endodermis) o adyacentes a éstos (parénquima) de los genes biosintéticos para lignina (Pesquet *et al.*, 2013; Schuetz *et al.*, 2014; Serk *et al.*, 2015; Barros *et al.*, 2015). En la Figura 13, Barros *et al.*, 2015 resume en su tabla la cantidad de reportes que indican que los genes que conducen a la formación de monolignoles son preferencialmente expresados en ETs, parénquima del xilema (XPs), parénquima de los rayos (RPs), y fibras xilares (Xfs) en al menos 3 modelos vegetales: *A. thaliana* L., *Brachypodium pinnatum* L. y *Populus* spp. Estas afirmaciones provienen en parte de los análisis de expresión mediante fusiones de promotor o de proteína de genes, donde los resultados muestran, por ejemplo, la expresión génica de C4H en células parenquimatosas a los ETs (Figura 13, paneles izquierdos), o localizan a las proteínas C4H y CCR1 entre los engrosamientos del ETs de *A. thaliana* L. (Schuetz *et al.*, 2014).

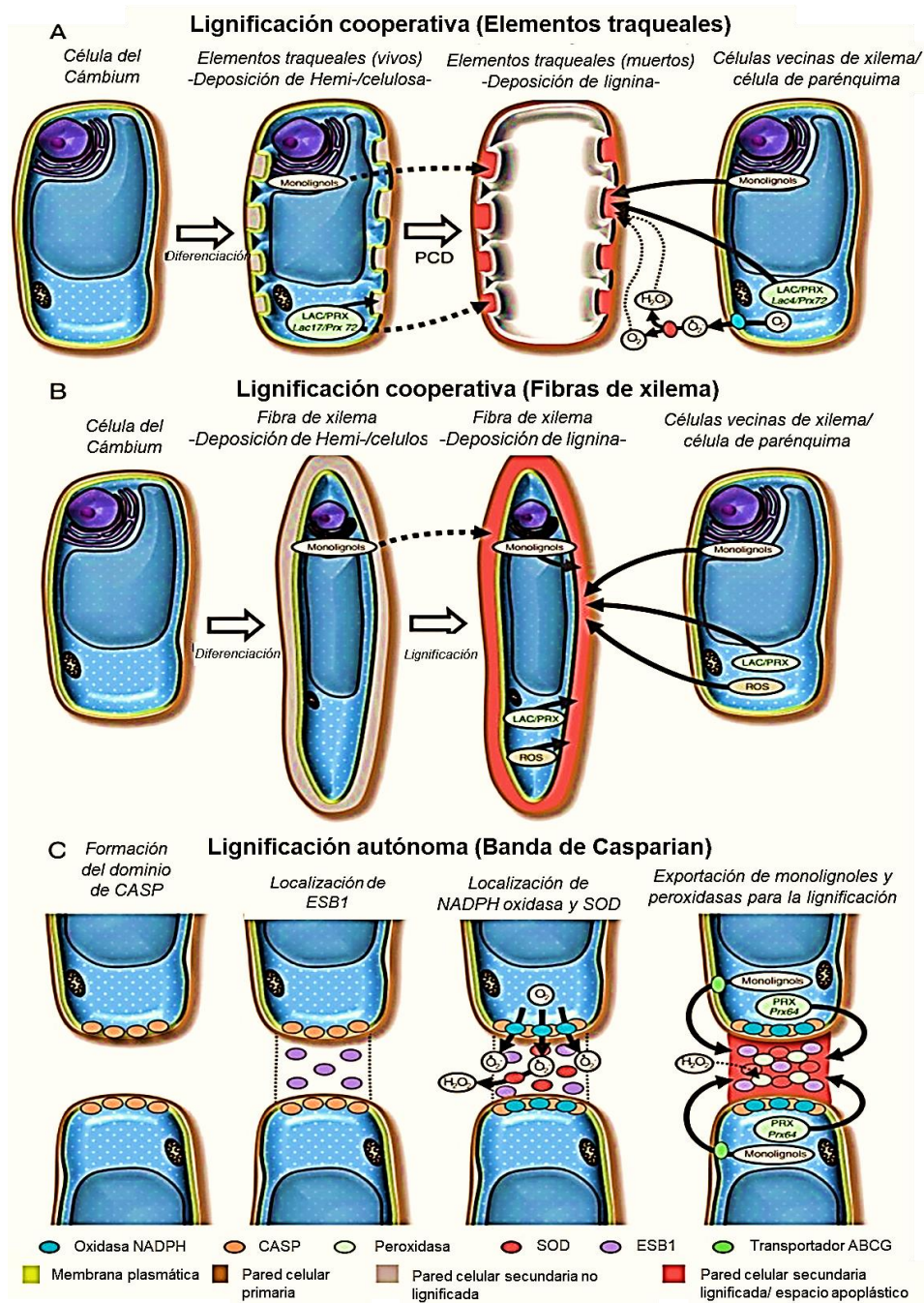


Figura 12. Diferentes niveles de lignificación cooperativa y autónoma dependiendo de los tipos de células estudiadas: elementos traqueales de xilema, fibras de xilema y células endodérmicas (Barros *et al.*, 2015).

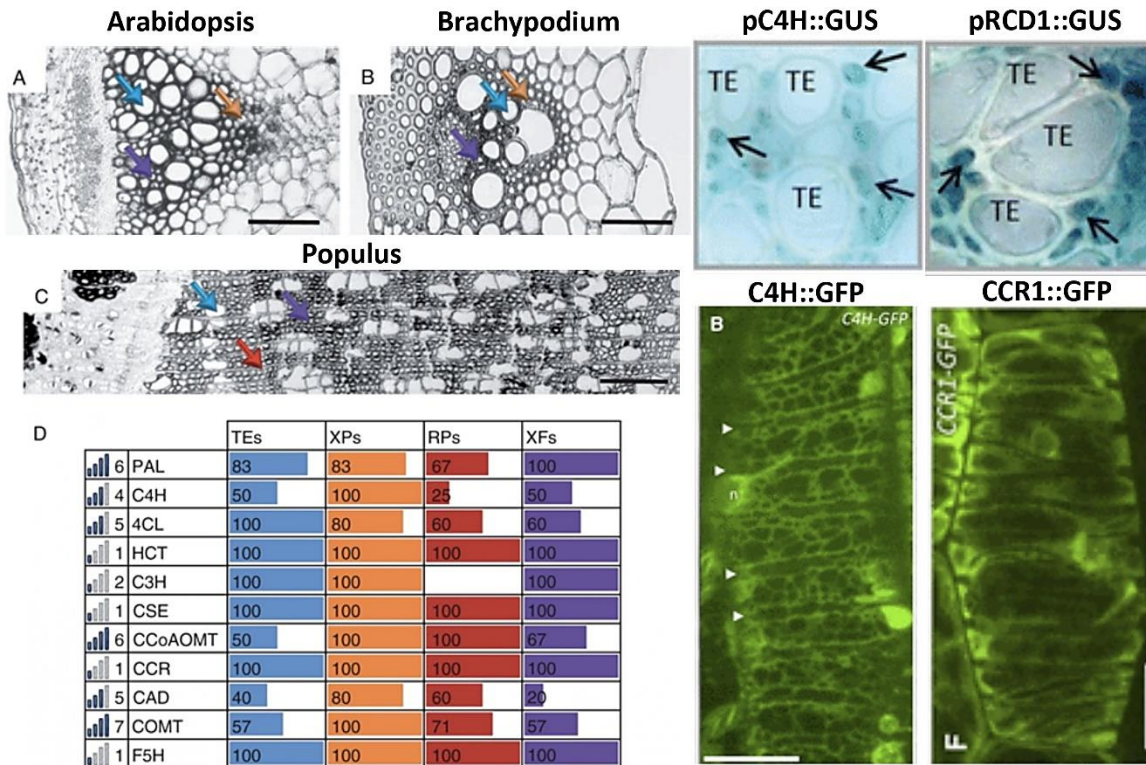


Figura 13. Los genes relacionados con el metabolismo de lignina son expresados preferencialmente en células vecinas o en las células en lignificación en *Arabidopsis thaliana* L. De lado izquierdo, parte superior y media, se ilustran esquemas cortes histológicos transversales de *A. thaliana* L., *Brachypodium pinnatum* L. y *Populus* spp. Las flechas indican los siguientes tejidos: flecha azul, elementos traqueales (TE); flecha naranja, parénquima del xilema (XPs); flecha roja, parénquima de los rayos (RPs); y flecha morada, fibras xilares (Xfs). En la parte inferior, la tabla muestra el porcentaje de estudios apoyando la expresión de los genes biosintéticos para lignina (Barros *et al.*, 2015). De lado derecho, parte superior, se muestran la actividad del promotor de los genes C4H y RCD1, mediante fusiones transcripcionales al reportero GUS, alrededor de TEs (Serk *et al.*, 2015). En la parte inferior, se observa la localización de las proteínas C4H y CCR1 entre los engrosamientos del TE (Schuetz *et al.*, 2014).

III. JUSTIFICACIÓN

Las fibras naturales vegetales constituyen una alternativa a los polímeros sintéticos y han demostrado su utilidad en la industria de termoplásticos y materiales de refuerzo. Las fibras vegetales anatómicamente están integradas por células de esclerénquima, tejido del cual se conoce su composición, pero no los mecanismos moleculares que controlan su diferenciación, desarrollo y deposición de componentes mayoritarios que integran sus paredes celulares (carbohidratos y lignina).

Agave fourcroydes Lem. es una planta con hojas ricas en fibras, de fácil extracción, tradicionalmente usadas en la elaboración de diversos artefactos y recientemente esta planta ha despertado un gran interés en la industria de polímeros. Por lo anterior, sus características morfológicas, composición y mecánica de sus fibras han sido ampliamente estudiadas; sin embargo, la ontogenia, los eventos de desarrollo y genes biosintéticos y reguladores involucrados en su formación son desconocidos.

El análisis de acumulación de celulosa y lignina en fibras de hoja de *A. fourcroydes* Lem. en 3 etapas diferentes de desarrollo nos dará un breve panorama de la composición química de las fibras y sus cambios de composición a lo largo del desarrollo de la planta. Los estudios histológicos de las fibras en 4 diferentes etapas de desarrollo, nos sugieren información de la ontogenia de las fibras en *A. fourcroydes* Lem. así mismo, se conoce la morfología de los diferentes tipos de fibras. Por último, el análisis de expresión por qRT-PCR de genes involucrados en la biosíntesis de celulosa y lignina en hoja y tejido adyacente a fibra, así como en diferentes tejidos de *A. fourcroydes* Lem. nos muestra información de los genes biosintéticos.

Explorar el desarrollo de las fibras de *A. fourcroydes* Lem. y conocer los genes biosintéticos involucrados en la síntesis de los compuestos lignocelulósicos que las conforman, podría ser una forma interesante de controlar y/u optimizar el

rendimiento de las fibras y, en mayor medida, los productos a base de este tipo de fibra.

IV. HIPÓTESIS

Debido al papel estructural y mecánico que tienen los compuestos lignocelulósicos en la composición de las fibras de *Agave fourcroydes* Lem, la acumulación de estos compuestos correlacionará con el desarrollo de las hojas. Este fenómeno estará asociado con cambios en la expresión de los genes biosintéticos involucrados en la formación de celulosa y lignina.

V. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

- Analizar el proceso de acumulación de compuestos lignocelulósicos en fibras de las hojas de *Agave fourcroydes* Lem en diferentes etapas de desarrollo de la planta.

5.2 Objetivos particulares

- Obtener los perfiles de acumulación de celulosa y lignina en fibras de hoja de *Agave fourcroydes* Lem. durante las primeras etapas del desarrollo de las hojas.
- Analizar los patrones de acumulación de celulosa y lignina en las fibras de esclerenquima durante diferentes etapas de crecimiento en *Agave fourcroydes* Lem.
- Analizar los perfiles de expresión de genes involucrados en la biosíntesis de celulosa y lignina en hojas de *Agave fourcroydes* Lem.

VI. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Para la realización de este trabajo se planteó la estrategia experimental que se ilustra en la Figura 14. Para el cumplimiento del objetivo general, las actividades fueron agrupadas de acuerdo con los 3 objetivos específicos planteados.

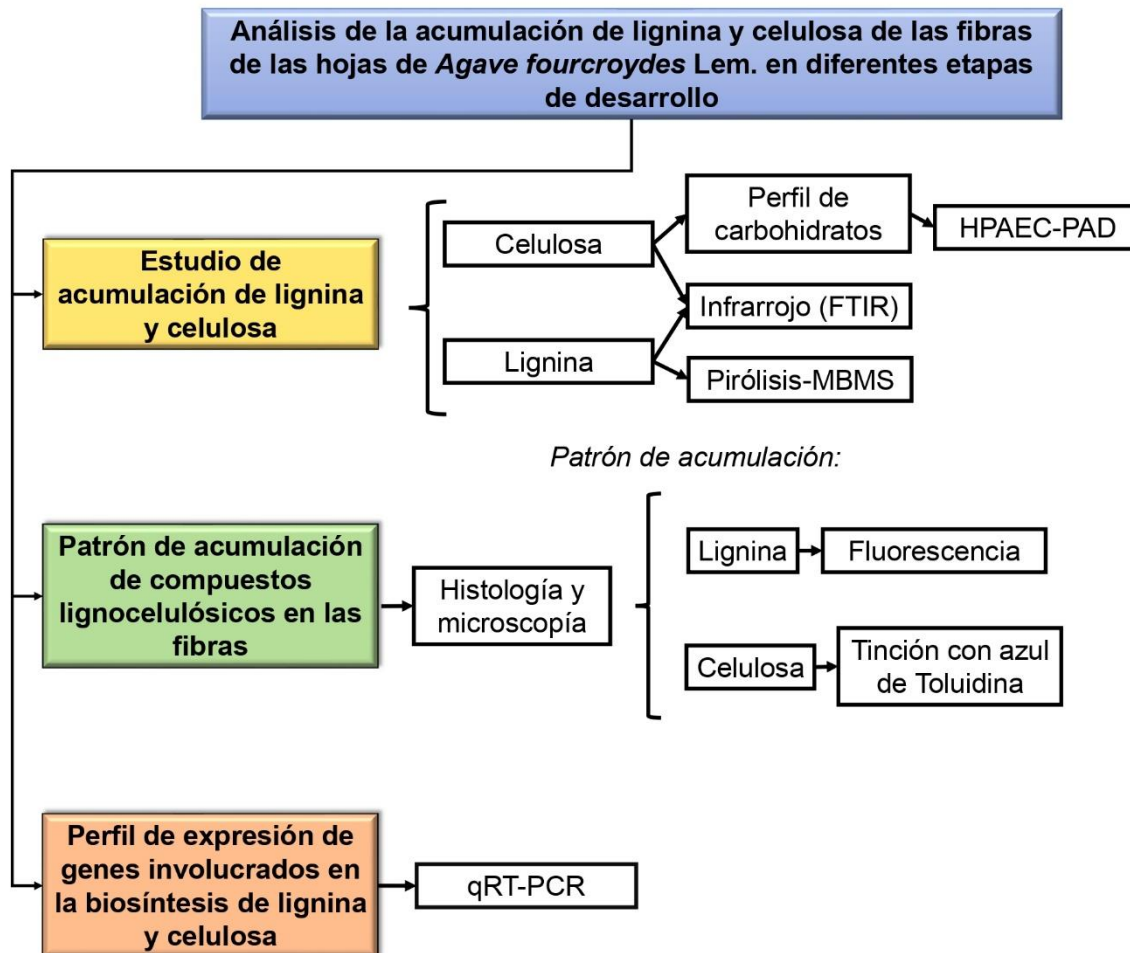


Figura 14. Estrategia experimental de trabajo para el cumplimiento del objetivo general.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Colecta de material vegetal para perfilado de monosacáridos y análisis histológicos

Para cuantificar la acumulación de celulosa y lignina y realizar los análisis histológicos de fibras en *A. fourcroydes* Lem. durante diferentes etapas de desarrollo, se realizaron dos colectas de bulbilos en San Pedro Cholul ubicado en el estado de Yucatán, México (21°01'43"N, 89°33'28"W), y una colecta de hijuelos y plantas adultas de *A. fourcroydes* Lem. en la Hacienda Santa Teresa, Yucatán, México (21°13'53.8"N 89°15'22.5"W) (Figura 15A y B). Cabe mencionar que ambas colectas de bulbilos fueron realizadas con un año de diferencia. Para el crecimiento de los bulbilos colectados, éstos se colocaron en recipientes con agua para inducir la raíz como se muestra en la Figura 15D; posteriormente, se plantaron en macetas con tierra (Figura 15E) donde se mantuvieron hasta el muestreo. Los hijuelos y plantas adultas fueron procesadas inmediatamente después de la colecta.

Para el análisis de carbohidratos y lignina del material colectado se establecieron arbitrariamente cuatro diferentes etapas de desarrollo de los bulbilos, tomando como único parámetro la altura del bulbito. En la Figura 16 se muestran los datos morfométricos tomados de los bulbilos (A y B), hijuelos y plantas adultas (C, D y E) utilizadas.

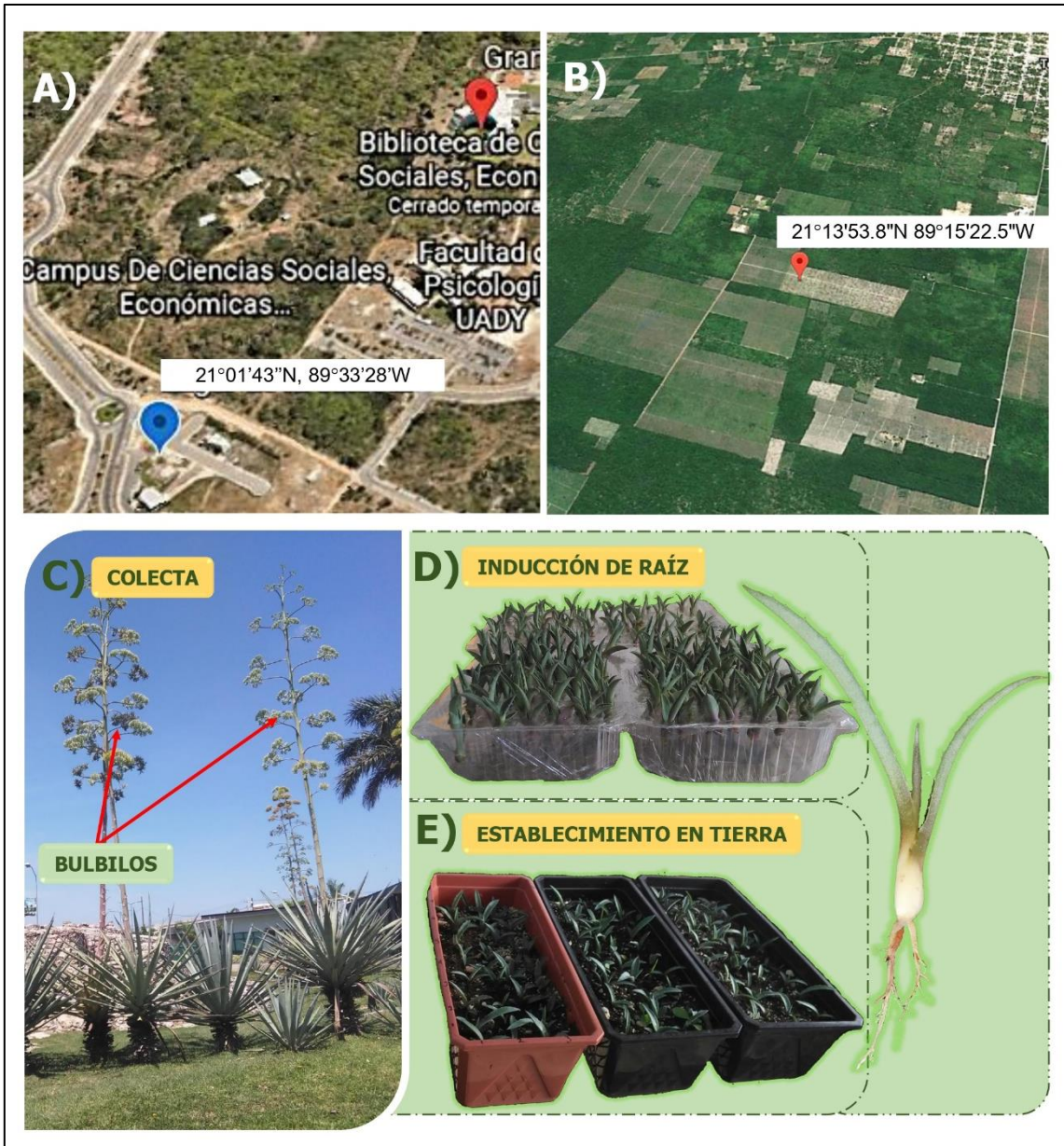


Figura 15. Colecta y preparación de material vegetal. A) Georreferenciación de la colecta de bulbilos de *A. fourcroydes* Lem. B) Georreferenciación de la colecta de hijuelos y plantas adultas de *A. fourcroydes* Lem. C) Plantas adultas de *A. fourcroydes* Lem. en etapa de desarrollo vegetativo de aproximadamente 2 metros de altura. D) Inducción de raíces a los bulbilos colectados. E) Establecimiento de los bulbilos en tierra (A y B imágenes tomadas de Google Earth, 2020).

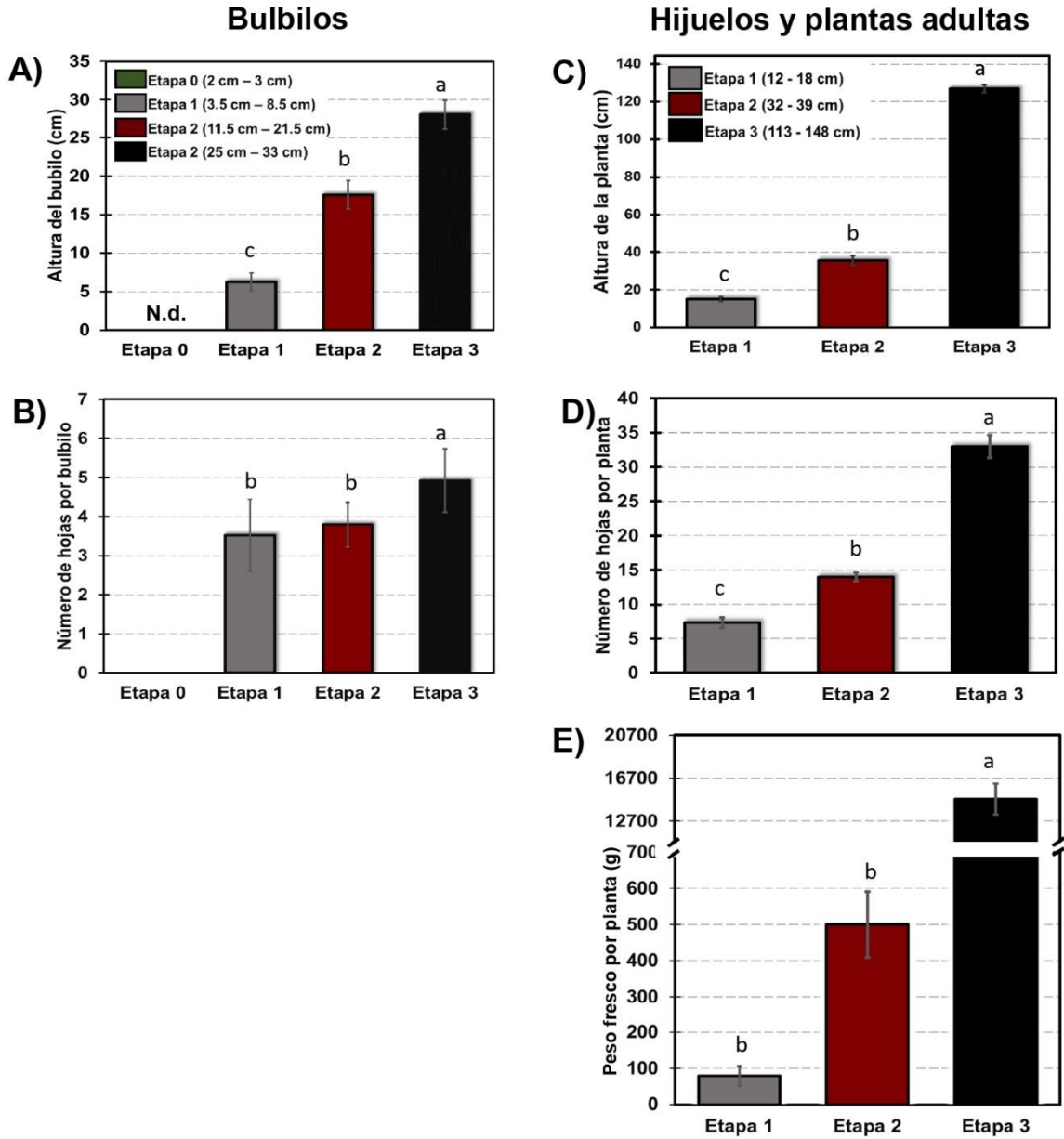


Figura 16. Gráficas de los datos morfométricos de las plantas analizadas. A y B; altura promedio y número de hojas de bulbilos de *A. fourcroydes* Lem. C, D y E; altura promedio, número de hojas por planta y peso fresco de hijuelos y plantas adultas de *A. fourcroydes* Lem. N.d. No determinado. Las medias con la misma letra no son estadísticamente diferentes (Tukey, $\alpha = 0.05$).

7.2 Análisis de acumulación de compuestos lignocelulósicos en fibra y tejido parenquimatoso de hoja de *A. fourcroydes* Lem.

7.2.1 Fraccionamiento de hojas

Para realizar el perfil de acumulación de celulosa, hemicelulosa y lignina se seleccionaron 25 bulbilos por cada etapa establecida (Figura 16A) y se tomaron dos hojas completamente extendidas de cada bulbillo. Posteriormente, se congelaron con nitrógeno líquido, se liofilizaron y pulverizaron. Por último, se tamizaron las muestras para separar las fibras del resto del resto del tejido (tejido parenquimatoso). Ambas partes (tejido y fibras) fueron analizados por separados. En este análisis la etapa 0 no fue considerada debido al escaso material vegetal disponible y la imposibilidad técnica de separar manualmente fibras de hojas de este tamaño de plantas (Cuadro 6 y 7).

7.2.2 Cuantificación de celulosa mediante perfilado de monosacáridos

Para la estimación de celulosa y de algunos compuestos de hemicelulosa en fibra y tejido parenquimatoso de hoja de *A. fourcroydes* Lem. en tres diferentes etapas de desarrollo de la planta (E1-E3), se realizó un perfil de monosacáridos utilizando la técnica analítica de cromatografía de intercambio aniónico de alto rendimiento con detección amperométrica pulsada (HPAEC-PAD). Previo al perfil de monosacáridos las muestras fueron procesadas con los siguientes tratamientos: a) Extracción de paredes celulares, b) remoción de almidón y c) hidrólisis ácida de polisacáridos. Los protocolos de los tratamientos antes mencionados (Morais de Carvalho *et al.*, 2017) y entrenamiento fueron recibidos en el laboratorio de Glicociencia del Dr. Francisco Javier Vilaplana Domingo, del Real Instituto de Tecnología (KTH) en Estocolmo, Suecia. Las cuantificaciones posteriores se realizaron en el laboratorio de Química de productos naturales a cargo de la Dra. Mercedes López Pérez, de la Unidad de Biotecnología de Cinvestav-Unidad Irapuato.

7.2.2.1 Extracción de paredes celulares

Para obtener paredes celulares en los 2 tipos de fracciones de hojas, se colocaron 100 a 200 mg de muestra en tubos tipo Falcon® de 15 mL, se agregaron 5 mL de una solución de cloroformo-metanol 2:1 (Cloroformo; Fisher chemicals y metanol; BDH chemicals VWR) a cada muestra, y se dejó en agitación constante durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 4000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente y se retiró la solución cloroformo-metanol. Se realizaron cuatro lavados con etanol a las siguientes concentraciones: 70 % (dos veces), 80 % y 96 %. En cada lavado se añadieron 10 mL de etanol a cada muestra y la muestra se dejó en agitación durante 1 h a temperatura ambiente, luego se centrifugó a 4000 rpm por 5 minutos y se retiró el etanol. Por último, se añadió 5 mL de acetona, se agitó manualmente y se centrifugaron a 4000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente, y las muestras se dejaron secar al aire durante 12 h.

7.2.2.2 Remoción de almidón de las paredes celulares

Para esto se añadieron 9.5 mL de una solución de α -amilasa (13 u/gramo de muestra) (1, 4- α -D-Glucan glucanohydrolyse EC 3.2.1.1 de *Aspergillus oryzae*. Sigma, A-0273), en un buffer de fosfato de sodio a 50 mM, pH 7 a cada muestra y se incubó a 37° C con una agitación constante de 200 rpm durante de 4 h. Después, se añadieron 0.5 mL más de la misma solución buffer-enzima y se dejaron incubar a 37 °C toda la noche. Las muestras se centrifugaron durante 30 minutos a 4000 rpm a temperatura ambiente y entonces se decantó el sobrenadante. Se realizó un lavado con etanol frío al 96 % añadiendo 10 mL a cada muestra, se agitó manualmente durante 1 minuto y después se centrifugó por 10 minutos a 4000 rpm a temperatura ambiente y se eliminó el sobrenadante. Por último, las muestras se secaron en un horno a 60 ° C durante 2 h.

7.2.2.3 Hidrólisis ácida de polisacáridos

En tubos de vidrio de 15 mL con tapa se añadieron de 3 a 4 mg de muestra de fibra o tejido parenquimatoso de hoja. Posteriormente, en una campana de extracción, se añadieron 250 μ L de ácido sulfúrico al 72 % (Karal®, lote 1641) a cada muestra, se agitaron cuidadosamente hasta que las muestras se humedecieron completamente con el ácido. Las muestras se dejaron incubando a temperatura ambiente durante 3 h con una agitación manual constante. Después de 3 h de incubación, se añadieron 1400 μ L de agua ultrapura a cada muestra, homogenizando bien y nuevamente se incubaron por 3 horas a una temperatura de 100 °C utilizando un termo-block. Finalizando el tiempo de la hidrólisis, las muestras se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Se realizaron diluciones 1:20 de cada hidrolizado de muestra utilizando agua ultrapura. Se tomó 1 mL de cada dilución y se filtró utilizando filtros Whatman™, PuraDisc de 4 mm colocando el filtrado en viales. Finalmente, las muestras fueron inyectadas en un cromatógrafo de iones Dionex ICS-3000 (Dionex, Sunnyvale, CA) con una columna Dionex CarboPac™ PA-200, BioLC™ (3 mm x 50 mm), Lote 01531038.

7.3 Cuantificación de lignina

Para la cuantificación de lignina se utilizaron 2 estrategias: espectroscopía de infrarrojo media y pirolisis-cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. A continuación, se describe cada una de estas metodologías.

7.3.1 Espectroscopía infrarroja de fibras y tejido parenquimatoso de *A. fourcroydes* en tres diferentes etapas de desarrollo

Para obtener una primera aproximación de los niveles de lignina en las muestras colectadas se utilizó espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR), en el laboratorio de Química de productos naturales (Cinvestav-Unidad Irapuato). La técnica de FTIR puede ser utilizada para obtener información de la estructura molecular y enlace químicos de un compuesto. Los espectros se registraron

utilizando un espectrómetro Cary 660 FTIR (Agilents technologies®). Se analizó fibras y tejido parenquimatoso de tres etapas (E1-E3). establecidas de desarrollo de *A. fourcroydes* Lem. Se removieron las paredes celulares y el almidón utilizando los métodos previamente descritos (7.2.2.1 y 7.2.2.2). Las muestras se analizaron en forma sólida, realizando 32 escaneos en el rango de 4000 y 650 cm^{-1} con una resolución nominal de 4 cm^{-1} en modo transmitancia (T %). Se tomaron tres medidas replicadas de cada muestra. Las recolecciones de datos espectrales se realizaron con el software Agilent resolution Pro. Las tres réplicas de cada etapa fueron promediadas utilizando el software Spectragryph v1.2.13.

7.3.2 Cuantificación de lignina por py-MBMS

La cuantificación de la concentración de lignina total y de unidades de monolignoles en las muestras de fibras y tejido parenquimatoso de *A. fourcroydes* Lem. (previamente procesadas con los tratamientos mencionados en los apartados 7.2.2.1 y 7.2.2.2) fue realizado por servicio en el Complex Carbohydrate Research Center, University of Athensm usando pirolisis-cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry (py-MBMS). La metodología empleada fue la siguiente: las muestras se tamizaron a través un tamiz de 1 mm y luego se pesaron de 1 a 3 mg de muestra, cada muestra fue analizada por duplicado. Posteriormente, se realizó una pirolisis en un solo disparo (Frontier Lab) a 500 °C para producir compuestos volátiles. Los compuestos volátiles se analizaron para identificar la lignina usando un espectrómetro de masas de haz molecular (Extrel Core Mass Spectrometers). Los datos crudos obtenidos se procesaron utilizando el software UnscramblerX 10.1 para obtener los componentes principales y los datos de lignina. También, los estándares NIST 8492 (contenido de lignina, 26,2%) y Aspen se pirolizaron y analizaron de la misma manera y en el mismo lote que las muestras. Ambos estándares se utilizaron para el control de calidad de los datos. Todo el proceso de cuantificación de lignina se hizo por duplicado, obteniendo al final 4 lecturas por cada muestra.

7.4 Análisis histológico del desarrollo de las fibras en hojas

7.4.1 Colecta de material y fijación química

El desarrollo de las fibras en hojas solo se analizó en bulbilos. Para esto se consideraron las 4 etapas de desarrollo de los bulbilos (E0 - E4) (Figura 16). Se utilizaron tres bulbillos representativos de cada etapa establecida y por cada bulbito se tomaron dos hojas; luego cada hoja fue dividida de manera transversal en tres secciones; parte alta (A), parte media (B) y parte baja (C) como se observa en la Figura 17. Posteriormente, las secciones se cortaron en fragmentos más pequeños (5 mm x 5 mm, aproximadamente), y se seleccionó aquel del centro de la sección. Todas las muestras se colocaron en tubos tipo Falcon™ de 50 mL con una solución fijadora de paraformaldeído 4% (Sigma-Aldrich, Cat. 1581127-500G, Lot. SZBG1340V) disuelto en buffer salino PBS (Phosphate-Buffered-Saline) al 1 X y se almacenaron a 4 °C durante ocho semanas, cambiando el fijador cada 15 días.

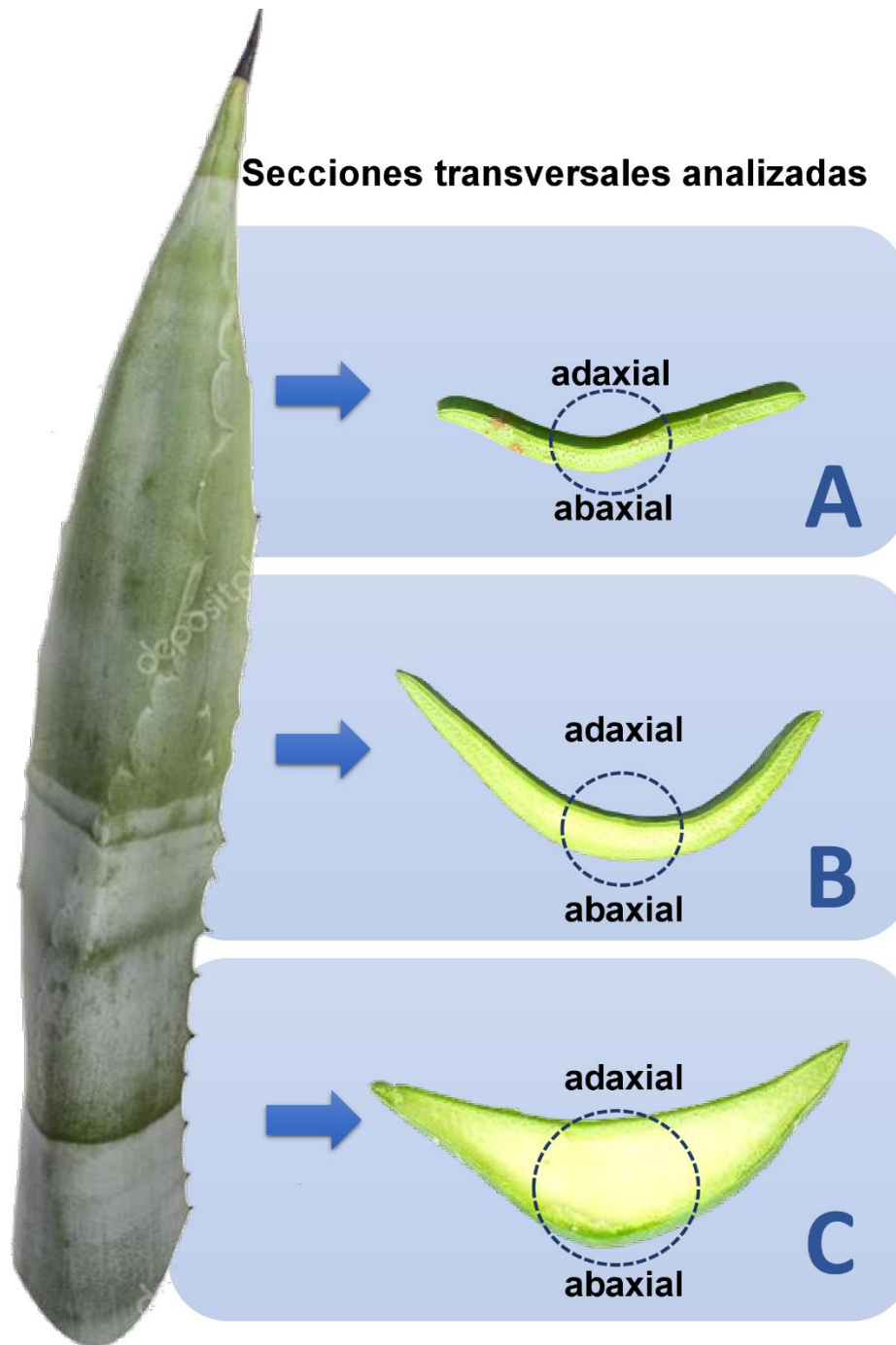


Figura 17. Secciones representativas de hoja de *A. fourcroydes* Lem utilizadas para el análisis histológico del desarrollo de fibras.

7.4.2 Deshidratación del tejido vegetal

Para remover el agua del tejido vegetal se deshidrató en series de etanol incrementando de forma gradual la concentración como se muestra a continuación: etanol 30 %, etanol 50 %, etanol 70 %, etanol 85 %, etanol 96 %, etanol 100 %. Cada paso de deshidratación en etanol fue por 2 h y realizado dos veces. Después las muestras se transfirieron a una mezcla etanol/resina líquida JB-4® (Embedding kit, polysciences, Inc. Lot. 692810) en proporción 1:1, por 72 h.

7.4.3 Inclusión en resina JB-4 y obtención de cortes histológicos

Las muestras deshidratadas y parcialmente infiltradas con resina se colocaron en resina líquida JB-4® durante 4 semanas a una temperatura de 4 °C. Posteriormente, los tejidos se colocaron orientados en forma transversal con respecto a la base del molde y fueron rellenados con una solución de resina JB-4 preparada de acuerdo a las especificaciones del fabricante; luego, se dejaron polimerizar durante 3 días a temperatura ambiente. Por último, se realizaron cortes transversales respecto al eje vertical de la hoja, con un grosor de 5 a 8 micras utilizando un microtomo Leica RM2255. Los cortes se fijaron en portaobjetos sobre una plancha a 45 °C durante 1 minuto.

7.4.4 Análisis de las secciones histológicas transversales de hojas de *A. fourcroydes*

Para el análisis de formación de las fibras de hoja de *A. fourcroydes* Lem. en las cuatro etapas de desarrollo, se tomaron fotografías de los haces de fibras y tejido de esclerénquima ubicados en la periferia (parte adaxial y abaxial de la hoja) y en la parte central de *A. fourcroydes* Lem., como lo reporta de Andrade *et al.* (2008). Los cortes fueron analizados con un microscopio Zeiss M2 Axio Imager equipado con una cámara MRm Rev. 3 AxioCam.

7.5 Análisis histoquímicos para celulosa y lignina en cortes histológicos transversales de hojas de *A. fourcroydes* Lem.

Para identificar celulosa los cortes transversales se tiñeron con azul de toluidina al 0.05 % en 50 mM de amortiguador de citrato con un pH de 4.25 durante 30 segundos sobre una placa a 55 °C, luego se enjuagaron con abundante agua desionizada. Las fotografías se tomaron con una cámara MotiCam 5.0 MP acoplada a un microscopio Axiostar Plus. Para observar el patrón de acumulación de lignina en las fibras, los cortes histológicos se observaron bajo una lámpara de mercurio (HBO/Ac) y la autofluorescencia de lignina se capturó utilizando un microscopio Axioskop 2 plus acoplado a una cámara (AxionCam MRc 5).

7.6 Análisis de expresión de genes involucrados en la ruta de biosíntesis de celulosa y lignina

7.6.1 Colecta de material vegetal

Para los análisis de expresión génica de algunos genes relacionados con la biosíntesis de celulosa y lignina, se realizaron 2 colectas. Para el análisis 1 (perfilado por tejido) se colectaron raíz, piña, hojas, tallo floral y flores de plantas adultas (~2 m de altura) en el Periférico de la ciudad de Motul, Yucatán (21°06'00.6" N, 89°18'05.7" W). Las muestras colectadas fueron colocadas en tubos tipo Falcon™ movilizadas a Campeche y almacenadas a -80 °C hasta su procesamiento.

Para el análisis 2 (hoja y células adyacentes a fibras), se cortaron hojas de plantas adultas de aproximadamente 2 m de altura trasladadas y plantadas al Colegio de Postgraduados Campus Campeche, Campeche (19.49841, -90.54598). Estas plantas fueron colectadas en la Hacienda Santa Teresa, Yucatán, México (21 ° 13'53.8 ' ' N 89 ° 15'22.5 ' ' W). La disección de las hojas colectadas se realizó manualmente, extrayendo fibras y secciones de tejido parenquimatoso (control) de la base (sección C), parte media de la hoja (sección B) y parte apical (sección A). Todas las muestras se almacenaron en nitrógeno líquido hasta su procesamiento.

7.6.2 Extracción y análisis de RNA total aislado

Todas las muestras colectadas y almacenadas en nitrógeno líquido a -80 °C se pulverizaron utilizando nitrógeno líquido y un mortero con pistilo, y se prepararon alícuotas en microtubos de 2 mL (aproximadamente 100 mg por tubo). Por cada tipo de tejido se procesaron 5 réplicas. La extracción de RNA total se realizó de acuerdo al protocolo del reactivo QIAzol® (QIAzol Lysis Reagent, Quiagen). El RNA aislado se purificó utilizando el kit de Rneasy® Mini Kit (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. El grado de pureza del RNA aislado se evaluó a partir de los datos obtenidos de la absorbancia a longitudes de onda específicas de 260 y 280 nm, debido a que los ácidos nucleicos y proteínas absorben a esa longitud de onda. La absorbancia fue obtenida con un espectrofotómetro (NanoDrop™ Lite de Thermo Scientific™). En la Figura 18 se muestra el flujo general de trabajo para la extracción y análisis de los RNAs totales aislados.

La integridad de los RNAs aislados y purificados fue evaluada a partir de la técnica de electroforesis en geles de agarosa al 1.5 % y teñidos con bromuro de etidio a una concentración de 10 mg/mL. Los geles se visualizaron utilizando el equipo BIO-RAD ChemiDoc™ MP Imaging System, con el software Image Lab Version 5.1 build 8. En los geles se evaluó que las bandas de los RNAs ribosomales 28S y 18S estuvieran bien definidas. Para el análisis 2 (hoja y células adyacentes a fibras), los RNAs de las 3 secciones de tejido parenquimatoso fueron mezcladas después de su cuantificación por nanodrop y análisis por electroforesis. Después de esto, fueron purificados, cuantificados y nuevamente analizados por electroforesis.

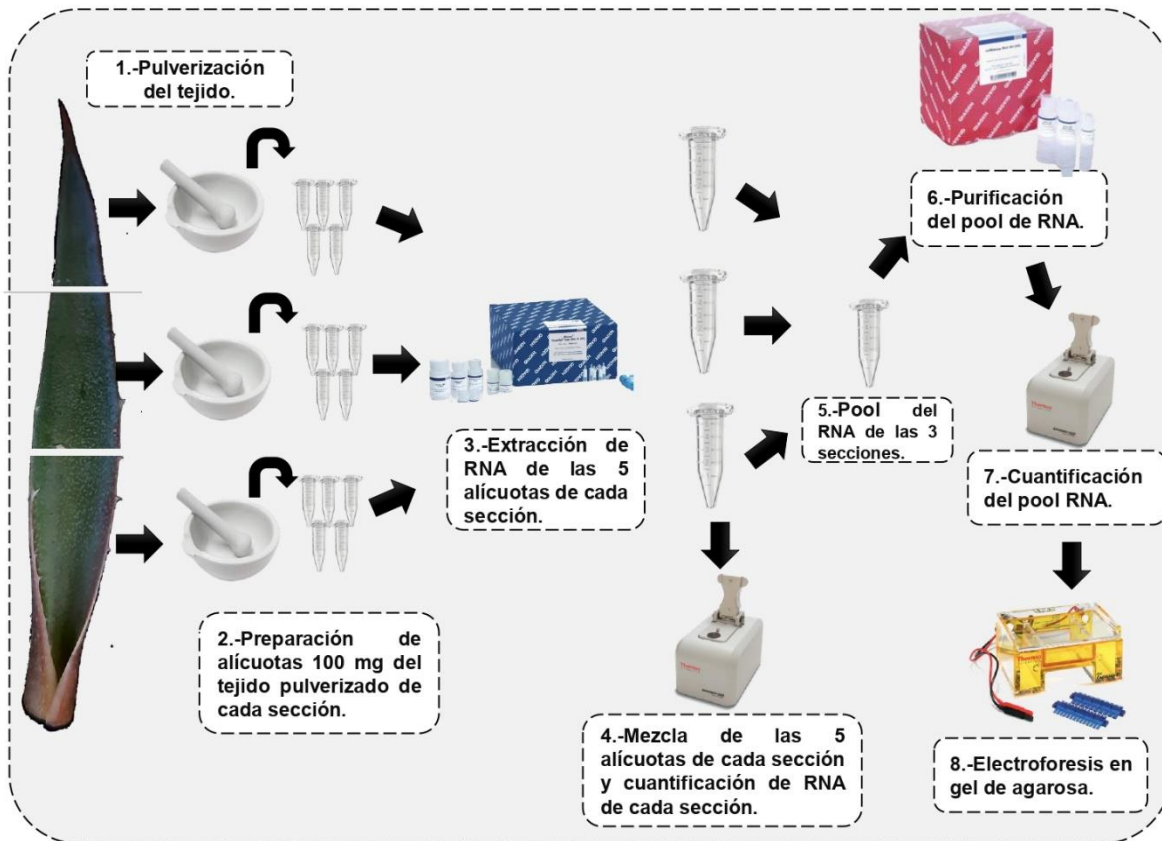


Figura 18. Metodología de extracción de RNA de hoja de *Agave fourcroydes* Lem.

7.6.3 Síntesis de DNA complementario (cDNA)

La síntesis de DNA complementario (cDNA) se realizó utilizando el kit de SuperScript™ III Reverse Transcriptase de invitrogen siguiendo el protocolo del fabricante. Para el análisis 1 (perfilado por tejido), se utilizaron 770 ng de RNA total purificado de las muestras de hoja, fibra, raíz, rizoma, piña, tallo floral (quiote) y flores. Para el análisis 2 (hoja y células asociadas a fibras), se utilizaron 1500 ng de RNA total para la síntesis de cDNA. Se realizó una mezcla de 1 μ L de oligo dT 50 mM, 1 μ L de la mezcla de dNTP's 10 mM y agua con DEPC hasta aforar a 13 μ L. Esta mezcla se desnaturalizó a 65°C durante 10 minutos. Una vez terminada la incubación, las reacciones se colocaron inmediatamente en hielo durante 5 minutos. Posteriormente, a cada mezcla se le agregaron 4 μ L de 5X First-Strand Buffer (250 mM Tris-HCl (pH 8.3), 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂), 1 μ L de 0.1 M DTT, 1 μ L de

agua con DEPC y 1 μL de la enzima SuperScript™ III RT (200 unidades/ μL) para tener un volumen final de 20 μL por reacción. Para la síntesis de cDNA, la mezcla se incubó en un termociclador a 52 °C durante 1 hora, se inactivó la enzima RT a 70 °C durante 15 minutos y por último el cDNA sintetizado se almacenó a -20°C.

7.6.4 Control de calidad del cDNA sintetizado

Para verificar la calidad del cDNA sintetizado para todas las muestras de los diferentes tejidos de *A. fourcroydes* Lem. se realizaron ensayos de PCR punto final para amplificar fragmentos de los genes de referencia o controles endógenos (*G3PH* y *UBQ11*). Para esto, se las reacciones de PCR (volumen final de 20 μL) se establecieron como sigue: 9.75 μL de agua con DEPC, 2 μL de 10 X Buffer Taq, 2 μL de la mezcla de dNTP's 2 mM, 2 μL de la mezcla de oligonucleótidos (forward y reverse) 10 mM, 2 μL de cDNA, 2 μL de MgCl_2 25 mM, y 0.25 μL Taq DNA polimerasa (recombinante) (1 U/ μL). Las condiciones de la PCR (25 ciclos) fueron: desnaturalización inicial a 95 °C por 3 minutos, desnaturalización 95°C por 30 segundos, alineamiento a 60 °C por 30 segundos, y extensión 72 °C por 30 segundos; y una extensión final a 72 °C por 5 minutos. Los productos de PCR obtenidos fueron evaluados mediante electroforesis estándar en un gel de agarosa al 1.5% (75 Volts durante 90 min), teñido con bromuro de etidio con una concentración de 10 mg/ml y visualizados en el equipo BIO-RAD ChemiDoc™ MP Imaging System, con el software Image Lab Version 5.1 build 8. Como marcador de masa molecular se usó 1 Kb Plus DNA (Invitrogen).

7.6.5 Oligonucleótidos para ensayos tipo qPCR

Para los análisis de expresión mediante qRT-PCR se seleccionaron 3 genes que participan en la biosíntesis de celulosa; *SUS2*, *CESA1* y *CESA7* y 2 genes para lignina; *CCR2* y *CAD5*. Los genes fueron seleccionados de acuerdo al papel crucial que ocupan en sus respectivas rutas de biosintéticas, y lo reportado por Maceda-López (2020) en *A. tequilana* Weber. Como genes de referencia (controles endógenos) se seleccionaron *G3PH* y *UBQ11* de acuerdo a lo previamente

reportado (Souza *et al.*, 2017; Maceda-López, 2020). Los oligonucleótidos utilizados fueron diseñados por Maceda-López, 2020, a partir de transcriptomas de *Agave tequilana* Weber. La secuencia de todos los oligonucleótidos usados en este estudio se muestra en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Oligonucleótidos utilizados para los análisis tipo qPCR

Gen	Oligonucleótidos	Amplicón	Tm (°C)
<i>G3PH</i>	F: ACACTGTCCACGGTTCATGG R: TCCACAACGTA CACTCAGCACC	148 pb	64
<i>UBIQUITINA</i>	F: GACGGGCGCACCCCTTGCGGATTAC R: TCCTGGATCTTCGCCTTGACATTG	211 pb	60
<i>SUS2</i>	F: GAATGCTGCAACGCCATCAA R: CTTAGAGCTGCCATCTGCGA	269 pb	62
<i>CESA1</i>	F: GTGCCAGATCTGTGGTGACA R: CTGGTCAGACGTGGGATACG	345 pb	62
<i>CESA7</i>	F: GGCCCCGAGGATGTTGATAG R: GGGACGACGAAGAGAAGTCG	381pb	63.9 63.6
<i>CCR2</i>	F: GCCCATTTGGTGGTCTACGA R: GTACGCCCAGGTCTCTTAGC	202 pb	64.1 63.6
<i>CAD5</i>	F: TGTGTTCCATCCCTTGGAGC R: CGAGATTGCTTCCAGCAACG	308 pb	62

F: Forward; R: Reverse.

7.6.6 Ensayos qPCR

Los ensayos de qPCR fueron realizados en un termociclador StepOne™ Real-Time PCR System, usando el StepOne Software v2.3 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Para cada gen de interés y genes de referencia, las reacciones de PCR (20 µL) fueron establecidas de la siguiente manera: 8 µL de SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 1.5 µL de cDNA (diluido

1:10), 1 μ L de oligonucleótidos forward, 1 μ L oligonucleótidos reverse (10 μ M) y 8.5 μ L de agua ultrapura (Invitrogen/Life Technologies, CA, USA). Las condiciones de PCR fueron: 95 °C por 10 min; 38 ciclos a 95 °C por 15 s y 60 °C por 1 min. Se utilizaron 3 réplicas técnicas por cada reacción. La eficiencia de los oligonucleótidos fue determinada usando concentraciones distintas de cDNA usando una mezcla de cDNAs para cada experimento (análisis 1 y 2). Se realizaron curvas de disociación para cada reacción de PCR para asegurar la ausencia de productos inespecíficos. Para los datos del análisis 1 (perfilado por tejido) los niveles de expresión relativa de los genes de interés fueron calculados usando el método $2^{-\Delta Ct}$ (Schmittgen y Livak, 2008), usando *UBQ11* como gen de referencia. Para el análisis 2 (hoja y células asociadas a fibras), el método usando fue $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Schmittgen y Livak, 2008), usando *G3PH* como gen de referencia y hoja como tratamiento calibrador.

7.7 Análisis de estadístico

Para todos los datos cuantitativos se realizaron una prueba de medias por Tukey con un $\alpha = 0.05$, usando el programa SAS para identificar si estadísticamente existe diferencia significativa entre tratamientos (etapas). Los resultados estadísticos se pueden observar en los Cuadros 9 -13 (Anexos).

VIII.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente estudio se estimó la acumulación de celulosa y lignina en el tejido parenquimatoso y fibras de hoja de bulbilos, y también en fibras de hoja de hijuelos y plantas adultas *A. fourcroydes* Lem. En la Figura 16 se muestran los datos morfométricos de los bulbilos, hijuelos y plantas adultas utilizados. Es importante mencionar que para la etapa 1, el análisis de carbohidratos y lignina en las fibras de bulbilos no se realizó, debido a que la altura de las plantas oscilaba entre 3.5 a 8.5 cm y el contenido de fibra obtenido no fue suficiente para llevar a cabo dicho análisis.

8.1 Cuantificación de celulosa en tejido parenquimatoso y fibras de *Agave fourcroydes* Lem.

En los últimos años se han incrementado los estudios que hacen referencia a la composición química de las fibras en diferentes especies de *Agave*, sin embargo, la información aún sigue siendo limitada, especialmente en aquellas especies utilizadas para la producción de fibra (Corbin *et al.*, 2015; Raya *et al.*, 2020). En este trabajo se estimaron los contenidos de celulosa, lignina y algunos carbohidratos de hemicelulosa que conforman las fibras y tejido parenquimatoso en hojas de *A. fourcroydes* Lem. durante tres diferentes etapas de desarrollo establecidas.

La celulosa fue estimada a partir de los monómeros de glucosa que la integran; esto fue posible a partir de un perfil de carbohidratos estructurales realizado en las muestras de tejido parenquimatoso de hojas de bulbilos, fibras de hojas también de bulbilos, y fibras de hijuelos y plantas adultas de *A. fourcroydes* Lem. La Figura 19 muestran los resultados obtenidos del perfil de carbohidratos y de manera general, en los paneles A, D y G se puede observar que el monosacárido más abundante es la glucosa que corresponde a la estimación de la celulosa, el polisacárido más abundante en plantas. En tejido parenquimatoso se puede observar que la cantidad de glucosa es constante en las tres etapas analizadas y oscila en $223 \mu\text{g}.\text{mg}^{-1}$ de peso seco. Por otro lado, la cantidad de celulosa en fibras de bulbilos es casi el

doble que aquella hallada en el tejido parenquimatoso (Figura 19A y 19D). Este resultado era esperado pues se sabe que las fibras se conforman de células que particularmente poseen una pared secundaria gruesa, donde el carbohidrato estructural principal es la celulosa. En cambio, las células de parénquima son caracterizadas por tener una pared primaria usualmente delgada donde mayormente se acumulan carbohidratos no estructurales (Crang *et al.*, 2015; Morris *et al.*, 2016).

En *Agave fourcroydes* Lem. se ha reportado previamente que la cantidad de celulosa en fibra depende del tamaño de la planta. Por ejemplo, en plantas de tamaños de 75 cm a 139 cm, el porcentaje del contenido de celulosa puede ir desde 8 % a 48 %, respectivamente (García-Castillo, 2016). Sin embargo, nuestros resultados de celulosa en fibras de bulbilos en las 3 etapas analizadas muestran un porcentaje de alrededor del 42 % y no se presenta un incremento significativo de celulosa con respecto al tamaño de la planta. Es posible especular que en plantas con una altura como las analizadas en este trabajo, los cambios en el contenido de celulosa de fibra no presenten incrementos drásticos, y que durante el desarrollo se involucren cambios en las proporciones del resto de compuestos lignocelulósicos.

El segundo monosacárido con mayor abundancia que se presentó en las muestras analizadas fue xilosa (Figura 19A y 19D). Se conoce que xilosa es un monosacárido que conforma al polisacárido xilano, y corresponde al principal componente de la hemicelulosa (Meents *et al.*, 2018). En tejido parenquimatoso se puede observar que el contenido de xilosa es constante en todas las etapas de desarrollo analizadas, con alrededor de 26 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ de peso seco; por el contrario, en las fibras de bulbito, a pesar de no existir diferencias significativas, el contenido de xilosa está afectado por el tamaño de la planta. Este mismo comportamiento fue observado en fibras de hijuelos y plantas adultas (Figura 19G). De acuerdo con diversos autores (Mamman *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2016), el xilano es el segundo polisacárido más abundante en las paredes secundarias de las angiospermas y comúnmente se presenta en maderas duras. También se sabe que, debido a su estructura, el xilano

confiere resistencia a los tejidos donde está presente (Zhong *et al.*, 2019). En nuestro caso, no es de sorprender que las fibras presenten hasta 4 veces mayor contenido de xilosa que en el tejido parenquimatoso. En Agaves, se sabe que en *A. sisalana* la xilosa es el segundo carbohidrato más abundante después de la glucosa en fibras de hoja (Stewart *et al.*, 1997). Nuestros resultados demuestran un incremento de xilosa dependiente del desarrollo de la hoja, que se observó tanto en fibras de bulbillos e hijuelos. Este dato hasta ahora no se ha reportado, pudiera explicar el endurecimiento de la fibra observado a lo largo del desarrollo de la planta.

Respecto a arabinosa se sabe que es un compuesto que conforma la pectina (Harholt *et al.*, 2010). En este trabajo, la arabinosa también se presentó de manera constante y con mayor concentración en el tejido parenquimatoso con un promedio de $13 \mu\text{g}.\text{mg}^{-1}$ de peso seco (Figura 19B). En el caso de fibras de bulbillos y fibras de hijuelos y plantas adultas, la concentración de arabinosa estimada fue tres veces menor que en tejido parenquimatoso. Tanto en fibras de bulbillos como de hijuelos y plantas adultas, la concentración de arabinosa mostró una tendencia a disminuir conforme la hoja madura (Figura 19E y 19H), lo cual no fue observado para paredes celulares de parénquima (Figura 19B). De acuerdo a Harholt *et al.* (2010) en plantas, la carencia del arabinano puede inducir el endurecimiento de la pared celular. En fibras de agaves, un decremento de arabinosa inducida por el desarrollo de la planta pudiera contribuir a aumentar la rigidez y dureza de dicho tejido.

Para otros azúcares de menor concentración se observó lo siguiente: el contenido de manosa es mayor en el tejido parenquimatoso que en fibras, con una concentración de alrededor del $15 \mu\text{g}.\text{mg}^{-1}$, y esta concentración es constante en todas las etapas analizadas. En fibras de bulbillos, el contenido fue bajo (Figura 19E), y en fibras de plantas mayores incluso no fue detectado (Figura 19H). Se sabe que la estructura principal de los mananos, comúnmente en mayor abundancia en coníferas, está conformada por manosa, azúcar que forma parte de la hemicelulosa (Pauly *et al.*, 2013; Kumar *et al.*, 2016; Meents *et al.*, 2018). Por otra parte, ramnosa, fucosa, ribosa y celobiosa fueron los carbohidratos hallados en menor

concentración en todos los tejidos evaluados (Figura 19C, 19F y 19I). La concentración de estos carbohidratos fue constante entre todas las etapas del tejido parenquimatoso (Figura 19C), lo cual contrasta con lo observado para fibras (Figura 19F y 19I). Tanto ramnosa y fucosa son dependientes de la edad en bulbillos (Figura 19F), mientras que en plantas adultas tienen niveles relativamente estables, a concentraciones muy bajas (Figura 19I). Ramnosa es un componente de pectina, y ha sido reportado en fibras de *A. sisalana* Perrine ex Engelm (Benítez *et al.*, 2014), pero no para *A. fourcroydes* Lem. Por otra parte, se sabe que celobiosa es un disacárido que conforma a la celulosa, es decir, son dos moléculas de glucosa (Laret *et al.*, 2010), por lo que es probable que la concentración de celobiosa obtenida en las muestras analizadas sea producto de una hidrólisis parcial.

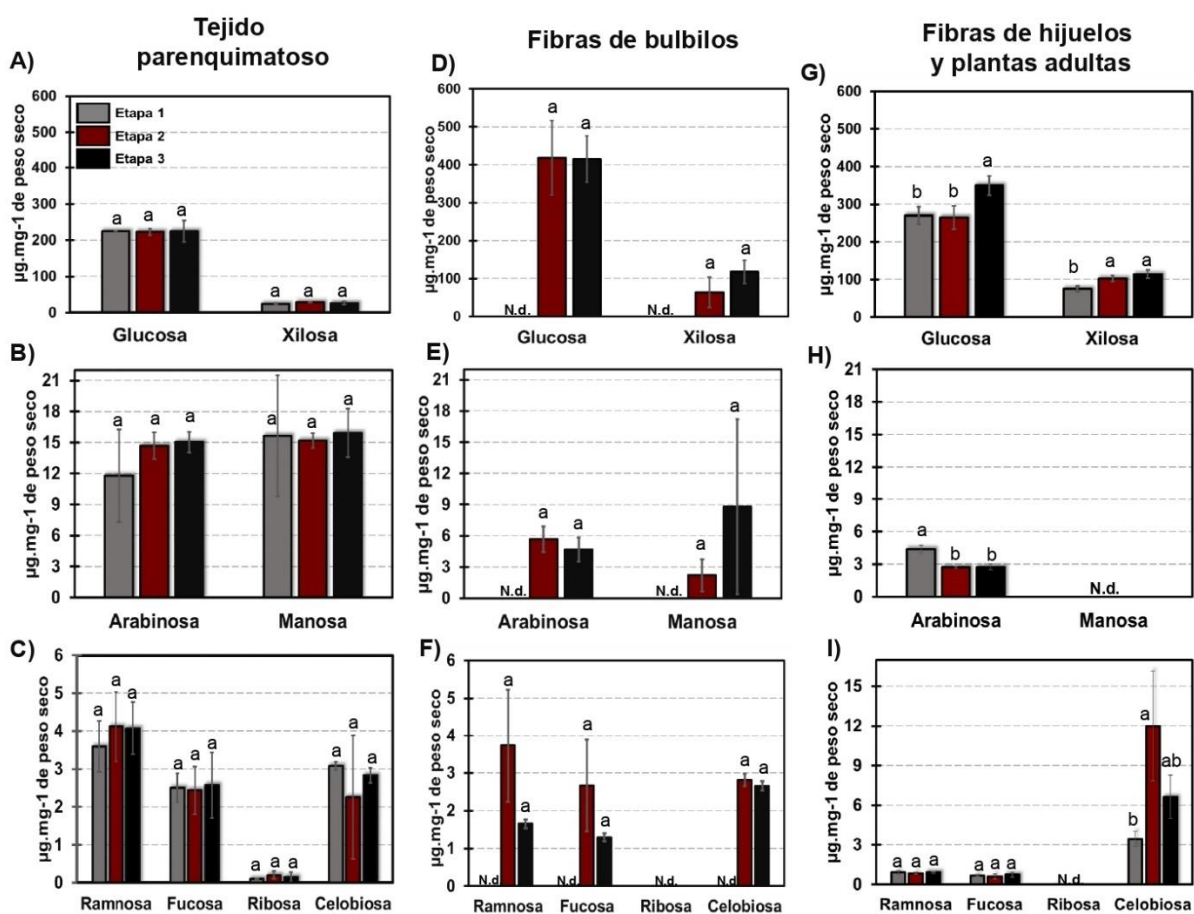


Figura 19. Análisis de monosacáridos a lo largo del desarrollo de la fibra en *A. fourcroydes* Lem. Para este análisis, el tejido parenquimatoso (A, B y C), fue usado como tratamiento control para contrastar contra fibras de bulbillos (D, E y F)

y fibras de hijuelos y plantas adultas (G, H e I). Tres diferentes etapas de desarrollo (altura de la planta) fueron analizadas. *N.d; No determinado*. Las medias con la misma letra no son estadísticamente diferentes (Tukey, $\alpha = 0.05$).

8.2 Cuantificación de lignina en tejido parenquimatoso y fibras de hoja de *Agave fourcroydes* Lem.

El contenido de lignina total y tres de sus principales monómeros (p-hidroxilfenol, H; guaiacil, G; y siringil, S) fue también cuantificado en fibras y parénquima a lo largo del desarrollo de las hojas de *A. fourcroydes* Lem. En la Figura 20 se presentan los resultados obtenidos de la cuantificación de lignina en tres diferentes etapas de desarrollo de bulbillos, hijuelos y plantas adultas. El contenido de lignina total en tejido parenquimatoso de bulbillos fue relativamente estable entre las tres etapas analizadas, con valores que fluctuaron entre 7.3 % y 8.2 % (porcentaje en peso seco) (Figura 20A). En contraste, en fibras de bulbillos, la concentración de lignina total fue incrementándose a lo largo del desarrollo de la planta hasta alcanzar un valor de 9.6 % (Figura 20D). Esto fue más evidente en plantas más desarrolladas; en fibras de hijuelos y plantas adultas se obtuvo un porcentaje de lignina total de 11.1% a 14.1 % (Figura 20G). Cabe mencionar que el contenido de lignina total ha sido estimado en fibras de diferentes especies de Agaves, entre ellos *A. fourcroydes* Lem. donde su contenido de lignina total oscila alrededor de 13.1 % (Malkapuram *et al.*, 2009), lo cual es muy similar a los valores obtenidos de nuestro análisis. Sin embargo, en cuanto a los niveles de lignina en tejido parenquimatoso los resultados no fueron los esperados, pues este tejido está compuesto por células con pared primaria. Suponemos que este porcentaje obtenido de lignina total probablemente pertenezca a las espinas ya que las hojas fueron pulverizadas completamente durante el procesado de las muestras. Se ha reportado recientemente que las espinas de *A. fourcroydes* Lem. contienen un porcentaje mayor de lignina que sus mismas fibras (Morán-Velázquez *et al.*, 2020). Otra de las hipótesis del por qué existe un contenido elevado de lignina en tejido parenquimatoso podría ser la aportación del xilema y sus fibras, que no pudieron ser removidos completamente de la muestra considerada como tejido parenquimatoso.

Cuando se analizó la composición de lignina en los 2 tipos de muestras y a lo largo del desarrollo se observó que: 1) en tejido de parénquima, los niveles de los 3 monómeros de lignina permanecen sin diferencias estadísticas a lo largo de las 3 etapas de desarrollo evaluadas (Figura 20B). En cambio, 2) en fibra existe una tendencia de incremento de las unidades S y G a lo largo del desarrollo, tanto para bulbillos como para hijuelos y plantas adultas (Figura 20E y 0H), lo cual explicaría los incrementos en lignina total observados (Figura 20D y 20G). Respecto a la subunidad H, en todos los tejidos y etapas analizadas, las concentraciones fueron muy bajas (Figura 20B, 20E y 20H).

Para lignina, en *A. sisalana* Perrine ex Engelm se ha reportado la relación molar de sus unidades constitucionales en fibras y se ha establecido en H 2 %, G 22 % y S 76 % (Benítez-Guerrero *et al.*, 2014). En *A. fourcroydes* Lem. también se reportó la unidad S como la unidad más abundante (Raya *et al.*, 2020). Sin embargo, nuestros resultados muestran una ligera diferencia entre la relación de S/G (Figura 20C, 20F y 20I), existiendo una ligera mayor proporción de la unidad G en etapas tempranas de desarrollo de la fibra, y mayor abundancia de S en la etapa 3 que corresponde a plantas adultas (Figura 20H), en concordancia con los estudios previos (Benitez-Guerrero *et al.*, 2014; Raya *et al.*, 2020).

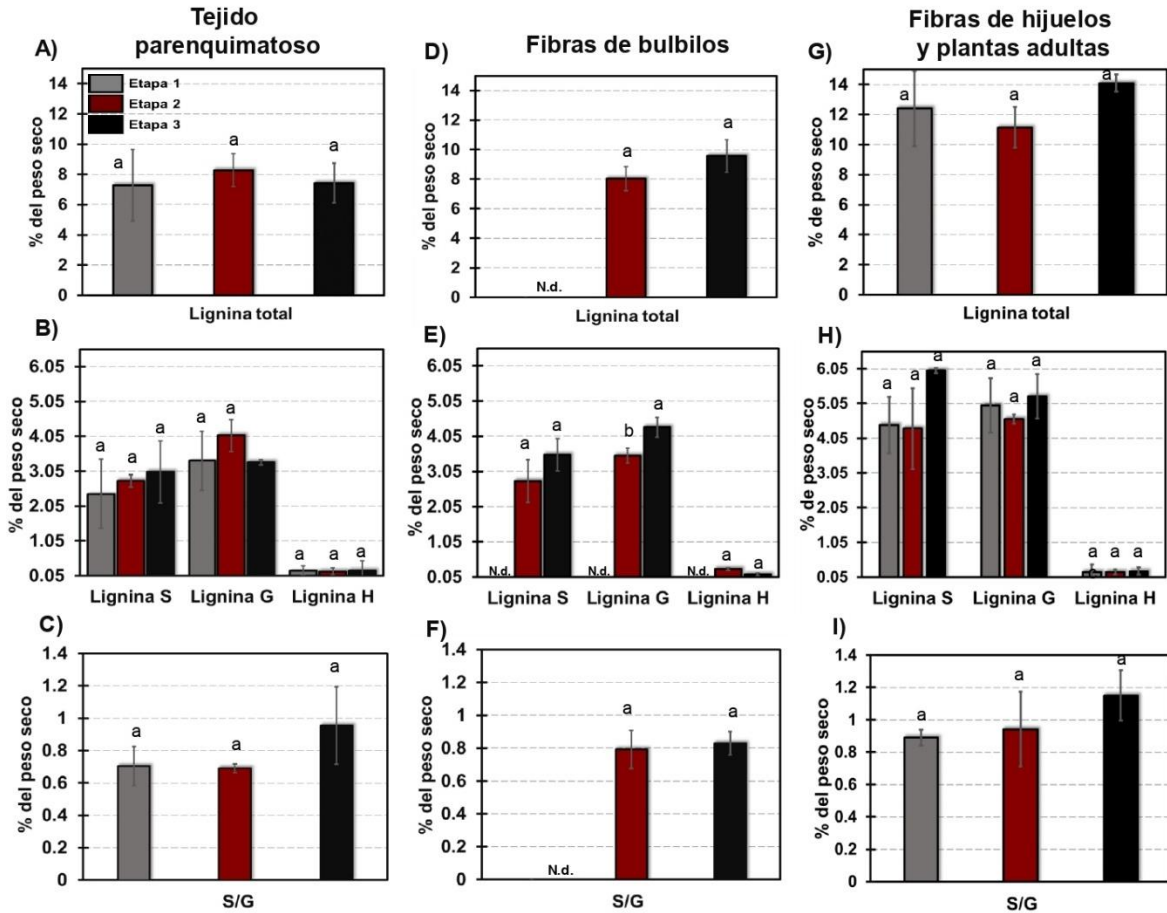


Figura 20. Análisis de lignina total y sus subunidades a lo largo del desarrollo de la fibra en *A. fourcroydes* Lem. Los paneles muestran la cuantificación de lignina total, monolignoles y relación S/G en tejido parenquimatoso (A, B y C); fibras de bulbilos (D, E y F) y fibras de hijuelos y plantas adultas (G, H e I) de *A. fourcroydes* Lem. en tres diferentes etapas de desarrollo. N.d: No determinado. Las medias con la misma letra no son estadísticamente diferentes (Tukey, $\alpha = 0.05$).

8.3 Análisis por espectroscopia infrarroja media de fibras y tejido parenquimatoso de *A. fourcroydes* Lem. en diferentes etapas de desarrollo.

Una de las técnicas complementarias que frecuentemente se utiliza para conocer la composición química de las fibras es la espectroscopía infrarroja media (FTIR, por sus siglas en inglés). Con ella, se evaluó la existencia de varios grupos funcionales en las muestras de tejido parenquimatoso, fibras de bulbilos, hijuelos y plantas adultas de *A. fourcroydes* Lem., comparando los resultados obtenidos con información de diversos autores que también han analizado fibras de agaves (Rosli *et al.*, 2013; Bezazi *et al.*, 2014; Madhu *et al.*, 2020).

De los espectros de FTIR, se evaluaron las bandas entre 4000 y 500 cm^{-1} (Figura 21). Se observó un pico ancho típico entre 3600 a 3000 cm^{-1} tanto en tejido parenquimatoso como en fibras y de acuerdo con lo reportado por Rosli *et al.* (2013) y Madhu *et al.* (2020), este pico se encuentra relacionado con el estiramiento OH de la α -celulosa y puede atribuirse a la estructura de celulosa unida por hidrógeno; mientras que el pico que oscila en 1055 cm^{-1} se puede atribuir a la vibración del estiramiento del grupo CO y O-H que pertenece al polisacárido en celulosa.

En fibras crudas de *A. americana* L. se han encontrado que los picos 1602 cm^{-1} y 1552 cm^{-1} corresponden a la vibración del estiramiento C=O del grupo amida en hemicelulosa y lignina respectivamente (Madhu *et al.*, 2020). En las muestras de tejido parenquimatoso y fibras se puede observar la presencia de un pico que oscila los 1600 cm^{-1} y probablemente corresponda a lo mencionado anteriormente. En el Cuadro 4 se resume las bandas características de FTIR reportada por Bezazi *et al.* (2014) y su identificación en la estructura química del tejido parenquimatoso y fibras de hoja de *A. fourcroydes* Lem.

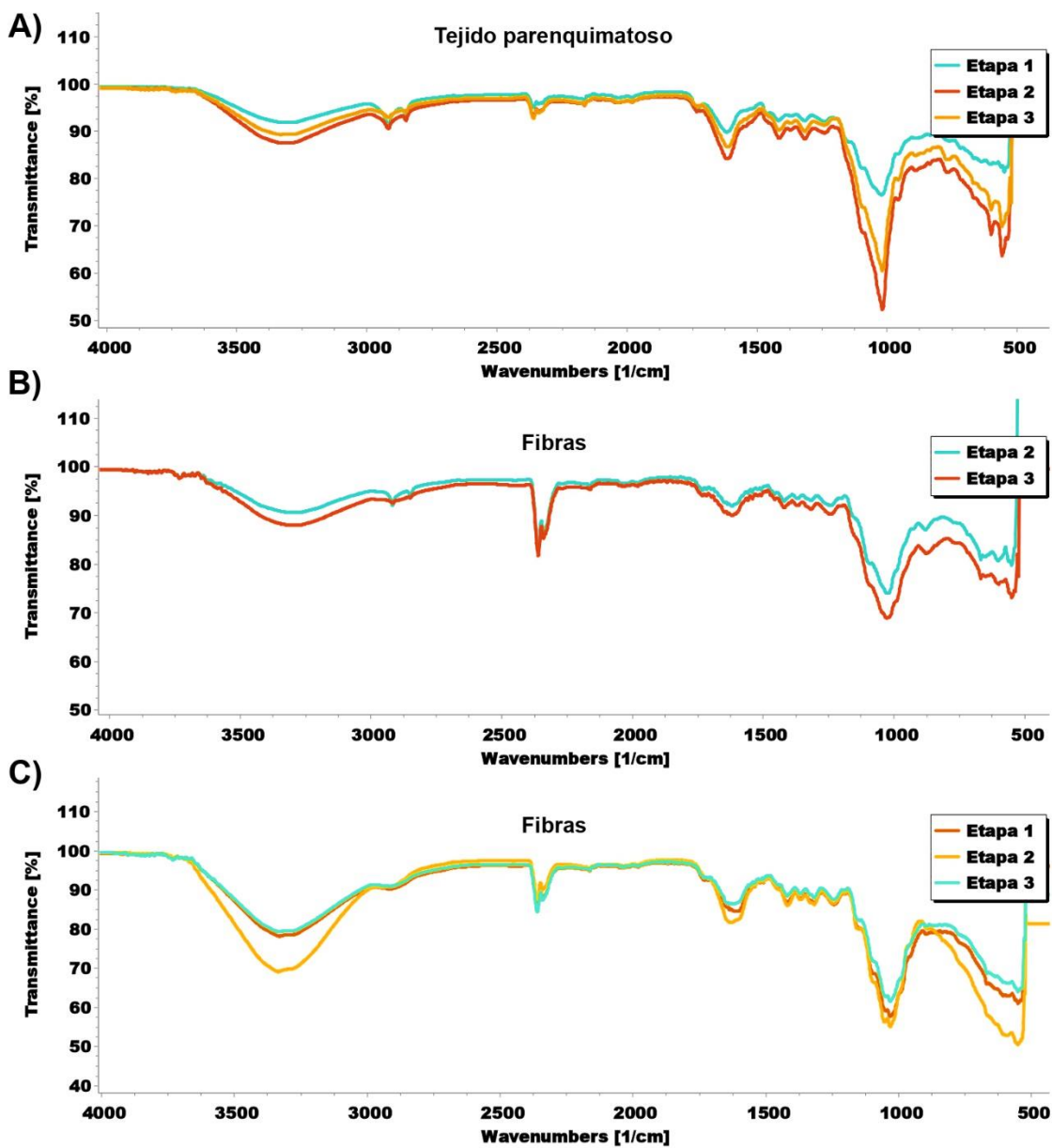


Figura 21. Espectros FTIR de muestras de tejido parenquimatoso (A), fibras de hoja de bulbilos (B), fibra de hoja de hijuelos y plantas adultas (C) de *A. fourcroydes* Lem.

Cuadro 4. Los picos utilizados para el análisis FT-IR y posibles asignaciones de tejido parenquimatoso, fibras de bulbilos y fibras de hijuelos y plantas adultas de *A. fourcroydes* Lem. reportados por Bezazi *et al.* 2014

Número de onda (cm-1)	Posición de la banda (cm-1) en este trabajo			Origen
	Tejido parenquimatoso	Fibras de bulbilos	Fibras de hijuelos y plantas adultas	
3600-3100	3326	3279	3332	Estiramiento O-H unido a hidrogeno.
3400	-	-	-	Atribuido a la celulosa I_{β}
2950 y 2654	2918 y 2652	2917 y 2651	2917 y 2660	Vibración de estiramiento de C-H en CH y CH ₂ en celulosa y hemicelulosa.
1740 y 1600	1617	1618	1616	Estiramiento de carbonilo C=O de los grupos acetil de hemicelulosas.
1460	-	-	-	O-H en flexión plana
1430	1417	1419	1419	Flexión simétrica de CH ₂ .
1377	1370	1372	1370	Vibración de flexión de C-H.
1320	1317	1317	1317	Grupos C-O del anillo aromático en polisacáridos.
1243	1243	1243	1243	Vibración de estiramiento de C-O del grupo acetilo en lignina.
1055	-	1023	1030	Vibración de estiramiento CO y O-H que pertenece al

1160	-	-	-	polisacárido en celulosa. Estiramiento antisimétrico C-O-O.
894	-	880	894	Enlaces β -glucosídicos entre monosacáridos.
670-620	637	668	-	Vibraciones fuera del plano que involucran estructura de anillo.
598	602	601	589	Flexión de C-OH

8.4 Análisis histológico del desarrollo de las fibras de esclerénquima en cuatro diferentes etapas de crecimiento de bulbilos de *A. fourcroydes* Lem.

Para caracterizar el desarrollo de las fibras y su relación con los patrones de acumulación de celulosa y lignina se realizó un análisis histológico espacio-temporal en cuatro etapas tempranas del ciclo de vida de *A. fourcroydes* Lem. incluyendo las tres previamente caracterizadas para composición química. La Figura 22 muestra cortes histológicos transversales, representativos de estas etapas analizadas, definidas como E0, E1, E2 y E3. Se señalan los distintos tipos de fibras (de cinta y estructurales) (Li *et al.*, 2000; Corbin *et al.*, 2015) que fueron analizadas durante este estudio, y su posición adaxial o abaxial dentro de la lámina foliar (Figura 22). Las fibras de cinta son las primeras en aparecer en E0, situándose en la parte media de la lámina foliar (Figura 22A). Las fibras estructurales aparecen más tardíamente, tanto del lado abaxial o adaxial de la hoja (Figura 22B-D). Aún son ya visibles desde E1 en ambos lados de la hoja, existe una diferenciación más temprana para fibras estructurales abaxiales respecto a las adaxiales (Figura 22B y C); en E3, una etapa de desarrollo más avanzada, estas diferencias son menos visibles (Figura 22D).

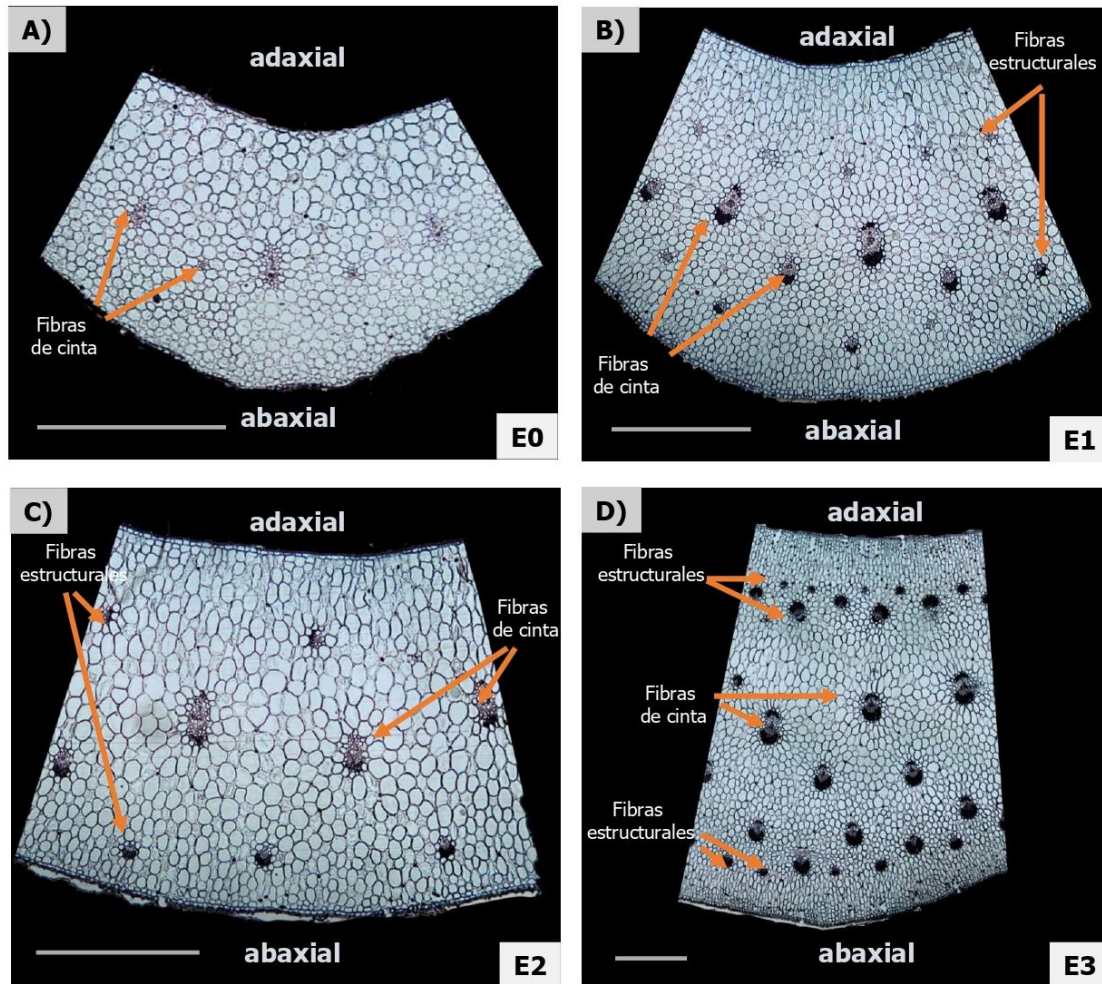


Figura 22. Micrografía de cortes histológicos de hoja de *A. fourcroydes* Lem. y la clasificación de fibras analizadas en cuatro diferentes etapas de desarrollo. Las micrografías corresponden a la Sección C. Barra de escala = 1000 μ m.

Para realizar una descripción más detallada del proceso de desarrollo (E0-E3) de los distintos tipos de fibras, específicamente del grado de diferenciación de la fibra indicada por la aparición de la pared secundaria, se realizó un análisis de imágenes de microscopía de campo claro (Figura 23) y tinciones con azul de toluidina (Figura 24), considerando también la posición basal, media o apical de la fibra. El azul de toluidina reconoce los grupos carboxilo en los polisacáridos y las proteínas, y muestra la distribución, pero no la cantidad o estructura, de los polisacáridos y tejidos lignificados asociados a la pared celular (O'Brien *et al.*, 1964; Corbin *et al.*, 2015; Ribeiro y Leitão, 2019). El color azul presente en alrededor de las células del

parénquima corresponde a paredes primarias delgadas, mientras que el verde brillante en las células identifica paredes secundarias lignificadas, en nuestro caso, principalmente asociado a los capuchones de fibras asociadas a floema, las fibras de xilema y los haces vasculares (Figura 24).

Las condiciones climáticas influyen en la composición química de fibras naturales y por consecuencia las propiedades físicas y mecánicas son afectadas (Khalil *et al.*, 2015). En *A. americana* L. se ha reportado que la composición química de las fibras depende de varios factores, como el tipo de suelo utilizado, las condiciones climáticas, la edad de las plantas, etc. La propiedad de cada componente contribuye a las propiedades generales de la fibra (Hulle *et al.*, 2015).

Los cortes histológicos de la E0 muestran aparentemente solo fibras de cinta (Figura 23 y 24, superior izquierda) en las 2 posiciones dentro de la hoja (basal y apical). No existe indicios de la formación de fibras estructurales. Presumiblemente el capuchón de fibras de cinta correspondería al grupo de células situadas arriba del floema, delimitadas por las células de la corona (Figura 24, superior izquierda; Figura 25A), sin embargo, es imposible confirmarlo por ausencia de pared secundaria como lo revela la tinción histoquímica (Figura 25A). La aparición temprana de fibras de cintas se explicaría como un mecanismo de protección. En *A. sisalana* Perrine ex Engelm se ha reportado que las fibras de cinta se encuentran relacionadas con el tejido conductor de la planta, al brindarle resistencia mecánica y protección (Li *et al.*, 2015).

En E1, los dos tipos de fibras (estructurales y de cinta) pueden ser perfectamente identificadas (Figura 23 y 24). Las fibras de cinta, ubicadas en la parte central de la lámina foliar, son reconocidas por sus paredes secundarias visibles y están asociadas a floema (Figura 24 superior derecha; Figura 25B); no hay diferencias en su grado de desarrollo en función de su posición a lo largo de la hoja. Las fibras estructurales se ubican hacia el lado adaxial y abaxial de la lámina foliar, en ambos casos, también asociadas a floema, y más desarrolladas hacia el extremo apical

(sección A) comparado al extremo basal (sección C) de la hoja. Las abaxiales presentan un mayor grado de diferenciación respecto a las adaxiales, revelado por un mayor número de células que conforman el capuchón de fibras (Figura 24, superior derecha). No hay ningún tipo de fibras asociadas a xilema en esta etapa de desarrollo (Figura 23, 24 y 25B).

En E2, los patrones de desarrollo para los 2 tipos de fibras son muy similares a lo hallado en E1, excepto: a) el haz de las fibras estructurales tanto adaxiales como axiales están más desarrollados revelados por un mayor número de células positivas al color verde brillante que indica paredes secundarias (Figura 22 y 23, inferior izquierda), y prácticamente envuelve a los tejidos conductores. Las fibras de cinta están más desarrolladas hacia el extremo apical de la hoja (sección C); incluso solo en esta zona de la hoja es posible observar la diferenciación de fibras asociadas a xilema, con al menos un par de ellas reveladas por la tinción histoquímica (Figura 24, inferior izquierda).

En E3 se puede apreciar claramente los haces de fibras mucho más grandes a comparación de las etapas anteriores (Figura 22 y 23). Las fibras de cinta están completamente desarrolladas desde la parte basal a la apical (secciones A, B y C), con paredes celulares engrosadas en todos los casos (Figura 23, inferior derecha). Este tipo de fibra se presenta hacia ambos extremos del sistema vascular; las fibras asociadas a floema son las más grandes, con un mayor número de células integrando el haz, se ubican por debajo del floema (Figura 23, inferior derecha). En contraste, las fibras asociadas a xilema, conforman un haz más pequeño comparado con las que se localizan junto a floema, y están más diferenciadas hacia la parte basal de la hoja (sección C). Las fibras estructurales, localizadas tanto del lado adaxial como abaxial, se visualizan perfectamente diferenciadas en la E3, en las 3 secciones de hoja analizadas (A, B y C) (Figura 23, inferior derecha). Las abaxiales constriñen más al haz vascular que las adaxiales, lo cual está en línea con su desarrollo más temprano desde la etapa 1 (Figura 24, inferior derecha). La

tinción histológica no reveló la presencia de fibras con paredes secundarias engrosadas asociadas a xilema tampoco para esta etapa.

En *Agave lechuguilla* Torr. se ha descrito que las fibras rodean 3 flancos del haz vascular, lo cual diferencia al género agave del género *Yucca* spp. (Bell y King *et al.*, 1944). Sin embargo, para *A. fourcroydes* Lem. esta afirmación sólo es válida para fibras estructurales en estados de desarrollo (E3), ya que las fibras de cinta presentan un arreglo arriba y abajo similar a lo reportado para yuca por Bell y King *et al.* (1944).

En *Linum usitatissimum* L. la diferenciación de fibras se caracteriza por la deposición de una pared secundaria rica en celulosa, comienza muy temprano durante su desarrollo y continúa a lo largo de todas las etapas de crecimiento de la planta, a consecuencia del engrosamiento de la fibra y su arreglo de las fibras, el tallo confiere rigidez (Esau, 1977; His *et al.*, 2001; Goudenhoft *et al.*, 2019). En las fibras de *A. fourcroydes* Lem. se puede observar algo similar (Figuras 25, 26 y 27), sugiriendo que el engrosamiento de las fibras ocurre progresivamente durante el desarrollo y en la madurez de la planta, y éste otorga la rigidez necesaria a las hojas lo que ayuda a mantener su forma erecta, tal como se reporta en *A. tequilana* Weber (Corbin *et al.*, 2015). Así como se ha demostrado que la composición de las fibras en Agaves influye en sus propiedades mecánicas, la morfología de las fibras entre diferentes especies de Agave ha demostrado ser distintas (Bell y King *et al.*, 1944, Li *et al.*, 2000; Fidelis *et al.*, 2013), por esto se sugiere que la morfología de las fibras pudiera influir en la forma de la hoja característica para cada especie de agave.

Los estudios sobre la ontogenia de las fibras de agaves siguen siendo escasos. Conocer el desarrollo de las fibras de agave y los factores que influyen sobre sus propiedades plantea una estrategia interesante que permitiría optimizar su aprovechamiento.

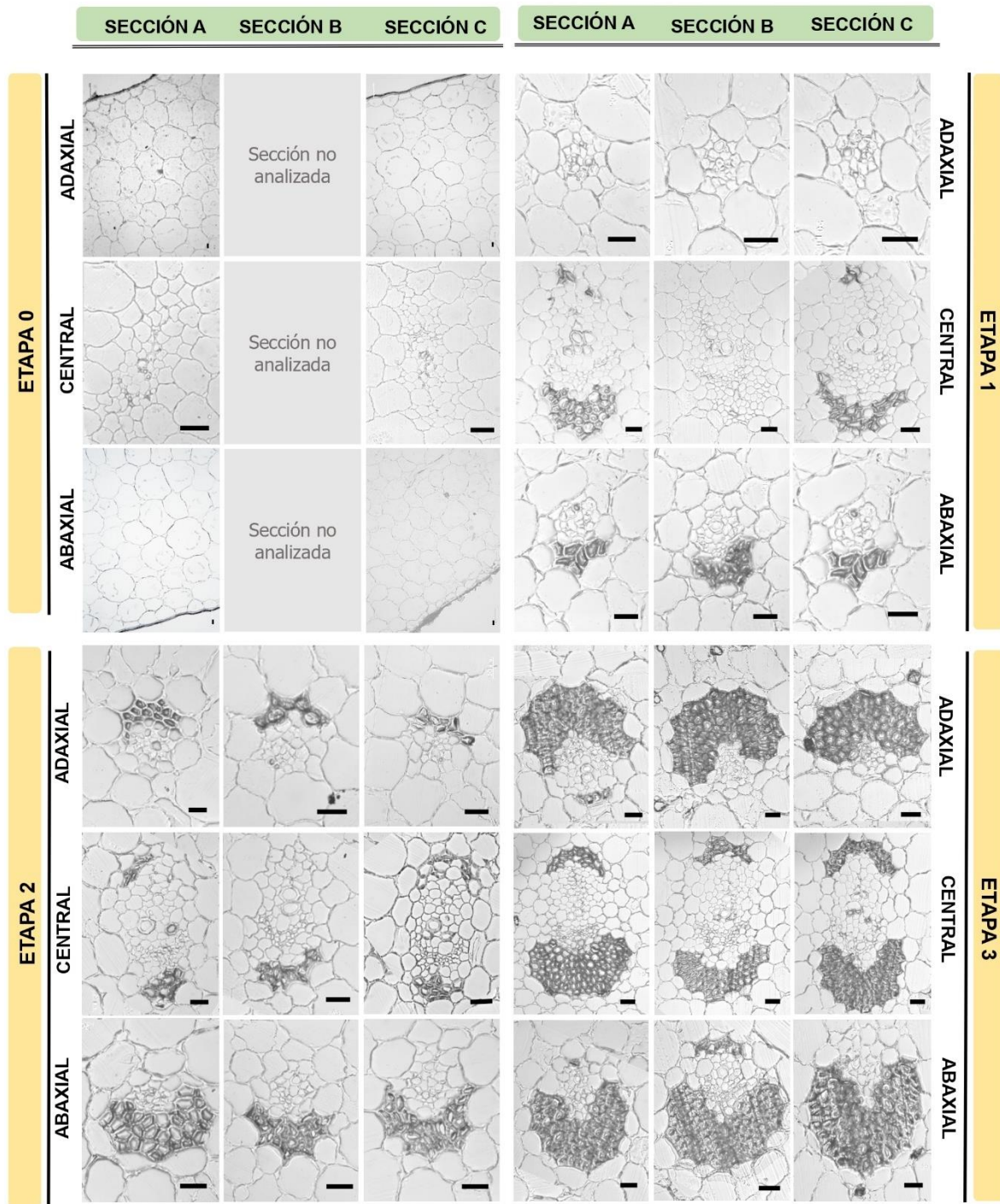


Figura 23. Desarrollo de los diferentes tipos de fibras de hoja de bulbilos de *A. fourcroydes* Lem. en cuatro etapas de crecimiento. Barra de escala = 20 μ m.

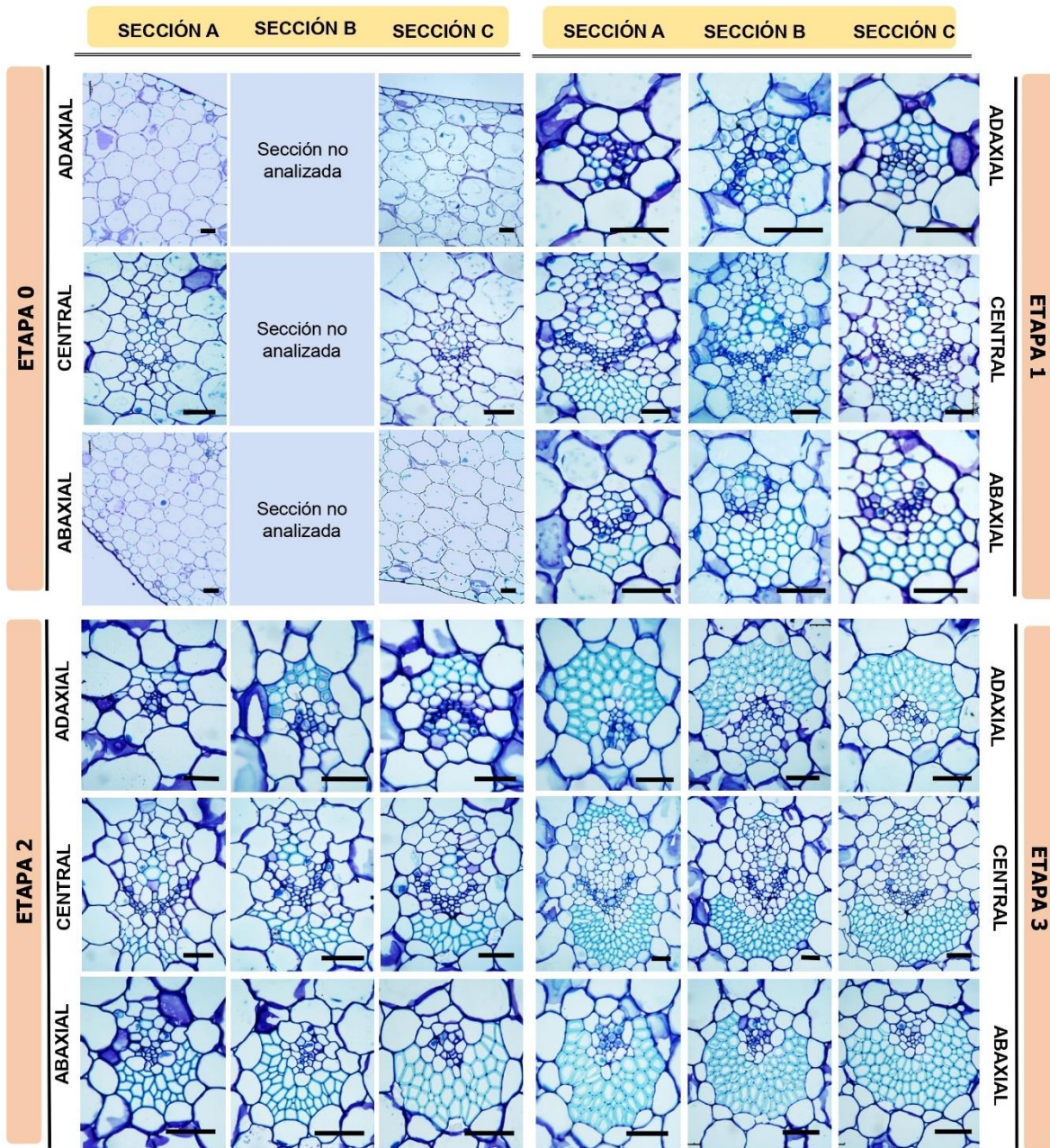


Figura 24. Cinética espacio-temporal del desarrollo de las fibras de *A. fourcroydes* Lem. La morfología de los diferentes tipos de fibras fue revelada con azul de Toluidina. Barra de escala = 50 μ m.

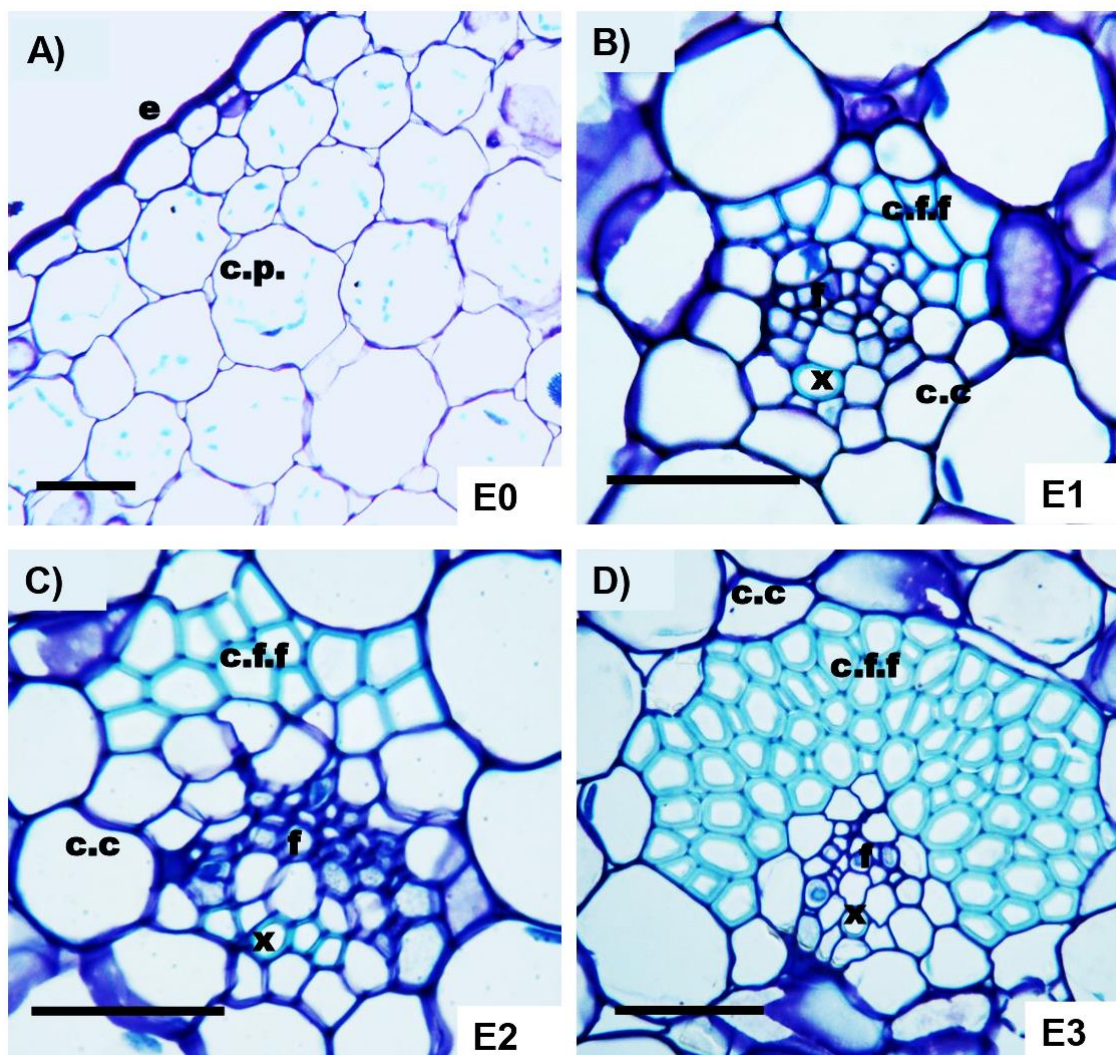


Figura 25. Fibras estructurales ubicadas en la parte adaxial de hoja en cuatro diferentes etapas de crecimiento de *A. fourcroydes* Lem. x; xilema, f; floema, c.f.f; capuchón de fibras asociadas a floema, f.x; fibras de xilema. Las micrográficas corresponden a la sección C de la hoja. Barra de escala = 50 μ m.

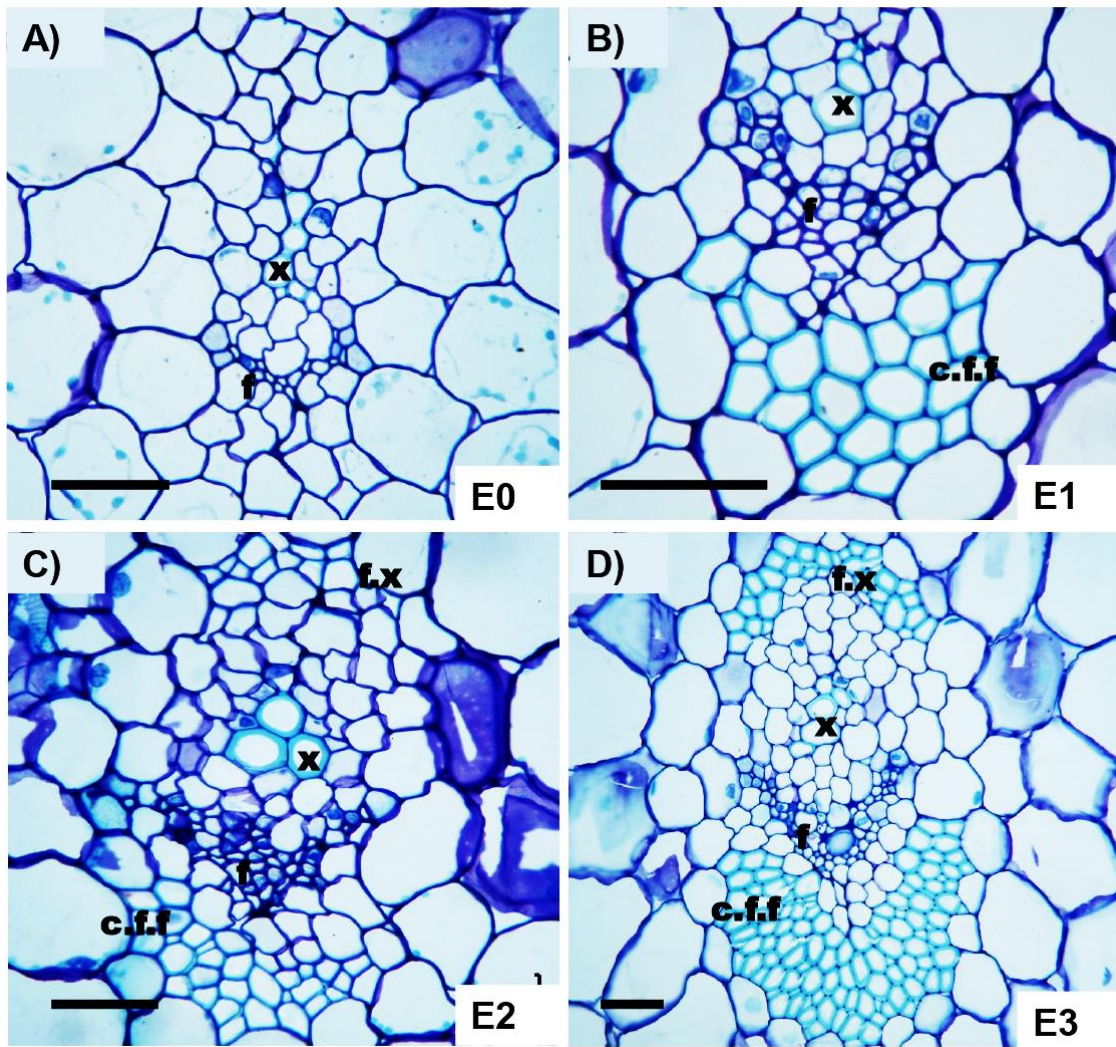


Figura 26. Fibras de cinta en cuatro diferentes etapas de crecimiento de *A. fourcroydes* Lem. X; xilema, f; floema, c.f.f; capuchón de fibras de asociadas a floema, f.x; fibras de xilema. Las micrografías corresponden a la sección C de la hoja. Barra de escala = 50 μ m.

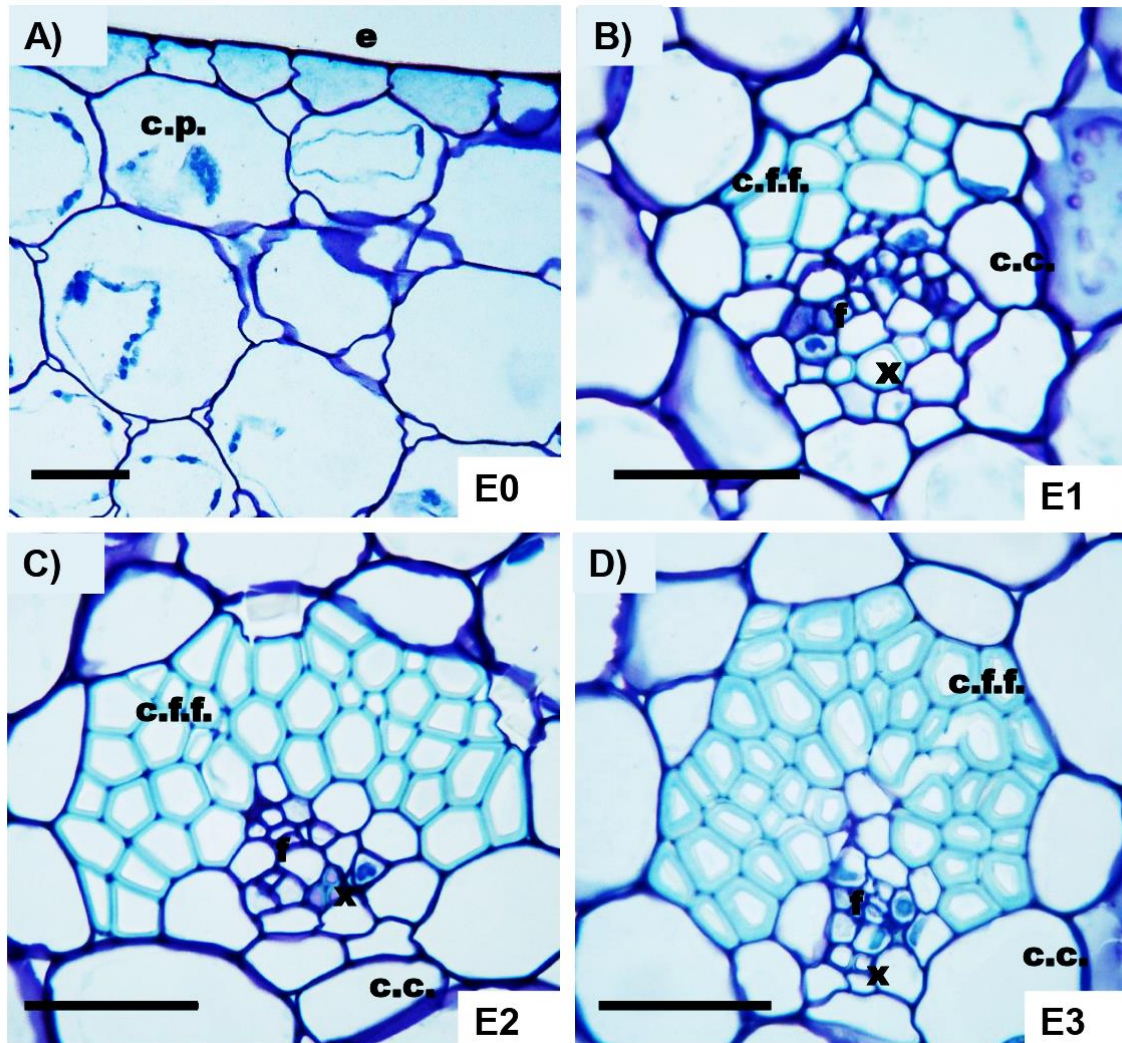


Figura 27. Fibras estructurales ubicadas en la parte abaxial de hoja en cuatro diferentes etapas de crecimiento de *A. fourcroydes* Lem. x; xilema, f; floema, f.a.f; capuchón de fibras asociadas a floema, f.x; fibras de xilema. Las micrografías corresponden a la sección C de la hoja. Barra de escala = 50 μ m.

8.5 Análisis del patrón de acumulación de lignina en las fibras de esclerénquima en cuatro diferentes etapas de desarrollo de plantas de bulbilo de *A. fourcroydes* Lem.

A partir del análisis histológico anteriormente descrito se observó que una de las principales características en la formación de fibras era el engrosamiento de las paredes secundarias, potencialmente relacionadas con un proceso de lignificación. Para esto aprovechamos la capacidad de autofluorescencia de la lignina bajo el espectro de luz UV (Albinsson *et al.*, 1999; Radotić *et al.*, 2006) para caracterizar a groso modo la acumulación de este componente de pared celular durante el desarrollo de las fibras (E0-E3). En E0, se puede observar que las únicas células lignificadas son los haces vasculares posteriormente se lignifican los capuchones de fibras asociados a floema (E1), y finalmente las fibras de xilema (E2 y E3) (Figura 28). Este incremento gradual en la acumulación de lignina a lo largo del desarrollo de la fibra es consistente con la cuantificación de este polímero (Figura 20). El análisis del patrón de lignificación de los 2 tipos de fibras también confirmó que las fibras estructurales abaxiales se diferencian antes que las halladas en el lado adaxiales, y que están más desarrolladas en la parte media (sección B) y apical de la hoja (sección A) comparado con la parte basal (sección C) (Figura 28). Ello es además consistente con lo que se observó en las tinciones histoquímicas realizadas (Figura 24).

En un trabajo recientemente publicado por Raya *et al.* (2020) reporta que en cortes transversales de hoja de tres diferentes especies Agaves (entre ellas el *A. fourcroydes* Lem.), la lignificación sólo ocurre en paredes secundarias de las células conductoras de xilema (vasos de xilema) que ayuda a mantener una estructura bajo presión negativa permitiendo el transporte de agua correctamente. Sin embargo, en nuestro análisis histológico se observa que existe lignificación tanto en las células conductoras del xilema como en el capuchón de fibras asociadas a floema y a xilema. Nuestros resultados también están en línea con lo reportado en *A. americana* L. y *A. tequilana* Weber donde también se observó un engrosamiento de

las paredes celulares de las fibras asociadas al xilema y al floema (Corbin *et al.*, 2015).

En alfalfa se ha encontrado que la lignificación del esclerénquima progresa en relación con varios factores como: edad del tejido, posición de la célula en los haces de fibras, capas de la pared celular. El proceso también puede mostrar algunas variaciones en relación con la posición de las fibras en la sección transversal de los haces de fibras (Vallet *et al.*, 1996). Algo semejante podemos observar en *A. fourcroydes* Lem. pues la lignificación tanto del xilema como de las fibras incrementa con respecto a la maduración de la planta e incluso se puede observar que el desarrollo las fibra abaxiales y adaxiales es diferente (Figuras 28, 29, 30 y 31).

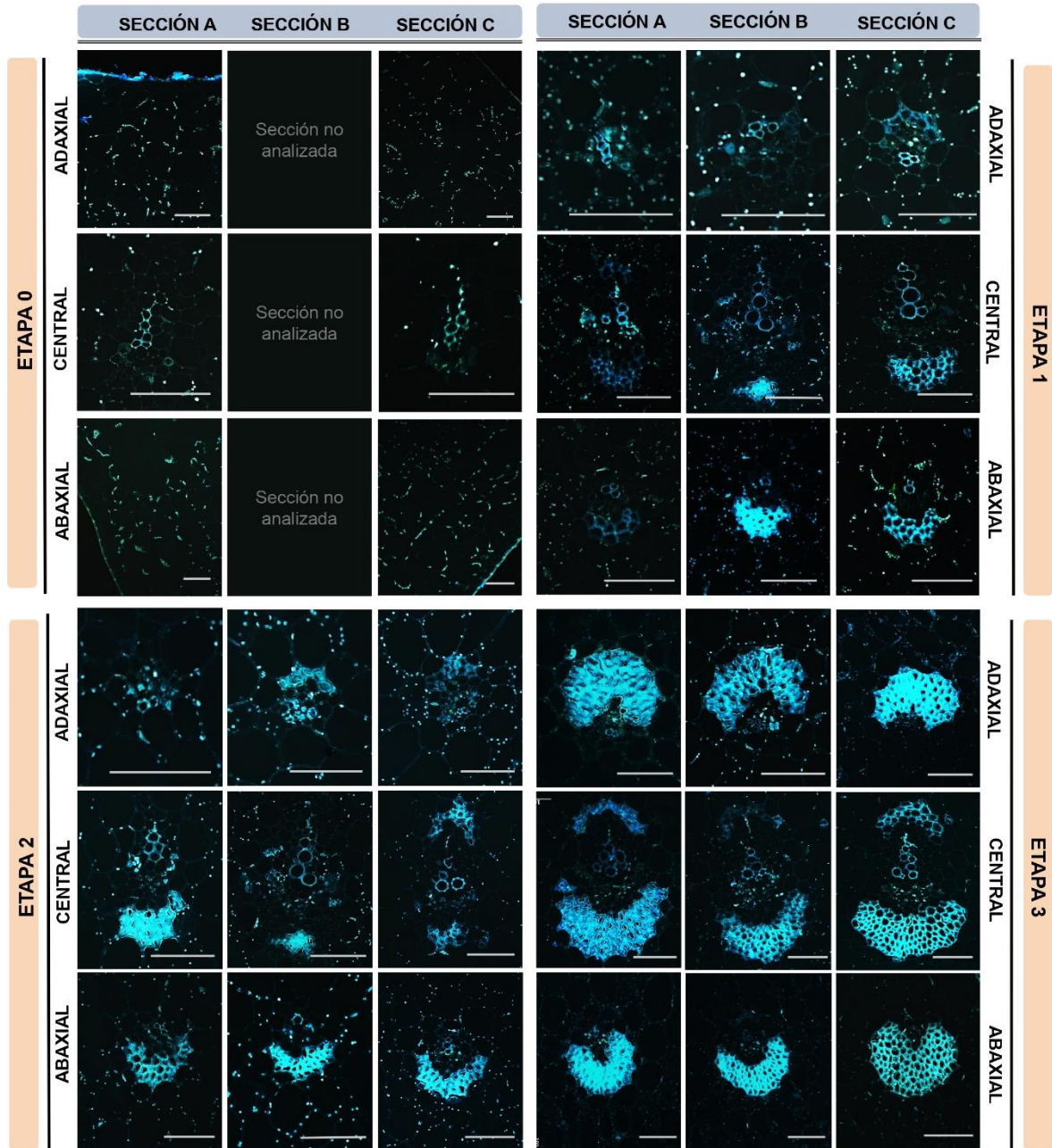


Figura 28. Análisis del patrón de acumulación de lignina en los diferentes tipos de fibras de hoja *A. fourcroydes* Lem. en cuatro diferentes etapas de crecimiento de por autofluorescencia. Barra de escala = 100 μ m.

En las Figuras 29, 30 y 31 se presenta un acercamiento de fibras de cinta, fibras ubicadas en la parte adaxial y abaxial de las cuatro etapas analizadas de *A. fourcroydes* Lem. Se puede observar de manera más detallada la acumulación de lignina. Los vasos de xilema (x) son los primeros en lignificarse, posteriormente se comienza a lignificar el capuchón de fibras asociadas a floema (c.f.f) y por último las fibras de xilema (f.x).

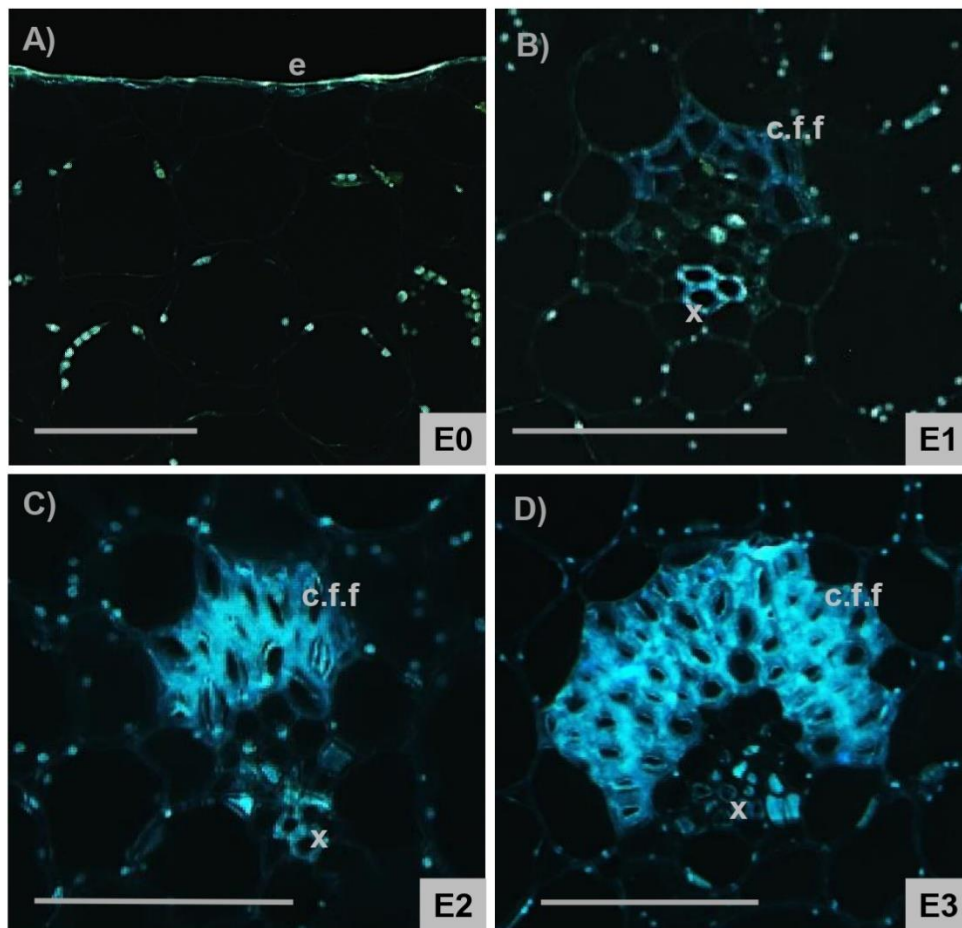


Figura 29. Fibras estructurales ubicadas en la parte adaxial de hoja en cuatro diferentes etapas de crecimiento de *A. fourcroydes* Lem. por fluorescencia. e; epidermis, x; xilema, c.f.f; capuchón de fibras asociadas a floema, f.x; fibras de xilema. Las micrografías corresponden a la sección C de la hoja. Barra de escala= 100 μ m.

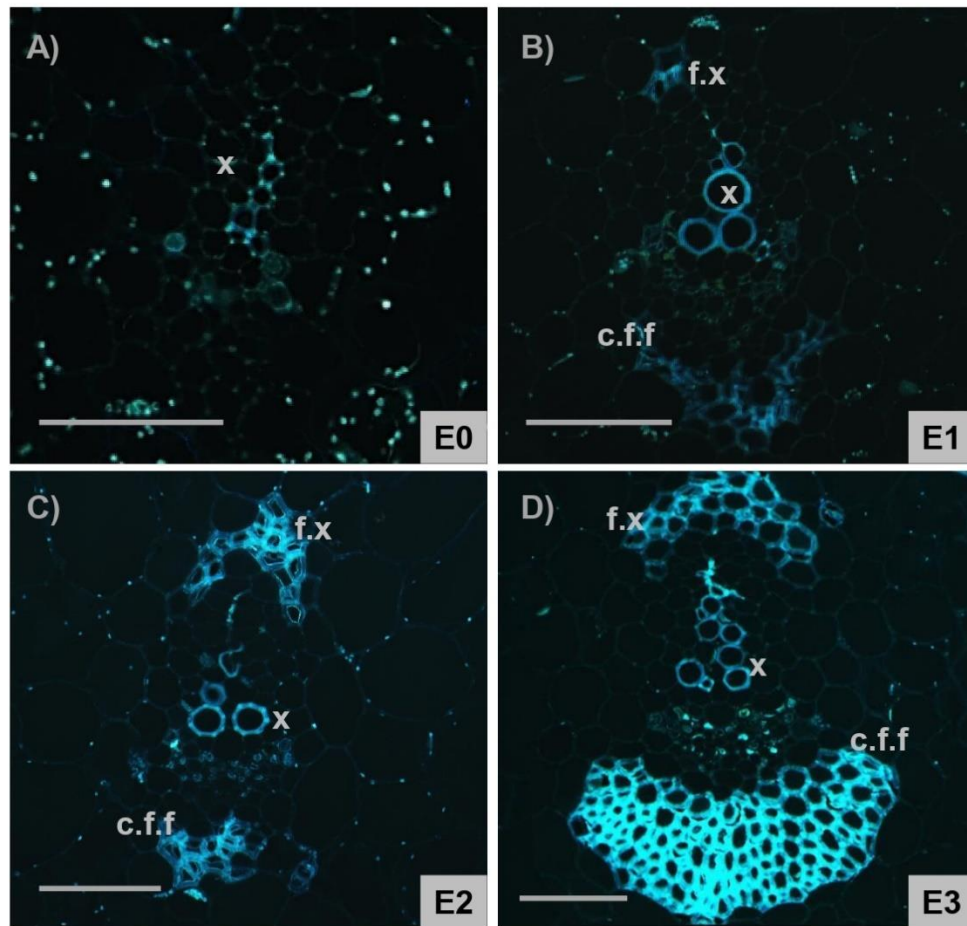


Figura 30. Fibras de cinta en cuatro diferentes etapas de crecimiento de *A. fourcroydes* Lem. por fluorescencia. e; epidermis, x; xilema, c.f.f; capuchón de fibras asociadas a floema, f.x; fibras de xilema. Las micrografías corresponden a la sección C de la hoja. Barra de escala= 100 μ m.

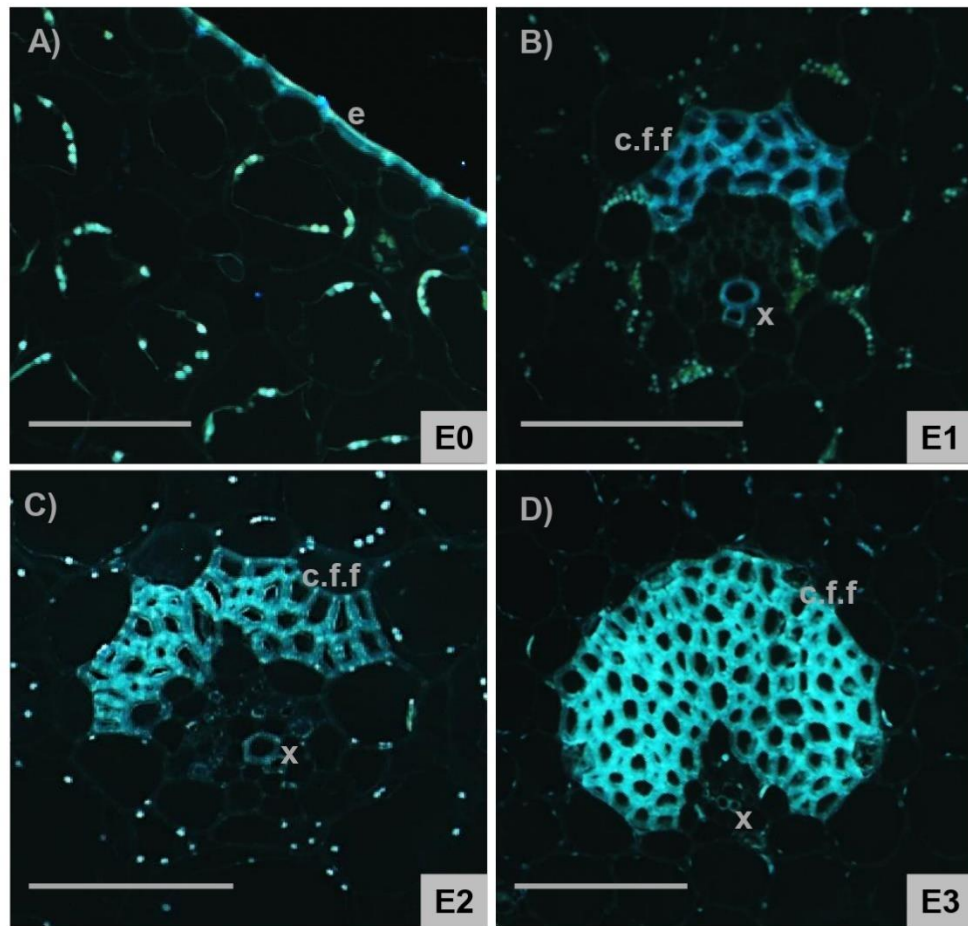


Figura 31. Fibras estructurales ubicadas en la parte abaxial de hoja en cuatro diferentes etapas de crecimiento de *A. fourcroydes* Lem. por fluorescencia. e; epidermis, x; xilema, c.f.f; capuchón de fibras asociadas a floema, f.x; fibras de xilema. Las micrografías corresponden a la sección C de la hoja. Barra de escala= 100 μ m.

8.6 Análisis de expresión por qRT-PCR de genes involucrados en la ruta de biosíntesis de celulosa y lignina en diferentes tejidos de *A. fourcroydes*

Para analizar experimentalmente la expresión de algunos genes involucrados en la biosíntesis de celulosa y lignina en *A. fourcroydes* Lem. se realizaron 2 experimentos. El primer experimento consistió en analizar la expresión de *SUS2*, *CESA1*, *CESA7*, *CCR2* y *CAD5* en raíces, rizomas, piña, hoja, tallo floral y flores. El segundo experimento consistió en analizar la expresión de *SUS2*, *CESA1*, *CESA7*, *CCR2* y *CAD5* en hojas y células adyacentes a fibras.

El primer paso fue obtener RNA de buena calidad de los diferentes tejidos para los ensayos RT-PCR punto final. La extracción y purificación de RNA total de los diferentes tejidos permitieron obtener un buen rendimiento de RNA total, a excepción de las muestras del análisis 2 (hojas y tejido adyacente a fibras). En el Cuadro 5 se muestra los rendimientos de cantidad y calidad de RNA de las muestras de los diferentes analizados de ambos experimentos. Se puede observar que, en ambos experimentos, las muestras tienen valores 260/280 cercanos a 2, el cual es un parámetro de calidad (Sambrook y Rusell, 2001; Kasem *et al.*, 2008; Jayasena *et al.*, 2014; Xiao *et al.*, 2013), mientras que la electroforesis muestra la ausencia de DNA genómico y la presencia de bandas bien definidas correspondientes a las subunidades grande y pequeña del RNA ribosomal (28S rRNA y 18S rRNA, respectivamente) (Figura 32).

Cuadro 5. Rendimiento y pureza del RNA total extraído de raíz, rizomas, piña, hoja, tallo floral y flores (análisis 1), y hojas y tejido adyacente a fibras (análisis 2) de *A. fourcroydes* Lem.

	Tejido	[ng/μL]	260/280
Análisis 1	Raíz	668.2	2.06
	Rizomas	492.9	2.06
	Piña	700.6	2.06
	Hoja	402.9	2.07
	Tallo floral	555.7	2.07
	Flores	505.9	2.07
Análisis 2	Tejido adyacente a fibras	70.3	2.09
	Hoja	128	2.08

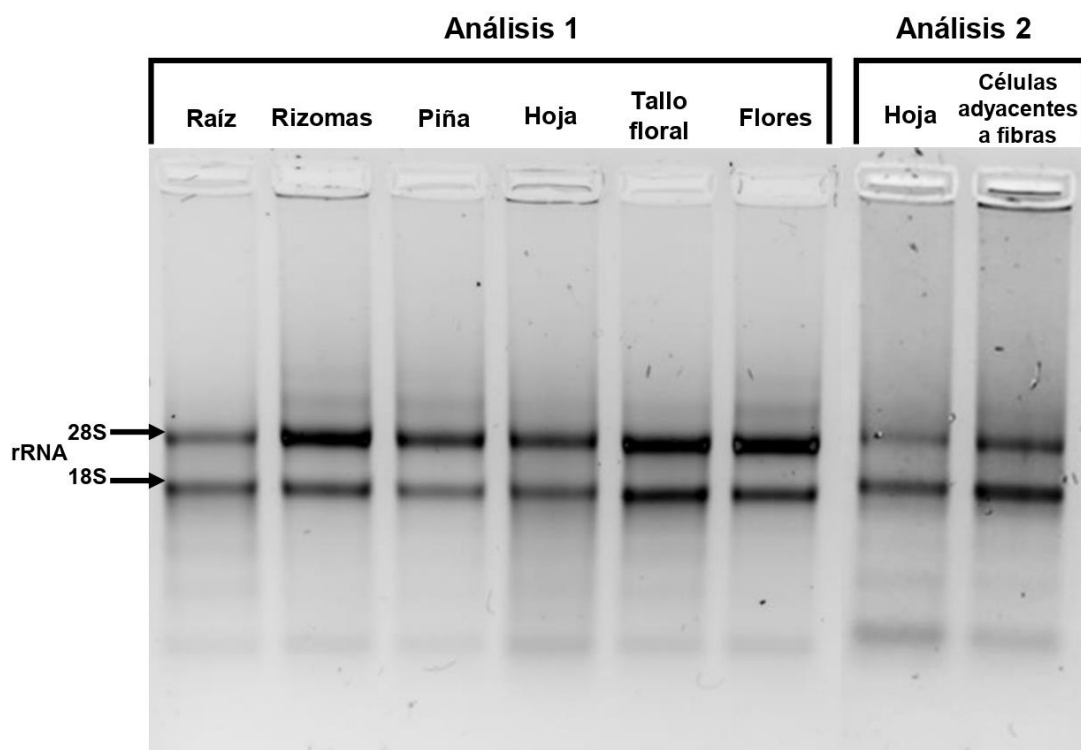


Figura 32. Análisis de la integridad de los RNAs extraídos de *A. fourcroydes* Lem. Gel de agarosa 1.5% teñido con bromuro de etidio en el que se observan los RNAs totales de raíz, rizomas, piña, hoja, tallo floral y flores (análisis 1), y hojas y células adyacentes a fibras (análisis 2) de *A. fourcroydes* Lem.

8.6.1 Análisis de expresión de los genes *SUS2*, *CESA1*, *CESA7*, *CCR2* y *CAD5* en raíz, rizomas, piña, hoja, tallo floral y flores de *A. fourcroydes* Lem.

Cinco genes seleccionados de la ruta de celulosa y lignina fueron analizados en diferentes tejidos de *A. fourcroydes* Lem. desde raíces hasta flores. Para celulosa, los genes *SUS2* y *CESA1* se expresaron mayormente en hoja, siendo *SUS2* el gen con el mayor nivel de expresión y comparado con el resto de los tejidos analizados (Figura 33A). Esto concuerda con lo reportado en *A. thaliana* L., donde el ortólogo *AtSUS2* es uno de los genes que mayormente se expresa en hojas respecto a otros órganos (Fernández *et al.*, 2011).

SUS cataliza la conversión reversible de sacarosa y un nucleósido difosfato en el nucleósido difosfato-glucosa y fructosa correspondiente. En *A. thaliana* L. se ha encontrado una posible participación de *SUS* en la biosíntesis de celulosa y almidón (Baroja-Fernández *et al.*, 2012; Volpicella *et al.*, 2012). En Agaves, las hojas tienen un alto contenido de celulosa y otros carbohidratos como fructanos que están conformados principalmente por fructosa (Suárez-González *et al.*, 2014; Corbin *et al.*, 2015), que pudieran ser productos derivados de la participación de *SUS*. En línea con ello, en *A. fourcroydes* Lem. *SUS2* se expresó mayormente en tejidos con mayor acumulación de glúcidos solubles como hoja, piña, tallo y se presentó en niveles muy bajos en raíz (Figura 33A).

Por otra parte, *CESA1* se ha reportado que se expresa en la pared primaria en *A. thaliana*. Al ser un gen involucrado en la biosíntesis de pared celular primaria sus niveles de expresión deberían homogéneos en todos los tejidos de *A. fourcroydes* Lem. como ocurre en otras especies como *Populus trichocarpa* Hook. (Takata *et al.*, 2015). Los resultados hallados aquí difieren de esto. *CESA1* fue hallado diferencialmente expresado en los tejidos evaluados; se expresa más en piña, hoja y flor, y escasamente detectado en el resto de los tejidos (Figura 33A). Para *CESA7*, los niveles de expresión estimados fueron muy bajos en todos los tejidos (Figura 33B). De acuerdo con diversos autores (Taylor *et al.*, 2003; Handakumbura *et al.*, 2013; Takata *et al.*, 2015), los ortólogos de este gen participan en la formación de

la pared secundaria en diversas especies como *A. thaliana* L., *Z. mays* L. *Oryza sativa* L. En los tejidos analizados de *A. fourcroydes* Lem., *CESA7* se expresa preferentemente en tallo floral y rizomas (Figura 33B), tejidos con alto contenido de celulosa asociado a la presencia de fibras, pero también se ha detectado en flor. La alta expresión de *CESA7* en tallo floral, pudiera corresponder a una mayor síntesis de celulosa proporcionándole más rigidez a este órgano, el cual puede llegar a tener una altura de 6 a 7 metros (García-Suárez y Serrano, 2012).

En el caso de los genes involucrados en la biosíntesis de lignina se evaluó la expresión de los genes *CCR2* y *CAD5*, ambos participan en el último paso en la ruta biosintética de lignina y modulan por tanto el contenido de lignina en plantas (Yan *et al.*, 2019). Nuestros resultados muestran que estos genes se expresaron mayormente en rizomas, siendo *CCR2* el gen con un nivel de expresión mayor superando a todos los tejidos analizados. En el caso de raíz, piña y hoja el gen que más se expresó también fue *CCR2*, aunque con un menor nivel de expresión que en rizomas. Por el contrario, en flores y tallo floral el gen más expresado fue *CAD5* (Figura 33C). Al igual que para *CESA7*, la expresión de *CAD5* en tallo floral, fue la segunda más alta después de rizoma, pudiera estar asociada a una alta producción de lignina en esta estructura de la planta de agave. Para rizoma, un órgano que, aunque hallado bajo el suelo no forma parte del sistema radical, la alta expresión de ambos genes, *CCR2* y *CAD5*, pudiera estar contribuir también a una elevada biosíntesis de lignina u otros metabolitos de la ruta de fenilpropanoides. En *A. tequilana* Weber, se ha reportado una alta concentración de compuestos fenólicos, incluidos lignina, en raíces (Maceda-López *et al.*, 2021).

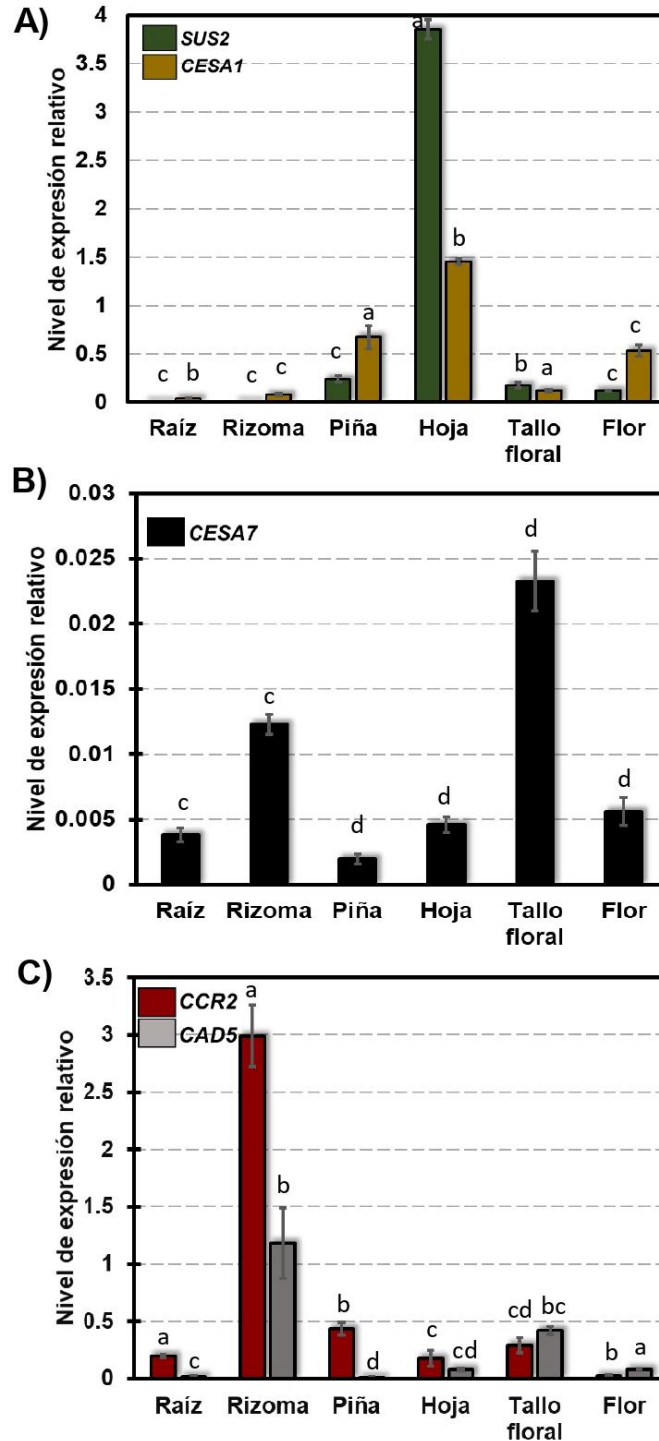


Figura 33. Análisis de expresión por qRT-PCR en tiempo real de los genes involucrados en la síntesis de celulosa y lignina. *SUS2* y *CESA1* (A), *CESA7* (B), *CCR2* y *CAD5* (C) en diferentes tejidos; raíz, rizomas, piña, hojas, tallo floral y flores de *A. fourcroydes* Lem. Las medias con la misma letra no son estadísticamente diferentes (Tukey, $\alpha = 0.05$).

8.6.2 Análisis de expresión de los genes *SUS2*, *CESA1*, *CESA7*, *CCR2* y *CAD5* en hojas y en el tejido adyacente a las fibras en *Agave fourcroydes* Lem.

Los niveles de expresión de los genes *SUS2*, *CESA1*, *CESA7*, *CCR2* y *CAD5* fueron diferenciales en los 2 tipos de muestras analizadas. En el caso de los genes involucrados en la ruta de celulosa, todos fueron hallados más expresados en tejido adyacente a fibra que en hojas completas, siendo el gen mayor expresado *CESA7*, seguido de *CESA1* y *SUS2*. El gen *CCR2* fue 2 veces más inducido, mientras que *CAD5* fue más de 5 veces más expresado en células cercanas a las fibras que en muestras de hojas completas (Figura 34A). Actualmente se conoce que *CAD5* es específico de pared secundaria, y se ha reportado que *AtqCAD5* y *AdCAD5* son los únicos genes en *A. tequilana* Weber y *A. deserti* Engelm. respectivamente, que pertenecen a la clase I de los genes *CAD* que es donde se ubican los genes *CAD bona fide*, genes con una participación real en la biosíntesis de lignina (Maceda-López, 2020). En nuestros resultados, la alta expresión de genes clave en la síntesis de celulosa y lignina en tejido cercano a fibras sugiere que las células de la periferia de las fibras pudieran contribuir al desarrollo de estas. Ello sería similar a lo que ocurre en los elementos traquearios (ET) que conforman el xilema en *A. thaliana* L., donde se ha reportado la teoría cooperativa, la cual describe que las células circundantes a los ET colaboran en la síntesis de los compuestos lignocelulósicos como lignina, que comprenden la pared secundaria de los ET (Smith *et al.*, 2013; Pesquet *et al.*, 2013; Serk *et al.*, 2015). Se ha encontrado la expresión de genes relacionados con la síntesis de lignina como *CAD* y *CCR*, en células vecinas o en las células en proceso de lignificación en *A. thaliana* L. que confirman esta teoría (Serk *et al.*, 2015; Voxeur *et al.*, 2015).

En las fibras extraxilares, como las presentes en *A. fourcroydes* Lem., y las esclereidas que componen el esclerénquima, la lignificación de las paredes secundarias ocurre mientras las células lignificantes aún están vivas y se detiene solo después de la muerte celular programada. En este caso, cada célula lignificante controla todo el proceso de su propia lignificación y por lo tanto se somete a lignificación celular autónoma (Voxeur *et al.*, 2015). De nuestros resultados

presentados en Figura 34, se sugiere que tanto las células adyacentes a fibras o las mismas fibras en desarrollo, pudieran también contribuir a la síntesis de compuestos lignocelulósicos para las paredes secundarias de las fibras.

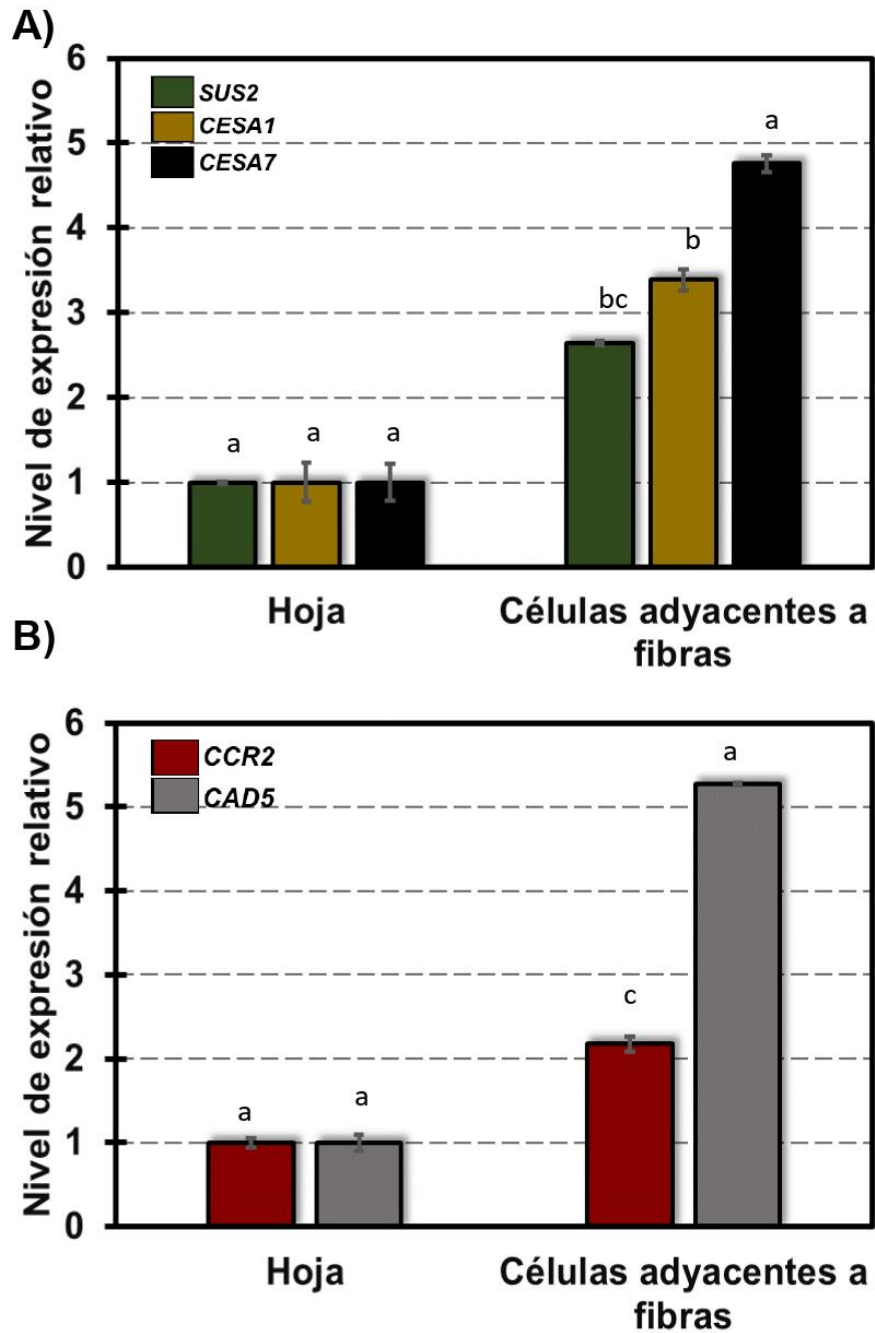


Figura 34. Análisis de expresión por qRT-PCR en tiempo real de los genes involucrados en la síntesis de celulosa y lignina. *SUS2*, *CESA1* y *CESA7* (A), *CCR2* y *CAD5* (B) en hoja y tejido adyacente a fibras de *A. fourcroydes* Lem. Las medias con la misma letra no son estadísticamente diferentes (Tukey, $\alpha = 0.05$).

IX CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

9.1 Conclusiones

- Los estudios de la acumulación de los compuestos lignocelulósicos de las fibras demostraron que existen cambios en la concentración de lignina, celulosa y otros carbohidratos durante la formación de las fibras de *A. fourcroydes* Lem. Estos resultados fueron confirmados por análisis histoquímicos.
- En el análisis histológico se mostró un breve panorama de la morfología de las fibras de *A. fourcroydes* Lem. señalando diferencias en el proceso de desarrollo de fibras estructurales y de cinta por primera vez.
- El análisis de expresión de genes involucrados en la biosíntesis de lignina y celulosa, presentó un mayor nivel de expresión de estos genes en el tejido adyacente a fibras. Los patrones observados sugieren un mecanismo de cooperativismo durante la lignificación de la fibra.
- La información actual de las fibras de esclerénquima no es suficiente para entender completamente su proceso de desarrollo, también mucha información acerca de las células lignificadas proviene de modelos de plantas como *Arabidopsis thaliana* L. y *Zinnia elegans* L. que carecen de fibras de esclerénquima. Nuestros datos indican que los agaves pudieran ser buenos modelos para el estudio de este tipo de fibras en hojas, además de ser plantas con interés biotecnológico.

9.2 Perspectivas

- Corroborar la correlación del contenido de celulosa y lignina con los genes involucrados en la ruta de biosíntesis en etapas de desarrollo contrastantes.
- Para ampliar los análisis histológicos, se sugiere realizar tinciones que identifiquen las pectinas en fibras. Así, como realizar este tipo de estudios en fibras de plantas mucho más grandes.
- Para tener un conocimiento más amplio acerca desarrollo de las fibras de manera molecular es indispensable identificar y caracterizar los genes involucrados en las rutas de los metabolitos que conforman las fibras principalmente de celulosa y lignina en *A. fourcroydes*. Aquí sería posible usar un análisis bioinformático de los transcriptomas ya publicados o generarlos de Novo.
- Sería de utilidad identificar de manera *in situ* las proteínas codificadas por los genes que participan en la ruta de los metabolitos que conforman a las fibras.

X. LITERATURA CITADA

García-Mendoza A. 2007. Los agaves de México. *CIENCIAS*, 87, 14-23

Chandramohan, D., & Marimuthu, K. (2011). A review on natural fibers. *International Journal of Research and Reviews in Applied Sciences*, 8(2), 194-206.

Bhattacharyya, D., Subasinghe, A., & Kim, N. K. (2015). Natural fibers: Their composites and flammability characterizations. *Multifunctionality of Polymer Composites: Challenges and New Solutions*, 1st ed.; Friedrich, K., Breuer, U., Eds, 102-143.

Kılınç, A. Ç., Durmuşkahya, C., & Seydibeyoğlu, M. Ö. (2017). Natural fibers. In *Fiber Technology for Fiber-Reinforced Composites* (pp. 209-235). Woodhead Publishing.

M. R. Sanjay, G. R. Arpitha, L. Laxmana Naik, K. Gopalakrishna, B. Yogesha (2016) Applications of Natural Fibers and Its Composites: An Overview. *Natural resources*, 7, 108-114.

Faruk, O., Bledzki, A. K., Fink, H. P., & Sain, M. (2012). Biocomposites reinforced with natural fibers: 2000–2010. *Progress in polymer science*, 37(11), 1552-1596.

Güven, O., Monteiro, S. N., Moura, E. A., & Drelich, J. W. (2016). Re-emerging field of lignocellulosic fiber–polymer composites and ionizing radiation technology in their formulation. *Polymer Reviews*, 56(4), 702-736.

Narváez-Zapata, J. A., & Sánchez-Teyer, L. F. (2010). *Agaves as a raw material: recent technologies and applications*. *Recent Patents on Biotechnology*, 3(3), 185-191.

C. Gonzalez-Murillo and M. P. Ansell (2009) Mechanical properties of henequen fibre/epoxy resin composites. *Mechanics of Composite Materials*, 45, 435-442.

Delmer, D. P., & Amor, Y. (1995). Cellulose biosynthesis. *The plant cell*, 7(7), 987.

Komuraiah, A., Kumar, N. S., & Prasad, B. D. (2014). Chemical Composition of Natural Fibers and its Influence on their Mechanical Properties. *Mechanics of Composite Materials*, 50(3), 359–376.

Moore, K. J., & Jung, H. J. G. (2006). Lignin and fiber digestion. *Journal of Range Management*, 54(4).

Vanholme, R., Demedts, B., Morreel, K., Ralph, J., & Boerjan, W. (2010). *Lignin biosynthesis and structure*. *Plant physiology*, 153(3), 895-905.

Pauly, M., Gille, S., Liu, L., Mansoori, N., de Souza, A., Schultink, A., & Xiong, G. (2013). Hemicellulose biosynthesis. *Planta*, 238(4), 627-642.

Aguilar-Vega, M., & Cruz-Ramos, C. A. (1995). Properties of henequen cellulosic fibers. *Journal of Applied Polymer Science*, 56(10), 1245–1252.

Mamman, A. S., Lee, J. M., Kim, Y. C., Hwang, I. T., Park, N. J., Hwang, Y. K., ... & Hwang, J. S. (2008). Furfural: Hemicellulose/xyloxyderived biochemical. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining: Innovation for a sustainable economy*, 2(5), 438-454.

Boerjan, W., Ralph, J., & Baucher, M. (2003). LIGNIN BIOSYNTHESIS. *Annual Review of Plant Biology*, 54(1), 519–546.

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

Li, Y., Mai, Y.-W., & Ye, L. (2000). Sisal fibre and its composites: a review of recent developments. *Composites Science and Technology*, 60(11), 2037–2055.

da Cunha, C. M., de Almeida Peixoto, M. Q., & dos Santos Conceição, S Magaton Andréia S. (2015) Hemicelluloses extraction from Agave sisalana and Hybrid 11648. the International Colloquium on Eucalyptus Pulp,

Corbin, K. R., Byrt, C. S., Bauer, S., DeBolt, S., Chambers, D., Holtum, J. A., ... & Bacic, A. (2015). Prospecting for energy-rich renewable raw materials: Agave leaf case study. *PLoS One*, 10(8).

Stewart, D., Azzini, A., Hall, A. T., & Morrison, I. M. (1997). Sisal fibres and their constituent non-cellulosic polymers. *Industrial Crops and Products*, 6(1), 17-26.

Rosli, N. A., Ahmad, I., & Abdullah, I. (2013). Isolation and characterization of cellulose nanocrystals from Agave angustifolia fibre. *BioResources*, 8(2), 1893-1908.

Ek, A. M. D. (2015). Efecto de un agente de acoplamiento natural sobre las propiedades mecánicas de un material compuesto polipropileno/henequén. Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY), 15.

Bezazi, A., Belaadi, A., Bourchak, M., Scarpa, F., & Boba, K. (2014). Novel extraction techniques, chemical and mechanical characterisation of Agave americana L. natural fibres. *Composites Part B: Engineering*, 66, 194-203.

Lerouxel, O., Cavalier, D. M., Liepman, A. H., & Keegstra, K. (2006). Biosynthesis of plant cell wall polysaccharides—a complex process. *Current opinion in plant biology*, 9(6), 621-630.

Polko, J. K., & Kieber, J. J. (2019). The regulation of cellulose biosynthesis in plants. *The Plant Cell*, 31(2), 282-296.

McNamara, J. T., Morgan, J. L., & Zimmer, J. (2015). A molecular description of cellulose biosynthesis. *Annual review of biochemistry*, 84, 895-921.

Umaiya, K., Chowdhury, A. S., & Khan, R. A. (2017). Fabrication and Characterization of Antibacterial and Biodegradable Facial Tissue Papers Using Bio-based Raw Materials: Effect of Glycerin. *Journal of Research Updates in Polymer Science*, 6(4), 126-133.

Brown Jr, R. M., Saxena, I. M., & Kudlicka, K. (1996). Cellulose biosynthesis in higher plants. *Trends in plant science*, 1(5), 149-156.

Jabbar, A. (2017). *Sustainable Jute-Based Composite Materials: Mechanical and Thermomechanical Behaviour*. Springer.

Lee, H. V., Hamid, S. B. A., & Zain, S. K. (2014). Conversion of lignocellulosic biomass to nanocellulose: structure and chemical process. *The Scientific World Journal*, 2014.

Vanholme, R., De Meester, B., Ralph, J., & Boerjan, W. (2019). Lignin biosynthesis and its integration into metabolism. *Current opinion in biotechnology*, 56, 230-239.

Zhao, Q. (2016). Lignification: flexibility, biosynthesis and regulation. *Trends in plant science*, 21(8), 713-721.

Meents, M. J., Watanabe, Y., & Samuels, A. L. (2018). The cell biology of secondary cell wall biosynthesis. *Annals of Botany*, 121(6), 1107-1125.

Vanholme, R., Demedts, B., Morreel, K., Ralph, J., & Boerjan, W. (2010). Lignin biosynthesis and structure. *Plant physiology*, 153(3), 895-905.

Crivellaro, A., & Büntgen, U. (2020). New Evidence of Thermally Constrained Plant Cell Wall Lignification. *Trends in Plant Science*.

Crang, R., Lyons-Sobaski, S., & Wise, R. (2018). *Plant anatomy: a concept-based approach to the structure of seed plants*. Springer

Van Acker, R., Vanholme, R., Storme, V., Mortimer, J. C., Dupree, P., & Boerjan, W. (2013). Lignin biosynthesis perturbations affect secondary cell wall composition and saccharification yield in *Arabidopsis thaliana*. *Biotechnology for biofuels*, 6(1), 46.

Kumar, M., Campbell, L., & Turner, S. (2016). Secondary cell walls: biosynthesis and manipulation. *Journal of experimental botany*, 67(2), 515-531.

Barros, J., Serk, H., Granlund, I., & Pesquet, E. (2015). The cell biology of lignification in higher plants. *Annals of botany*, 115(7), 1053-1074.

Smith, R. A., Schuetz, M., Roach, M., Mansfield, S. D., Ellis, B., & Samuels, L. (2013). Neighboring parenchyma cells contribute to *Arabidopsis* xylem lignification, while lignification of interfascicular fibers is cell autonomous. *The Plant Cell*, 25(10), 3988-3999.

Iakimova, E. T., & Woltering, E. J. (2017). Xylogenesis in zinnia (*Zinnia elegans*) cell cultures: unravelling the regulatory steps in a complex developmental programmed cell death event. *Planta*, 245(4), 681-705.

Zhong, R., Cui, D., & Ye, Z. H. (2019). Secondary cell wall biosynthesis. *New Phytologist*, 221(4), 1703-1723.

Ménard, D., & Pesquet, E. (2015). Cellular interactions during tracheary elements formation and function. *Current opinion in plant biology*, 23, 109-115.

Sorieul, M., Dickson, A., Hill, S. J., & Pearson, H. (2016). Plant fibre: molecular structure and biomechanical properties, of a complex living material, influencing its deconstruction towards a biobased composite. *Materials*, 9(8), 618.

Gui, J., Lam, P. Y., Tobimatsu, Y., Sun, J., Huang, C., Cao, S., ... & Li, L. (2020). Fibre-specific regulation of lignin biosynthesis improves biomass quality in *Populus*. *New Phytologist*, 226(4), 1074-1087.

Zhang, J., Tuskan, G. A., Tschaplinski, T. J., Muchero, W., & Chen, J. G. (2020). Transcriptional and post-transcriptional regulation of lignin biosynthesis pathway genes in *Populus*. *Frontiers in Plant Science*, 11.

Ryu, J., Kwon, S. J., Sung, S. Y., Kim, W. J., Kim, D. S., Ahn, J. W., ... & Kang, S. Y. (2016). Molecular cloning, characterization, and expression analysis of lignin biosynthesis genes from kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.). *Genes & Genomics*, 38(1), 59-67.

Feng, H., Xu, L., Wang, Y., Tang, M., Zhu, X., Zhang, W., ... & Liu, L. (2017). Identification of critical genes associated with lignin biosynthesis in radish (*Raphanus sativus* L.) by de novo transcriptome sequencing. *Molecular Genetics and Genomics*, 292(5), 1151-1163.

Vanholme, R., Cesarino, I., Rataj, K., Xiao, Y., Sundin, L., Goeminne, G., ... & Welsh, L. (2013). Caffeoyl shikimate esterase (CSE) is an enzyme in the lignin biosynthetic pathway in *Arabidopsis*. *Science*, 341(6150), 1103-1106.

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.

Tang, Y., Liu, F., Xing, H., Mao, K., Chen, G., Guo, Q., & Chen, J. (2019). Correlation analysis of lignin accumulation and expression of key genes involved in lignin biosynthesis of ramie (*Boehmeria nivea*). *Genes*, 10(5), 389.

Ma, Q. H. (2010). Functional analysis of a cinnamyl alcohol dehydrogenase involved in lignin biosynthesis in wheat. *Journal of Experimental Botany*, 61(10), 2735-2744.

Sibout, R., Eudes, A., Mouille, G., Pollet, B., Lapierre, C., Jouanin, L., & Séguin, A. (2005). CINNAMYL ALCOHOL DEHYDROGENASE-C and-D are the primary genes involved in lignin biosynthesis in the floral stem of *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 17(7), 2059-2076.

Wang, G. L., Huang, Y., Zhang, X. Y., Xu, Z. S., Wang, F., & Xiong, A. S. (2016). Transcriptome-based identification of genes revealed differential expression profiles and lignin accumulation during root development in cultivated and wild carrots. *Plant cell reports*, 35(8), 1743-1755.

Bell, W. H., & King, C. J. (1944). Methods for the identification of the leaf fibers of mesquite (*Agave*), yucca (*Yucca*), beargrass (*Nolina*) and sotol (*Dasyliroton*). *American Antiquity*, 10(2), 150-160.

Spanghel, A. W. (1933). A study of *Agave applanata*, var. *huachucensis*.

Kim M. H., Cho J. S., Jeon H. W., Sangsawang K., Shim D., Choi Y. I., et al. (2019). Wood transcriptome profiling identifies critical pathway genes of secondary wall biosynthesis and novel regulators for vascular cambium development in populus. *Genes (Basel)* 10 E690.

Lopez, F. B., & Barclay, G. F. (2017). Plant anatomy and physiology. In *Pharmacognosy* (pp. 45-60). Academic Press.

Büdel, B., & Scheidegger, C. (1996). Thallus morphology and anatomy. *Lichen biology*, 2, 40-68.

Bell, W. H., & King, C. J. (1944). Methods for the identification of the leaf fibers of mescal (Agave), yucca (Yucca), beargrass (Nolina) and sotol (Dasylirion). *American Antiquity*, 10(2), 150-160.

de Andrade Silva, F., Chawla, N., & de Toledo Filho, R. D. (2008). Tensile behavior of high performance natural (sisal) fibers. *Composites Science and Technology*, 68(15-16), 3438-3443.

Maiti, R. K., & Garza de la Riba, M. G. (1992). General morphology, growing conditions and development of fiber filaments in lechuguilla (Agave lecheguilla Torr.). *turrialba*, 42, 299-299.

Fidelis, M. E. A., Pereira, T. V. C., Gomes, O. D. F. M., de Andrade Silva, F., & Toledo Filho, R. D. (2013). The effect of fiber morphology on the tensile strength of natural fibers. *Journal of Materials Research and Technology*, 2(2), 149-157.

Hidalgo-Reyes, M., Caballero-Caballero, M., Hernández-Gómez, L. H., & Urriolagoitia-Calderón, G. (2015). Chemical and morphological characterization of Agave angustifolia bagasse fibers. *Botanical Sciences*, 93(4), 807-817.

Oksman, K., Wallström, L., Berglund, L. A., & Filho, R. D. T. (2002). Morphology and mechanical properties of unidirectional sisal–epoxy composites. *Journal of Applied Polymer Science*, 84(13), 2358-2365.

Van Dam, J. E. G., & Gorshkova, T. A. (2003). Cell walls and Fibers| Fiber formation.

Sorieul, M., Dickson, A., Hill, S. J., & Pearson, H. (2016). Plant fibre: molecular structure and biomechanical properties, of a complex living material, influencing its deconstruction towards a biobased composite. *Materials*, 9(8), 618.

Serk, H., Gorzsás, A., Tuominen, H., & Pesquet, E. (2015). Cooperative lignification of xylem tracheary elements. *Plant signaling & behavior*, 10(4), e1003753.

Dixon, R. A., & Barros, J. (2019). Lignin biosynthesis: old roads revisited and new roads explored. *Open biology*, 9(12), 190215.

Bell, W. H., & King, C. J. (1944). Methods for the identification of the leaf fibers of mescal (Agave), yucca (Yucca), beargrass (Nolina) and sotol (Dasylirion). *American Antiquity*, 10(2), 150-160.

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.

Galinousky, D., Padvitski, T., Bayer, G., Pirko, Y., Pydiura, N., Anisimova, N., ... & Blume, Y. (2019). Expression analysis of cellulose synthase and main cytoskeletal protein genes in flax (*Linum usitatissimum* L.). *Cell biology international*, 43(9), 1065-1071.

Newaskar, G. S., Chimote, V. P., Mehetre, S. S., Pawar, B. D., Kale, A. A., & Jadhav, A. S. (2017). Different cellulose synthase genes are prominently expressed during fiber elongation in *Gossypium arboreum* and *G. hirsutum*.

Sahu, P., and M. K. Gupta. 2017. Sisal (*Agave sisalana*) fiber and its polymer-based composites: A review on current developments. *Journal of Reinforced Plastics and Composites* 1–22

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.

Preisner, M., Wojtasik, W., Kostyn, K., Boba, A., Czuj, T., Szopa, J., & Kulma, A. (2018). The cinnamyl alcohol dehydrogenase family in flax: differentiation during plant growth and under stress conditions. *Journal of plant physiology*, 221, 132-143.

Cheng, X., Li, M., Li, D., Zhang, J., Jin, Q., Sheng, L., ... & Lin, Y. (2017). Characterization and analysis of CCR and CAD gene families at the whole-genome level for lignin synthesis of stone cells in pear (*Pyrus bretschneideri*) fruit. *Biology open*, 6(11), 1602-1613.

Lerat, S., Simao-Beaunoir, A. M., Wu, R., Beaudoin, N., & Beaulieu, C. (2010). Involvement of the plant polymer suberin and the disaccharide cellobiose in triggering thaxtomin A biosynthesis, a phytotoxin produced by the pathogenic agent *Streptomyces scabies*. *Phytopathology*, 100(1), 91-96.

Benítez-Guerrero, M., López-Beceiro, J., Sánchez-Jiménez, P. E., & Pascual-Cosp, J. (2014). Comparison of thermal behavior of natural and hot-washed sisal fibers based on their main components: Cellulose, xylan and lignin. TG-FTIR analysis of volatile products. *Thermochimica Acta*, 581, 70-86.

Madhu, P., Sanjay, M. R., Jawaid, M., Siengchin, S., Khan, A., & Pruncu, C. I. (2020). A new study on effect of various chemical treatments on *Agave Americana* fiber for composite reinforcement: Physico-chemical, thermal, mechanical and morphological properties. *Polymer Testing*, 85, 106437.

Raya, F. T., Marone, M. P., Carvalho, L. M., Rabelo, S. C., Paula, M. S., Campanari, M. F. Z., ... & Carazzolle, M. F. (2020). Transcriptome analysis of three *Agave* fiber-

producing cultivars suitable for biochemicals and biofuels production in semiarid regions. bioRxiv.

Morán-Velázquez, D. C., Monribot-Villanueva, J. L., Bourdon, M., Tang, J. Z., López-Rosas, I., Maceda-López, L. F., ... & Azadi, P. (2020). Unravelling Chemical Composition of Agave Spines: News from *Agave fourcroydes* Lem. *Plants*, 9(12), 1642.

Morris, H., Plavcová, L., Cvecko, P., Fichtler, E., Gillingham, M. A., Martínez-Cabrera, H. I., ... & Jansen, S. (2016). A global analysis of parenchyma tissue fractions in secondary xylem of seed plants. *New Phytologist*, 209(4), 1553-1565.

Harholt, J., Suttangkakul, A., & Scheller, H. V. (2010). Biosynthesis of pectin. *Plant physiology*, 153(2), 384-395.

Volpicella, M., Fanizza, I., Leoni, C., Gadaleta, A., Nigro, D., Gattulli, B., ... & Ceci, L. R. (2016). Identification and characterization of the sucrose synthase 2 gene (*Sus2*) in durum wheat. *Frontiers in Plant Science*, 7, 266.

Baroja-Fernández, E., Muñoz, F. J., Li, J., Bahaji, A., Almagro, G., Montero, M., ... & Pozueta-Romero, J. (2012). Sucrose synthase activity in the *sus1/sus2/sus3/sus4* *Arabidopsis* mutant is sufficient to support normal cellulose and starch production. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(1), 321-326.

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.

O'Brien, T., Feder, N., & McCully, M. E. (1964). Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma*, 59(2), 368-373.

Ribeiro, V. C., & Leitão, C. A. E. (2019). Utilisation of Toluidine blue O pH 4.0 and histochemical inferences in plant sections obtained by free-hand. *Protoplasma*, 257(3), 993-1008.

Albinsson, B., Li, S., Lundquist, K., & Stomberg, R. (1999). The origin of lignin fluorescence. *Journal of Molecular Structure*, 508(1-3), 19-27.

Radotić, K., Kalauzi, A., Djikanović, D., Jeremić, M., Leblanc, R. M., & Cerović, Z. G. (2006). Component analysis of the fluorescence spectra of a lignin model compound. *Journal of photochemistry and Photobiology B: Biology*, 83(1), 1-10.

Gigli-Bisceglia, N., Engelsdorf, T., & Hamann, T. (2020). Plant cell wall integrity maintenance in model plants and crop species-relevant cell wall components and underlying guiding principles. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 77(11), 2049-2077.

Goudenhooff, C., Bourmaud, A., & Baley, C. (2019). Flax (*Linum usitatissimum* L.) fibers for composite reinforcement: exploring the link between plant growth, cell walls development, and fiber properties. *Frontiers in plant science*, 10, 411.

His, I., Andeme-Onzighi, C., Morvan, C., & Driouich, A. (2001). Microscopic studies on mature flax fibers embedded in LR white: immunogold localization of cell wall matrix polysaccharides. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 49(12), 1525-1535.

García-Suárez M. D. y Serrano H. (2012). *Agave fourcroydes* y sus perspectivas. *Tecnoagro*. 78.

XI. ANEXOS

Cuadro 6. Altura de los bulbilos utilizados en los análisis histológicos y perfiles de carbohidratos y lignina.

Etapa	Rango de altura (cm)
0	2 – 3
1	3.5 – 8.5
2	11.5 – 21.5
3	25 – 33

Cuadro 7. Altura de los hijuelos y plantas adultas utilizadas en los análisis histológicos y perfiles de carbohidratos y lignina.

Etapa	Rango de altura (cm)
0	No determinada
1	12 – 18
2	32 – 39
3	113 – 148

Cuadro 8. Resultados de los análisis estadísticos del perfil de carbohidratos en tejido parenquimatoso bulbilos.

Monosacárido	Tratamientos		
	E1	E2	E3
Glucosa	223.95 a	222.76 a	224.12 a
Xilosa	24.141 a	29.334 a	26.079 a
Arabinosa	11.795 a	14.684 a	15.038 a
Manosa	15.635 a	15.183 a	15.911 a
Ramnosa	3.5954 a	4.1210 a	4.0768 a
Fucosa	2.5053 a	2.4370 a	2.5748 a
Celobiosa	3.0834 a	3.1976 a	2.8363 a
Ribosa	0.09235 a	0.20376 a	0.15178 a

Medias con la misma letra por fila no son estadísticamente diferentes (Tukey, $\alpha = 0.05$).

Cuadro 9. Resultados de los análisis estadísticos del perfil de carbohidratos en fibras de bulbilos.

Monosacárido	Tratamientos		
	E1	E2	E3
Glucosa	N.d.	418.25 a	415.03 a
Xilosa	N.d.	121.36 a	117.55 a
Arabinosa	N.d.	5.9624 a	4.9441 a
Manosa	N.d.	2.194 a	8.792 a
Ramnosa	N.d.	3.7322 a	1.8315 a
Fucosa	N.d.	2.6733 a	1.2949 a
Celobiosa	N.d.	2.8167 a	2.6580 a

Medias con la misma letra por fila no son estadísticamente diferentes (Tukey, $\alpha = 0.05$).

Cuadro 10. Resultados de los análisis estadísticos del perfil de carbohidratos en hijuelos y plantas adultas.

Monosacárido	Tratamientos		
	E1	E2	E3
Glucosa	270.03 b	264.68 b	349.57 a
Xilosa	75.145 b	102.550 a	114.641 a
Arabinosa	4.3830 a	2.7174 b	2.6263 b
Ramnosa	0.93162 a	0.86873 a	0.89490 a
Fucosa	0.6936 a	0.6066 a	0.7480 a
Celobiosa	3.441 b	10.209 a	7.457 ab

Medias con la misma letra por fila no son estadísticamente diferentes (Tukey, $\alpha = 0.05$).

Cuadro 11. Resultados de los análisis estadísticos del perfil de acumulación de lignina en tejido parenquimatoso bulbilos.

Lignina	Tratamientos		
	E1	E2	E3
Lignina total	7.275 a	8.275 a	7.425 a
Lignina S	2.4000 a	2.7750 a	3.0250 a
Lignina G	3.3500 a	4.0750 a	3.3000 a
Lignina H	0.2000 a	0.1750 a	0.2000 a
Lignina SG	0.7050 a	0.6900 a	0.9550 a

Medias con la misma letra por fila no son estadísticamente diferentes (Tukey, $\alpha = 0.05$)

Cuadro 12. Resultados de los análisis estadísticos del perfil de acumulación de lignina en fibras bulbilos.

Lignina	Tratamientos		
	E1	E2	E3
Lignina	N.d.	8.0250 a	9.5750 a
Lignina S	N.d.	2.7750 a	3.5250 a
Lignina G	N.d.	3.5000 b	4.3000 a
Lignina H	N.d.	0.2750 a	0.1250 a
Lignina SG	N.d.	0.7925 a	0.8300 a

Medias con la misma letra por fila no son estadísticamente diferentes (Tukey, $\alpha = 0.05$)

Cuadro 13. Resultados de los análisis estadísticos del perfil de acumulación de lignina en hijuelos y plantas adultas.

Lignina	Tratamientos		
	E1	E2	E3
Lignina total	12.425 a	11.150 a	14.100 a
Lignina S	4.4250 a	4.3250 a	6.0000 a
Lignina G	5.0000 a	4.6000 a	5.2500 a
Lignina H	0.2000 a	0.2000 a	0.2250 a
Lignina SG	0.8900 a	0.9425 a	1.1500 a

Medias con la misma letra por fila no son estadísticamente diferentes (Tukey, $\alpha = 0.05$)

Cuadro 14. Prueba de medias del análisis de expresión de genes biosintéticos de lignina y celulosa en diferentes tejidos de *A. fourcroydes* Lem.

Tratamiento	Variables					
	Raíz	Rizoma	Piña	Hoja	Flor	Tallo
CESA1	0.0430 b	0.0806 c	0.6769 a	1.4584 b	0.5372 a	0.1217 c
CESA5	0.0191 c	1.1811 b	0.0118 d	0.0784 cd	0.0797 bc	0.4215 a
SUS2	0.0065 c	0.0028 c	0.2414 c	3.8581 a	0.1184 b	0.1766 c
CESA7	0.0038 c	0.0123 c	0.0020 d	0.0046 d	0.0056 d	0.0233 d
CCR2	0.1962 a	2.9927 a	0.4348 b	0.1763 c	0.0233 cd	0.2907 b

Medias con la misma letra por columna no son significativamente diferentes (Tukey, $\alpha = 0.05$)

Cuadro 15. Prueba de medias del análisis de expresión de genes biosintéticos de lignina y celulosa en hoja y tejido adyacente a fibra de *A. fourcroydes* Lem

Tratamiento	Variables	
	Hoja	Fibra
CESA1	1.0000 a	3.3818 b
CAD5	1.0000 a	5.2599 a
SUS2	1.0000 a	2.6029 bc
CESA7	1.0000 a	4.7530 a
CCR2	1.0000 a	2.1757 c

Medias con la misma letra por columna no son significativamente diferentes (Tukey, $\alpha = 0.05$)

Cuadro 16. Análisis estadísticos de los datos morfométricos de bulbilos analizados.

Tratamiento	Variables	
	Altura	Hojas
Etapa 1	6.2720 c	3.5200 b
Etapa 2	17.5760 b	3.8000 b
Etapa 3	28.0320 a	4.9200 a

Medias con la misma letra por columna no son significativamente diferentes (Tukey, $\alpha = 0.05$)

Cuadro 17. Análisis estadísticos de los datos morfométricos de hijuelos t plantas adultas analizadas.

Tratamiento	Variables		
	Altura	Hojas	Peso
Etapa 1	15.083 C	7.333 C	78.30 B
Etapa 2	35.567 B	14.000 B	500.00 B
Etapa 3	127.000 A	37.667 A	14720.00 A

Medias con la misma letra por columna no son significativamente diferentes (Tukey, $\alpha = 0.05$)