



# **COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS AGRICOLAS

## **CAMPUS CAMPECHE**

POSTGRADO EN BIOPROSPECCIÓN Y SUSTENTABILIDAD  
AGRÍCOLA EN EL TRÓPICO

### **TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE *Sansevieria trifasciata* COMO UNA ESTRATEGIA DE GENÓMICA FUNCIONAL DE FIBRAS**

**ELEAZAR GARCÍA HERNÁNDEZ**

**T E S I S**

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER  
EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS**

SIHOCHAC, CHAMPOTÓN, CAMPECHE

2022

## **CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALIAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACION**

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el que suscribe **Ing. Eleazar García Hernández**, alumno 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 **Dr. Fulgencio Alatorre Cobos**, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis **Transformación genética de *Sansevieria trifasciata* como una estrategia de genómica funcional de fibras** 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 de 18 de febrero de 2022.



**Ing. Eleazar García Hernández**

**Alumno nombre y Firma**



**Dr. Fulgencio Alatorre Cobos**

**Vo.Bo. del Consejero o Director de Tesis**



# COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

La presente tesis titulada: **Transformación genética de *Sansevieria trifasciata* como una estrategia de genómica funcional de fibras**, realizada por el alumno: **Ing. Eleazar García Hernández** bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

## MAESTRO EN CIENCIAS

### POSTGRADO EN BIOPROSPECCIÓN Y SUSTENTABILIDAD AGRÍCOLA EN EL TRÓPICO

#### CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO: \_\_\_\_\_

*Fulgencio Alatorre C.*

Dr. Fulgencio Alatorre Cobos

ASESOR: \_\_\_\_\_

Dr. José Humberto Caamal Velázquez

ASESOR: \_\_\_\_\_

*Enrique Ibarra Laclette*

Dr. Enrique Ibarra Laclette

SIHOCHAC, CHAMPOTÓN; CAMPECHE, MÉXICO

# TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE *Sansevieria trifasciata* COMO UNA ESTRATEGIA DE GENÓMICA FUNCIONAL DE FIBRAS

Eleazar García Hernández, M.C.  
Colegio de Postgraduados, 2022

## RESUMEN

Las fibras naturales son tejidos de soporte presentes en gran variedad de especies vegetales, no obstante, a su uso histórico e intensivo, se desconoce mucho sobre la formación y regulación biosintética de los componentes estructurales de estos tejidos. La principal limitante para entender estos procesos se atribuye a la falta de especies modelo para su estudio. *Sansevieria trifasciata* Prain es una especie monocotiledónea de metabolismo CAM emparentada al género *Dracaena*, muy apreciada como planta de interior, que se utiliza ampliamente en la medicina tradicional y figura como fuente de fibras naturales. Debido a la disponibilidad de germoplasma y con la finalidad de comparar dos cultivares contrastantes (Lorentii y Hahnii), aquí caracterizamos plantas adultas y realizamos un análisis histológico de sus fibras, además presentamos un protocolo de micropropagación basado en organogénesis indirecta y ensayos de un protocolo de transformación genética mediado por *Agrobacterium tumefaciens*. Nuestros resultados de cultivo *in vitro* demostraron una respuesta morfogénica rápida de ambos cultivares, especialmente en el cultivar Hahnii. Los análisis histológicos realizados durante la inducción de callos primarios evidenciaron un hallazgo no descrito en *S. trifasciata*, los cuales mostraron que los primeros eventos de desdiferenciación se desencadenaron preferentemente en las células que rodean las fibras y los haces vasculares. Además, se determinaron los umbrales de uso de agentes de selección (glusfosinato de amonio y kanamicina), útiles durante la optimización del proceso de transformación genética. *S. trifasciata* tiene potencial biotecnológico y la postulamos como un modelo emergente en la realización de estudios enfocados a fibras vegetales.

**Palabras clave:** fibras, *Sansevieria trifasciata*, organogénesis indirecta, transformación genética.

# GENETIC TRANSFORMATION OF *Sansevieria trifasciata* AS A FUNCTIONAL FIBER GENOMICS STRATEGY

Eleazar García Hernández, M.C.  
Colegio de Postgraduados, 2022

## ABSTRACT

Natural fibers are support tissues present in a wide variety of plant species, however, despite their historical and intensive use, much is unknown about formation and biosynthetic regulation of structural components of these tissues. The main limitation to understand these processes is attributed to the lack of model species for their study. *Sansevieria trifasciata* Prain is a monocotyledonous species of CAM related to the genus *Dracaena*, highly valued as an indoor plant, widely used in traditional medicine and listed as a source of natural fibres. Due to the availability of germplasm and in order to compare two contrasting cultivars (Lorentii and Hahnii), here we characterize adult plants and perform a histological analysis of their fibers, we also present a micropropagation protocol based on indirect organogenesis and tests of a protocol of genetic transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. Our *in vitro* culture results demonstrate a rapid morphogenic response of both cultivars, especially in the Hahnii cultivar. Histological analyzes carried out during the induction of primary calluses showed that in *S. trifasciata* the first dedifferentiation events were preferentially triggered in the cells surrounding the fibers and vascular bundles. This finding has not been previously described. Also, optimum doses for selection agents (ammonium glufosinate and kanamycin) were determined during assays for genetic transformation. *S. trifasciata* is a species with biotechnological potential and it may to be postulated as an emerging model in studies focused on plant fibers.

**Keywords:** fibers, *Sansevieria trifasciata*, indirect organogenesis, genetic transformation.

## CONTENIDO

RESUMEN .....	I
ABSTRACT .....	II
LISTA DE TABLAS .....	V
LISTA DE FIGURAS .....	VI
DEDICATORIA .....	X
AGRADECIMIENTOS.....	XI
I. INTRODUCCIÓN.....	12
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	14
2. 1. Genómica funcional.....	14
2. 1.1 Genómica funcional de fibras naturales.....	15
2. 2. Cultivo de tejidos vegetales: vías de regeneración .....	16
2. 2.1. Organogénesis indirecta.....	18
2. 3. Transformación genética.....	20
2. 3.1. Transformación genética vía <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	23
2. 3.2. Transformación genética mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i> en monocotiledóneas: limitaciones y alternativas .....	25
2. 3.3. Cepas de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> con éxito en transformación genética de plantas monocotiledóneas .....	25
2. 3.4. Transformación genética en <i>Agave</i> .....	27
2. 4. Vectores de expresión.....	29
2. 4.1. Vectores de expresión para monocotiledóneas .....	32
2. 5. <i>Sansevieria</i> : importancia dentro de la familia <i>Asparagaceae</i> .....	34
2. 5.1. <i>Sansevieria trifasciata</i> : avances genómicos .....	37
2. 6. <i>Sansevieria trifasciata</i> como modelo de estudio de fibras naturales .....	42
2. 7. Micropropagación de <i>Sansevieria trifasciata</i> .....	44
III. HIPÓTESIS.....	46
IV. OBJETIVOS .....	46
4.1. Objetivo general.....	46
4.2. Objetivos específicos .....	46
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	47
5.1. Metodología general .....	47
5.2. Optimización de protocolo de organogénesis indirecta .....	49
5. 2.1. Material vegetal: establecimiento <i>in vitro</i> .....	49

5. 2.2. Inducción de callos primarios (ICP).....	50
5. 2.3. Inducción de callos organogénicos (ICO) .....	52
5. 2.4. Inducción y proliferación de brotes (IB).....	52
5. 2.5. Enraizamiento .....	52
5. 2.6. Descripción de cálculo de rendimiento organogénico indirecto.....	53
5. 2.7. Análisis histológicos de fibras y callos primarios de <i>Sansevieria trifasciata</i> .....	54
5. 3. Diseño, construcción y corroboración de vectores de expresión para <i>Sansevieria trifasciata</i> .....	55
5. 3.1. Vectores de expresión y cepas de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> usadas.....	56
5. 3.2. Corroboración de construcciones y movilización de vectores de expresión en <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	60
5. 4. Estandarización de condiciones de transformación genética mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	63
5. 4.1. Pruebas de susceptibilidad de <i>Sansevieria trifasciata</i> a glufosinato de amonio y kanamicina .....	63
5. 4.1.1 Susceptibilidad de brotes de <i>Sansevieria trifasciata</i> a herbicida FINALE® que contiene glufosinato de amonio.....	64
5. 4.1.2. Susceptibilidad de segmentos foliares de <i>S. trifasciata</i> al herbicida FINALE® que contiene glufosinato de amonio .....	64
5. 4.1.3. Susceptibilidad de brotes de <i>S. trifasciata</i> al herbicida glufosinato de amonio (Sigma-Aldrich®).....	65
5. 4.1.4. Susceptibilidad de callos primarios y organogénicos de <i>S. trifasciata</i> a glufosinato de amonio (Sigma-Aldrich®).....	65
5. 4.1.5. Susceptibilidad de callos primarios de <i>Sansevieria trifasciata</i> a kanamicina (Phytotechnology laboratories®) .....	66
5. 4.1.6. Evaluación de efectos en el desarrollo de callos primarios de <i>Sansevieria trifasciata</i> expuestos a glufosinato de amonio y kanamicina.....	67
5. 5. Ensayos de transformación genética de <i>Sansevieria trifasciata</i> mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	68
VI. RESULTADOS Y DISCUSIONES .....	72
6. 1. Caracterización de plantas adultas de <i>Sansevieria trifasciata</i> cv. Hahnii y cv. Lorentii..	72
6. 2. Objetivo 1: Optimización de protocolo de cultivo <i>in vitro</i> .....	74
6. 2.1. Inducción de callos .....	74
6. 2.1.1. Cambios anatómicos durante la desdiferenciación celular en tejido foliar de <i>Sansevieria trifasciata</i> .....	77
6. 2.2. Inducción de callos organogénicos y producción de brotes de novo .....	82

6. 2.3. Enraizamiento de brotes .....	87
6. 3. Objetivo 2: Diseño y construcción de vectores de expresión .....	89
6. 3.1. Digestiones de construcciones .....	90
6. 3.2. Transformaciones de cepas de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	93
6. 4. Objetivo 3: Establecimiento de un protocolo de transformación genética.....	95
6. 4.1. Ensayos de susceptibilidad a glufosinato de amonio .....	95
6. 4.1.1. Glufosinato de amonio (FINALE®, Bayer) .....	96
6. 4.1.2. Glufosinato de amonio (grado reactivo, Sigma-Aldrich®):.....	96
6. 4.1.3. Glufosinato de amonio (grado reactivo, Sigma-Aldrich®) en explantes potenciales para transformación por co-cultivo:.....	97
6. 4.1.4. Ensayos de susceptibilidad de <i>Sansevieria trifasciata</i> a kanamicina.....	102
6. 4.1.5. Efectos de glufosinato de amonio y kanamicina en la ganancia de biomasa fresca y en el contenido de clorofila de callos primarios de <i>Sansevieria trifasciata</i> .....	104
6. 5. Ensayos de transformación genética de <i>Sansevieria trifasciata</i> mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	109
6. 6. Discusiones finales .....	115
VII. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	117
7. 1. Conclusiones.....	117
7. 2. Perspectivas y Recomendaciones .....	119
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	120

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Métodos principales de transformación genética: sistemas directos e indirectos. ....	20
Tabla 2. Principales cepas de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> empleadas en protocolos de transformación genética .....	26
Tabla 3. Reportes de transformación genética de plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas donde se han evaluado diferentes cepas .....	27
Tabla 4. Vectores binarios más comunes en transformación genética de plantas. ....	30
Tabla 5. Genes de selección usados en bacterias y plantas transgénicas para conferir resistencia a antibióticos o herbicidas .....	31
Tabla 6. Listado de especies reportadas de <i>Sansevieria</i> .....	35
Tabla 7. Listado de variedades destacadas de <i>Sansevieria trifasciata</i> .....	38
Tabla 8. Secuencias de genes marcadores para <i>Sansevieria trifasciata</i> .....	41



Tabla 9. Avances recientes en protocolos de micropropagación de <i>Sansevieria trifasciata</i> .....	45
Tabla 10. Diseño experimental para ensayos de inducción de callos primarios.....	51
Tabla 11. Transformaciones realizadas en <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	61
Tabla 12. Medios específicos para transformaciones de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	62
Tabla 13. Oligonucleótidos diseñados para amplificar fragmentos de <i>gfp</i> , <i>uidA</i> y <i>bar</i> .....	62
Tabla 14. Diseño experimental de susceptibilidad de brotes de <i>S. trifasciata</i> al herbicida FINALE® .....	64
Tabla 15. Diseño experimental de susceptibilidad de láminas foliares de <i>S. trifasciata</i> al herbicida FINALE®.....	65
Tabla 16. Diseño experimental susceptibilidad de brotes de <i>S. trifasciata</i> a glufosinato de amonio (Sigma-Aldrich®).....	65
Tabla 17. Diseño experimental de susceptibilidad de callos primarios de <i>S. trifasciata</i> a glufosinato de amonio (Sigma-Aldrich®).....	66
Tabla 18. Diseño experimental de susceptibilidad de callos organogénicos de <i>S. trifasciata</i> a glufosinato de amonio (Sigma-Aldrich®).....	66
Tabla 19. Diseño experimental 1 de susceptibilidad de callos primarios de <i>S. trifasciata</i> a kanamicina .....	67
Tabla 20. Diseño experimental 2 de susceptibilidad de callos primarios de <i>S. trifasciata</i> a kanamicina .....	67
Tabla 21. Diseño experimental de susceptibilidad con dosis finales de agentes de selección para callos primarios de <i>Sansevieria trifasciata</i> .....	68
Tabla 22. Diseño experimental de transformación genética de <i>Sansevieria trifasciata</i> usando cepas de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> con vector pSR387 .....	70
Tabla 23. Diseño experimental de transformación genética de <i>Sansevieria trifasciata</i> usando cepas de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> con vector pRI201-ON_eGFP/GUS .....	70
Tabla 24. Análisis de restricción para corroborar identidad de vectores de expresión.....	90
Tabla 25. Análisis de restricción para corroborar integridad y tamaño de vector pRI201-ON- eGFP/GUS .....	92

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Generalidades del cultivo de tejidos vegetales. ....	17
Figura 2. Fases y factores implicados en micropropagación.....	18

Figura 3. Procedimiento para inducir organogénesis indirecta <i>in vitro</i> en <i>Polianthes tuberosa</i> L. (Asparagaceae).	19
Figura 4. OGMs modificados con mayor aceptación comercial en diferentes rubros de modificación genética	22
Figura 5. Proceso de transformación genética de células vegetales mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i> para generar una planta transgénica.	24
Figura 6. Diagrama general de cultivo <i>in vitro</i> y transformación de <i>Agave</i> mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .	29
Figura 7. Estructura molecular de un vector de expresión para plantas	30
Figura 8. Vector binario comercial pRI201- ON de Takara® (plásmido vacío)	33
Figura 9. Datos de secuenciación del genoma nuclear de <i>Sansevieria trifasciata</i> disponible en NCBI.	39
Figura 10. Árbol Maximum Likelihood (ML) inferido de 79 genes marcadores de plástidos, y de combinaciones de genes mitocondriales, de plástido y ribosomales nucleares; de 50 muestras	40
Figura 11. Análisis filogenético de <i>Sansevieria trifasciata</i>	43
Figura 12. Metodología general de manipulación <i>in vitro</i> de dos variedades de <i>Sansevieria trifasciata</i>	47
Figura 13. Procedimiento general para optimización y cálculo de rendimiento durante organogénesis indirecta.	49
Figura 14. Plantas madre y plántulas <i>in vitro</i> de dos variedades altamente contrastantes de <i>Sansevieria trifasciata</i>	50
Figura 15. Explantes usados para la obtención de callos primarios en <i>Sansevieria trifasciata</i> .	51
Figura 16. Metodología para obtención de cepas transformadas previo a ensayos de susceptibilidad y transformación.	56
Figura 17. Vector pRI201-ON_eGFP/GUS.	57
Figura 18. Vector pSR387 donador de la secuencia eGFP-GUS	58
Figura 19. Relación de cepas derivadas de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58.	59
Figura 20. Organización de moléculas de DNA en cepa C58C1 de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> con vector binario incluido	59
Figura 21. Metodología para la estandarización del protocolo de transformación genética de <i>Sansevieria trifasciata</i> mediante <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	63
Figura 22. Fases experimentales de ensayos de transformación genética en callos tipo embriogénicos de <i>Sansevieria trifasciata</i>	69
Figura 23. Contraste morfológico entre cv. Lorentii y cv. Hahnii de <i>Sansevieria trifasciata</i>	73
Figura 24. Protocolo optimizado de organogénesis indirecta de <i>Sansevieria trifasciata</i> cv. Hahnii y cv. Lorentii a partir de segmentos foliares.	74
Figura 25. Inducción de callos primarios en <i>Sansevieria trifasciata</i> en medio MS suplementado con 2,4-D.	76
Figura 26. Rendimiento de inducción de callos primarios en protocolo de organogénesis indirecta en <i>Sansevieria trifasciata</i> .	77
Figura 27. Cortes histológicos transversales de fibras de <i>Sansevieria trifasciata</i> cv. Lorentii (izquierda) cv. Hahnii (derecha)	80

Figura 28. Cortes histológicos de callos inducidos en zona central (fibras de cinta) en segmentos foliares de <i>Sanseveria trifasciata</i> .....	81
Figura 29. Cortes histológicos de callos inducidos en zonas periféricas (fibras estructurales) en segmentos foliares de <i>Sanseveria trifasciata</i> . 7 días de tratamiento (izquierda), 14 días de tratamiento (derecha) .....	81
Figura 30. Obtención de plántulas a partir de callos organogénicos de <i>Sanseveria trifasciata</i> ..	84
Figura 31. Rendimiento organogénico de dos cultivares de <i>Sanseveria trifasciata</i> .....	85
Figura 32. Diferencias morfológicas en plántulas de <i>Sanseveria trifasciata</i> .....	86
Figura 33. Anatomía y desarrollo de plántulas de <i>Sanseveria trifasciata</i> en distintos estadios-subcultivos en medio MS libre de hormonas. ....	87
Figura 34. Capacidad rizogénica de <i>Sanseveria trifasciata</i> de diferentes tejidos y bajo distintas condiciones de cultivo.....	88
Figura 35. Enraizamiento de <i>Sanseveria trifasciata</i> .....	89
Figura 36. Gel de agarosa al 1% de análisis de restricción de genes marcadores y de selección de plásmidos pSR387, pRI201-ON-eGFP/GUS y pRI201-ON.....	91
Figura 37. Gel de agarosa al 1% de linearizado y doble digestión de plásmidos pRI201-ON y pRI201-ON-eGFP/GUS .....	93
Figura 38. Transformaciones con cepa C58C1 de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> y sus respectivas amplificaciones por PCR de fragmentos correspondientes a genes reporteros y de selección. 94	
Figura 39. Transformaciones con cepa GV2260 de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> y sus respectivas amplificaciones por PCR de fragmentos correspondientes a genes reporteros y de selección. 95	
Figura 40. Susceptibilidad de segmentos foliares de <i>Sanseveria trifasciata</i> a glufosinato de amonio (FINALE®) 21 días después de cultivo .....	98
Figura 41. Susceptibilidad de brotes de <i>Sanseveria trifasciata</i> a diferentes dosis de glufosinato de amonio (FINALE®) .....	99
Figura 42. Efectos de glufosinato de amonio (Sigma-Aldrich®) en brotes de <i>Sanseveria trifasciata</i> cv. Lorentii (izquierda) y cv. Hahnii (derecha) en la misma placa de Petri, 21 días después de cultivo. ....	100
Figura 43. Efectos de glufosinato de amonio (Sigma-Aldrich®) en callos primarios de <i>Sanseveria trifasciata</i> cv. Hahnii (izquierda) y cv. Lorentii (derecha) en la misma placa de Petri, 21 días después de cultivo .....	101
Figura 44. Efectos de glufosinato de amonio (Sigma-Aldrich) en callos organogénicos de <i>Sanseveria trifasciata</i> cv. Hahnii (izquierda) y cv. Lorentii (derecha) en la misma placa de Petri, 21 días después de cultivo .....	102
Figura 45. Efecto de kanamicina (Sigma-Aldrich) en callos primarios de <i>Sanseveria trifasciata</i> de cv. Lorentii (izquierda) cv. Hahnii (derecha) en la misma placa de Petri, 56 días después de cultivo, experimento 1.....	103
Figura 46. Efecto de Kanamicina (Phytotechnology laboratories®) en callos primarios de <i>Sanseveria trifasciata</i> cv. Hahnii (izquierda) y cv. Lorentii (derecha) en la misma placa de Petri, 56 días después de cultivo, experimento 2.....	104
Figura 47. Rendimiento de biomasa de callos de <i>Sanseveria trifasciata</i> sometidos a diferentes dosis de kanamicina .....	106

Figura 48. Rendimiento de biomasa de callos de <i>Sansevieria trifasciata</i> sometidos a diferentes dosis de glufosinato de amonio .....	107
Figura 49. Contenido de clorofila total ( $\mu\text{g}\cdot\text{mg}$ ) en callos de <i>Sansevieria trifasciata</i> expuestos a diferentes dosis de kanamicina .....	108
Figura 50. Contenido de clorofila total ( $\mu\text{g}\cdot\text{mg}$ ) en callos de <i>Sansevieria trifasciata</i> expuestos a glufosinato de amonio.....	109
Figura 51. Fases iniciales de protocolo de transformación genética de <i>Sansevieria trifasciata</i> empleando cepas de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> con vector pSR387.....	111
Figura 52. Fases iniciales de protocolo de transformación genética de <i>Sansevieria trifasciata</i> empleando cepas de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> con vector pRI201-ON-eGFP/GUS.....	112
Figura 53. Problemas de persistencia de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> en etapas de selección .....	113
Figura 54. Callos de <i>Sansevieria trifasciata</i> observados bajo microscopía de epifluorescencia. ....	114

## **DEDICATORIA**

Dedico esta tesis de maestría en ciencias a mi núcleo familiar, por su comprensión y permanencia a lo largo de mi formación académica; a mis mejores amigos y al grupo de trabajo de laboratorio, por brindarme motivación y apoyo directo e indirecto.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca concedida durante la realización de este proyecto.

A mi núcleo familiar por apoyarme constantemente, motivarme y realizar sacrificios conmigo a pesar de la distancia.

Al Colegio de Postgraduados Campus Campeche, por las oportunidades brindadas desde mi incorporación al instituto.

A los técnicos de laboratorio, a mis compañeros de posgrado y a mi consejo particular por su apoyo y consejos otorgados durante la realización de esta investigación.

Al Dr. Fulgencio Alatorre Cobos, al Dr. Humberto Caamal Velázquez y al Dr. Enrique Ibarra Laclette por su paciencia, confianza y excelentes críticas.

## I. INTRODUCCIÓN

*Sansevieria* es un grupo conformado por alrededor de 70 especies herbáceas monocotiledóneas, de alto valor por sus propiedades estéticas, medicinales y por emplearse como fuente de fibras naturales. Taxonómicamente están ubicadas dentro del orden Asparagales, familia Asparagaceae, subfamilia Nolinoideae, género *Dracaena* (Chase et al., 2016; Lu & Morden, 2014; Tallei et al., 2016; Takawira-Nyenyanya et al., 2018; Thu et al., 2021; van Kleinwee et al., 2021). *Sansevieria trifasciata* Prain es una de las especies más atractivas de este género dracaenoide, originaria de África occidental y de algunos países asiáticos (Takawira & Nordal, 2001; Thu et al., 2021), pero; ampliamente distribuida en zonas tropicales y subtropicales de todo el mundo (Hematharshini & Serán, 2017; Lu & Morden, 2014). Su ciclo vegetativo es perenne, cuenta con una gran cantidad de híbridos y variedades que son comercializadas principalmente para decorar hogares (Tallei et al., 2016; Yusnita et al., 2011).

*S. trifasciata*, conocida comúnmente como lengua de vaca o planta serpiente, se encuentra ampliamente asentada en México, sobre todo en la península de Yucatán, donde se emplea como materia prima en la elaboración de artesanías y textiles (Arroyo-Irigoyen & Terán-Contreras, 2010; Rwawiire & Tomkova, 2015; Wolela, 2019). A diferencia de henequén (*Agave fourcroydes*), sisal (*Agave sisalana*) y el agave híbrido 11648 ((*A. amaniensis* x *A. angustifolia*) x *A. amaniensis*), monocotiledóneas de importancia mundial en producción de materiales a base de fibras duras; *Sansevieria* produce fibras más finas, es de menor tamaño, es abundante en germoplasma y tiene un ciclo biológico más corto (Arroyo-Irigoyen & Terán-Contreras, 2010; Raya et al., 2021; Steele et al., 2012). La similitud taxonómica y fisiológica que comparte con los agaves, ventajas técnicas en micropropagación y su importancia económica, colocan a *S. trifasciata* como una alternativa de sistema modelo-no modelo para el estudio de fibras en plantas monocotiledóneas y de metabolismo CAM (Hematharshini & Seran, 2017; Martin et al., 2019; Sarmast et al., 2009; Wahyuningsih et al., 2013; Widayasanti et al., 2020; Yusnita et al., 2011).

En este trabajo se emplearon dos cultivares altamente contrastantes (Lorentii y Hahnii), de *S. trifasciata* con los cuales se optimizó un protocolo de micropropagación mediante organogénesis indirecta y se sentaron las bases para la transformación genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. Nuestros resultados indicaron que la mejor dosis para inducción de callos primarios fue de  $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de 2,4-D (ácido 2,4-Diclorofenoxiacético, fitohormona de tipo auxina), en el cual se obtuvieron aglomerados amorfos de células indiferenciadas después de seis semanas de tratamiento. La fase de inducción de callos organogénicos y subsecuente producción de brotes, se obtuvo bajo la presencia de  $4.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de 6-BAP (6-Bencilaminopurina, fitohormona de tipo citoquinina). La caracterización de los brotes producidos después de 12 semanas de tratamiento no mostró diferencias entre ambos cultivares. Los análisis histológicos llevados a cabo mostraron que los primeros eventos de desdiferenciación celular se desencadenaron preferentemente en las células que rodean las fibras y los haces vasculares a partir de los cuatro días de inducción. Nuestros análisis de susceptibilidad ante dos agentes de selección en diferentes tejidos de *S. trifasciata* arrojaron un comportamiento característico de muchas otras monocotiledóneas, denotando a *S. trifasciata* como una especie resistente a umbrales muy elevados de kanamicina y altamente susceptible a glufosinato de amonio. Los ensayos de transformación genética realizados con callos primarios no fueron exitosos pues la persistencia de *A. tumefaciens* fue un factor limitante para la apropiada selección de callos organogénicos y/o brotes.



## II. REVISIÓN DE LITERATURA

El acelerado desarrollo de la biotecnología se ha limitado al análisis de un número reducido de especies denominadas modelos de estudio; si bien estas han ofrecido ventajas experimentales, solamente han permitido entender procesos fisiológicos y moleculares fundamentales (Chalifa-Caspi, 2021; Heck & Neely, 2020; Rodríguez-Alonso & Shishkova, 2019). Desafortunadamente modelos de estudio tradicionales como *Arabidopsis thaliana*, *Drosophila melanogaster* o *Caenorhabditis elegans*, no permiten abordar todas las preguntas biológicas. En contraste, gracias a los avances tecnológicos recientes de secuenciación genómica y transcriptómica, así como ventajas biológicas de organismos inusuales, se ha propiciado el surgimiento de otras especies como sistemas modelos emergentes (Buffenstein & Ruby, 2021; Goldstein & King, 2016; Guiglielmoni *et al.*, 2021; Heck & Neely, 2020; Murthy & Ram, 2015; Rodríguez-Alonso & Shishkova, 2019).

### 2. 1. Genómica funcional

La genómica funcional tiene como objetivo elucidar las funciones genéticas involucradas en diferentes procesos moleculares; se caracteriza por ser una disciplina de técnicas o metodologías laboriosas y relativamente lentas. Por ello, en biotecnología vegetal, especies con un ciclo biológico corto, abundancia en germoplasma, sistemas de regeneración eficientes y con una respectiva alta tasa de transformación genética, son ideales para postularse como modelos de estudio emergentes (Buell & Voytas, 2017; Chalifa-Caspi, 2021; Altpeter *et al.*, 2016; Lowe *et al.*, 2016).

En este sentido, se ha evidenciado que las especies dicotiledóneas a diferencia de las monocotiledóneas tienden a ser más fáciles de manipular a nivel genético, donde el éxito depende en gran medida de la ruta de regeneración *in vitro* utilizada. La literatura reporta que a través de la embriogénesis somática se incrementan las posibilidades de transformación en monocotiledóneas, mientras que la regeneración de plántulas

dicotiledóneas transgénicas se logra sin dificultad alguna a través de las rutas organogénicas (Buell & Voytas, 2017; Kausch et al., 2019; Kong et al., 2020; Lowe et al., 2016).

### **2. 1.1 Genómica funcional de fibras naturales**

El cultivo y procesamiento de fibras naturales es un área industrial en el que han destacado los géneros *Saccharum*, *Gossypum*, *Hibiscus*, *Linum*, *Agave* y *Corchorus* principalmente (Akram et al., 2021; Monja-Mio et al., 2019). Este sector industrial se vio afectado con el surgimiento de materiales sintéticos, debido principalmente a la adopción de estilos de vida modernos. Actualmente, las preocupaciones ambientales y económicas han generado un interés positivo por el uso de energías y materiales renovables. Por ende, hemos entrado a una era de resurgimiento de fibras naturales como materia prima, pues se han vuelto populares debido a su disponibilidad, rentabilidad, biodegradabilidad, rigidez, tracción, aislamiento térmico y su resistencia mecánica (Akram et al., 2021; Bourmaud et al., 2018; Mokshina et al., 2020; Sanchez et al., 2020).

Los biocompuestos reforzados con fibras naturales son un tema de interés mundial, donde a pesar de todas las ventajas mencionadas, factores como la naturaleza hidrofílica y el alto contenido en polisacáridos son limitantes que afectan el desempeño de estos tejidos como refuerzo de resinas poliméricas hidrófobas (Dhakal et al., 2018; Mancino et al., 2018; Manian et al., 2021; Pantano & Zuccarello, 2018; Sanchez et al., 2020).

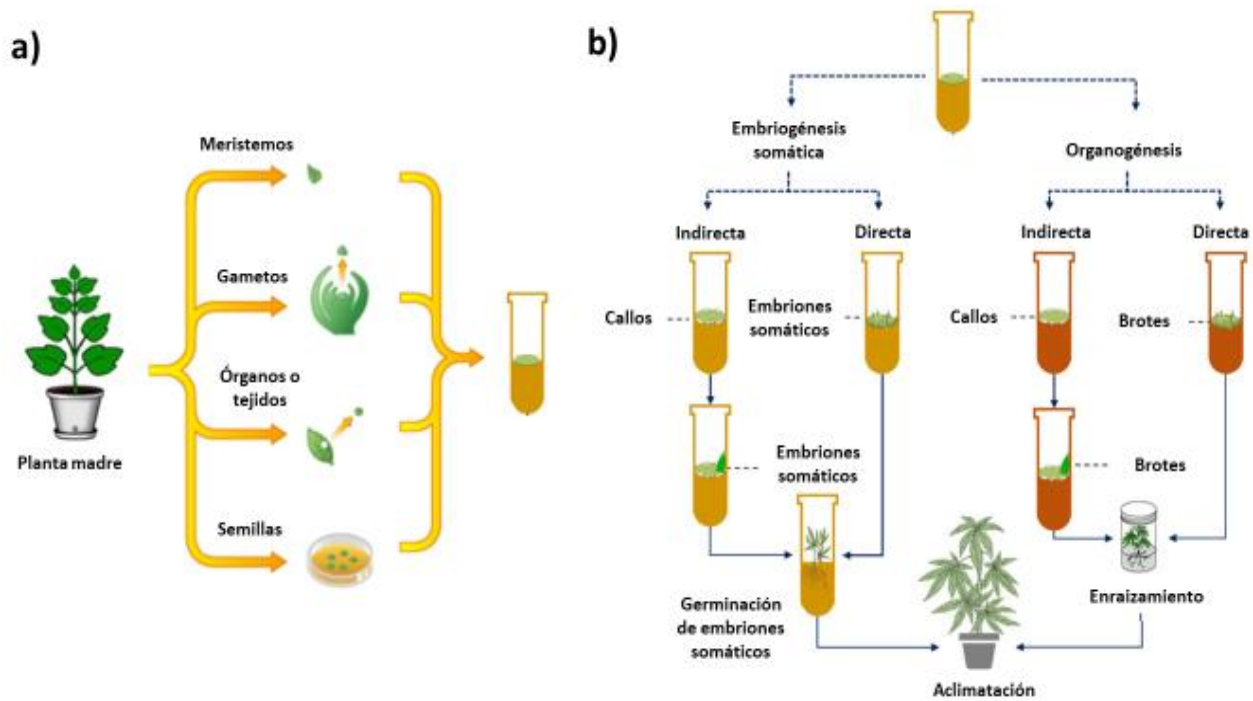
La biosíntesis de fibras naturales, especialmente aquellas clasificadas como duras, es un proceso difícil de comprender empleando modelos vegetales tradicionales, ya que naturalmente estos no producen tejidos fibrosos. Lo que se conoce del control molecular sobre su ontogenia y desarrollo ha sido gracias a la investigación realizada con pared celular y con otros tejidos de soporte como xilema y floema (Li et al., 2014; Mohnen, 2008; Mokshina et al., 2020; Scheller & Ulvskov, 2010; Sandhu et al., 2009).

Debido a la falta de comprensión de factores moleculares clave y su relación con parámetros de calidad en la generación de fibras, diversos grupos de investigación han redireccionado sus esfuerzos al entendimiento molecular de su biogénesis; aplicando así técnicas de secuenciación en los principales cultivos y otros organismos potenciales no tan populares (Mokshina et al., 2020; Gorshkov et al., 2019; Goudenhooff et al., 2019; Yang et al., 2020; Zhang & Deyholos, 2016).

## **2. 2. Cultivo de tejidos vegetales: vías de regeneración**

El Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV) es una herramienta agrobiotecnológica que involucra técnicas de propagación clonal de plantas bajo condiciones *in vitro*, ésta se lleva a cabo a partir de segmentos pequeños denominados “explantes”, mismos que pueden ser órganos, tejidos y/o células que requieren de medios nutritivos asépticos y optimizados por especificidad (Levitus et al., 2010; Sharry et al., 2015; Herrera-Cool et al., 2019; Singh & Singh, 2021).

Existen dos rutas de multiplicación en micropropagación: organogénesis y embriogénesis somática (figura 1). La primera consiste en la formación de órganos (raíces, hojas y/o brotes adventicios) a partir de cualquier explante; la última involucra la formación de estructuras similares a embriones cigóticos a partir de células somáticas, las que al germinar dan origen a individuos completos (Abiri et al., 2020; Neves et al., 2021). El crecimiento inducido puede ser indiferenciado o diferenciado. El primero genera una masa de células en activa división no especializadas fisiológicamente, cuyo conjunto forma una aglomeración amorfa denominada callo. Por su parte, el crecimiento diferenciado consiste en la formación de tejidos o células especializadas que dan lugar a brotes, raíces o embriones. La fase de inducción inicial de callos, determina que la estrategia organogénica o embriogénica sean directa o indirecta.

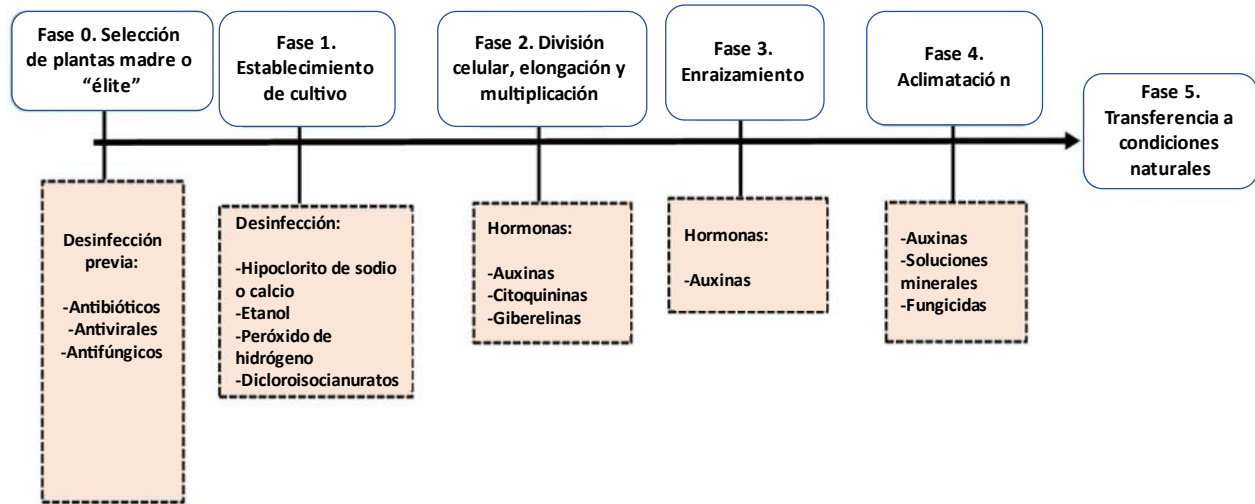


**Figura 1.** Generalidades del cultivo de tejidos vegetales. a) Explantes que se emplean en protocolos de micropropagación, b) rutas de regeneración vegetal *in vitro* (modificada a partir de: Hesami et al., 2021; y de: <http://ngomeagribusiness.blogspot.com/2017/11/tissue-culture-process.html>)

Estas técnicas de CTV son empleadas e innovadas constantemente con el objetivo de generar protocolos eficientes de micropropagación, los cuales mayoritariamente tienen fines comerciales, pero también algunos buscan coadyuvar sinérgicamente al mejoramiento genético, a potenciar la producción de metabolitos secundarios y/o la conservación de germoplasma (Ghosh et al., 2021; Levitus et al., 2010; Herrera-Cool et al., 2019; Soumare et al., 2021; Wen et al., 2020).

El fundamento principal de la micropropagación es la totipotencia celular, característica de la mayoría de las células vegetales adquirida bajo condiciones de estrés para desarrollarse autónomamente en una plántula completamente desarrollada (Fehér, 2019; Singh & Singh, 2021; Soumare et al., 2021). Obtener plántulas masivamente depende de varios factores, entre los que destacan el genotipo de la planta, el diseño del medio de cultivo o vía de regeneración; así como la técnica de esterilización y el tipo de explantes seleccionados, todos influyen y se distribuyen en las diferentes fases del

protocolo de micropropagación (figura 2), por ende, es importante realizar ensayos que permitan optimizar el protocolo de multiplicación (Cui et al., 2019; Hesami et al., 2021; Lin et al., 2000; Pathirana et al., 2020).



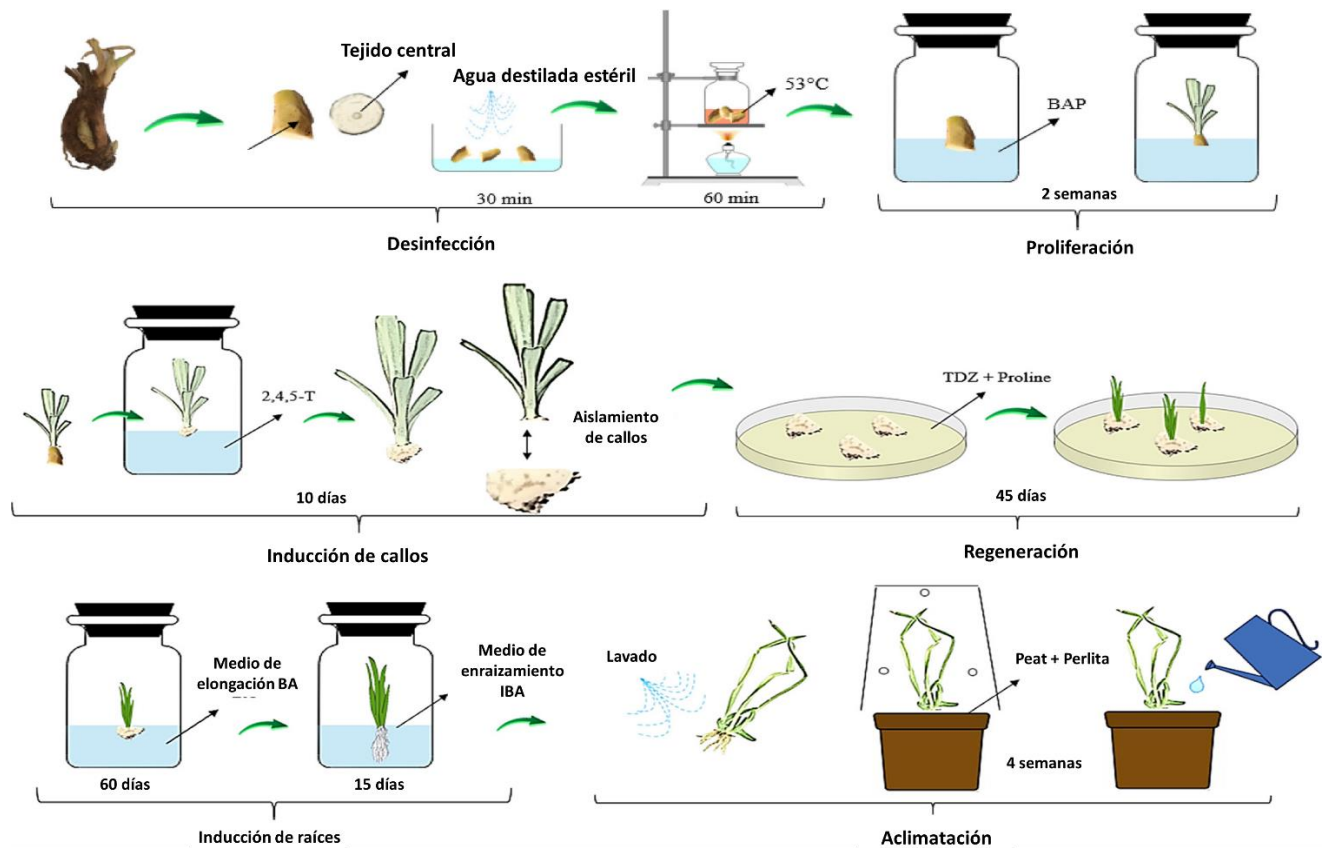
**Figura 2.** Fases y factores implicados en micropropagación (modificada de: Soumare et al., 2021).

### 2. 2.1. Organogénesis indirecta

La organogénesis indirecta consiste en la producción de brotes a partir de los callos inducidos en el explante inicial y a medida que dichos brotes se desarrollan, requieren de la inducción de raíces para la formación de plántulas completas (Delporte et al., 2014; Jaiswal et al., 2020). Variedad de estudios coinciden en que el tipo de explante y el uso de fitohormonas específicas en cada fase (inducción de callos, crecimiento de brotes y regeneración de plántulas) son clave para conseguir un protocolo eficiente (figura 3). A pesar de que existen diferentes combinaciones hormonales y que varían según la especie en cuestión; el medio nutritivo que contiene citoquininas y auxinas combinadas tiende a ser el ideal (Dharman & Anilkumar, 2021, Nalousi et al., 2019).

En contraparte a la organogénesis directa, la fase comúnmente llamada “callogénesis” se puede utilizar para la producción de metabolitos secundarios (suspensiones celulares), permitiendo comprender la fisiología del estrés de las células en constante

división. Aunado a esto, la organogénesis indirecta permite alcanzar objetivos de programas de mejoramiento vegetal en tiempo relativamente corto, por lo que es importante para estrategias de transformación genética y para la selección de variantes somaclonales (Dharman & Anilkumar, 2021; Fehér, 2019; Ramírez-Mosqueda & Iglesias-Andreu, 2015; Nalousi et al., 2019; Ntui et al., 2010; Scotton et al., 2013; Vincent & Anushma, 2018).



**Figura 3.** Procedimiento para inducir organogénesis indirecta *in vitro* en *Polianthes tuberosa* L. (Asparagaceae) (tomada y modificada de: Nalousi et al., 2019).

### 2. 3. Transformación genética de plantas

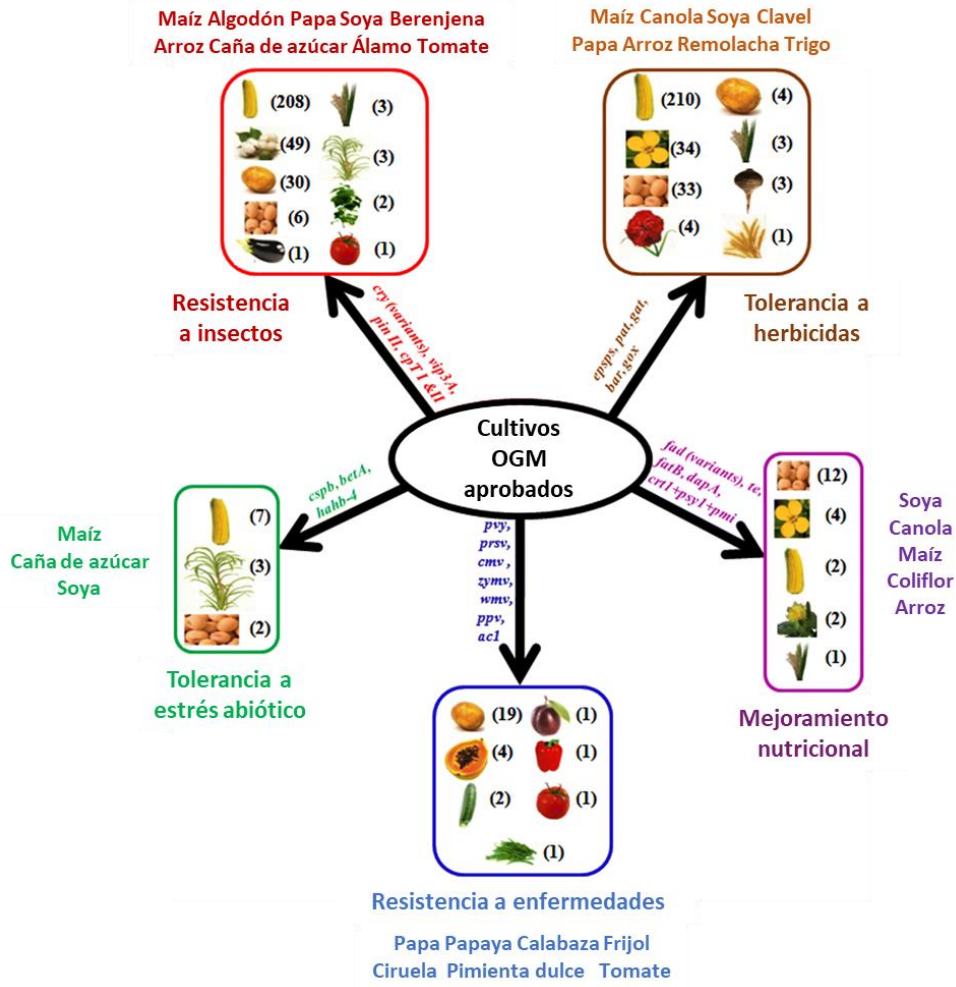
La transformación genética es una herramienta fundamental para el impulso de la genómica funcional y el fitomejoramiento. Consiste en introducir DNA foráneo (transgen, cisgen o intragen) a células vegetales, y posteriormente, mediante un sistema optimizado de regeneración, obtener plantas genéticamente modificadas. Permite mejorar los rasgos existentes o promover uno nuevo en una especie, hay dos métodos para conseguirlo: el primero es de forma indirecta, utilizando un sistema vivo (*Agrobacterium* spp.), un grupo de bacterias que infecta a los tejidos vegetales para integrar el DNA deseado al genoma de la planta; el segundo es una transferencia directa, como la microinyección y el bombardeo de partículas (Anjanappa & Gruissem, 2021; Chakraborty et al., 2020; Holme et al., 2013; Imani, & Kogel, 2020; Keshavareddy et al., 2018; Kumar et al., 2020; Ramkumar et al., 2020). En la tabla 1 se enlistan sus ventajas y desventajas.

**Tabla 1.** Métodos principales de transformación genética: directos e indirectos (revisado y modificado de: Hwang et al., 2017; Keshavareddy et al., 2018; Ramkumar et al., 2020).

Estrategia	Método	Ventajas	Desventajas
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Biológico (no directo)	Instalaciones menos costosas; fácil de utilizar; número de copias transgénicas generalmente bajo; menor variación somaclonal	Especies monocotiledóneas, leguminosas y leñosas son recalcitrantes
Bombardeo de partículas	Físico (directo)	Amplia gama de plantas; eficiente sistema de expresión transitoria; entrega simultánea de gran número de genes; eficaz para transformar organelos	Varias copias y fragmentación de la integridad molecular del ADN; posible aparición de plantas quiméricas
Microinyección	Físico (directo)	Pocos informes exitosos en centeno, cebada y otras plantas	Limitado a protoplastos; difícil de regenerar plantas
Electroporación	Físico (directo)	Sistema alternativo para obtener expresión transitoria en plantas; conveniente, simple y rápido	Limitado a protoplastos; difícil de regenerar plantas viables
Transferencia mediada por polietilenglicol (PEG)	Químico (directo)	La transferencia directa de genes a las células evita la limitación del rango de hospedadores; fácil de realizar con un costo relativamente bajo	Limitado a protoplastos o pocos tipos de células vegetales; proceso lento en la regeneración de plantas
Vía del tubo polínico	Físico (directo)	Eliminación de sistemas de cultivo de tejidos, células o protoplastos vegetales transformados; pocos informes exitosos en arroz, maíz, algodón, soja, trigo	Dificultad para establecer protocolos; solo funciona con plantas que florecen y producen semillas

Durante el proceso de regeneración de plántulas potencialmente transformadas, se llevan a cabo procedimientos de selección, las cuales permiten discriminar a las plantas que no adquirieron el transgen o los transgenes. El agente de selección utilizado (antibiótico o herbicida), es determinado por el propio vector que contiene al DNA de interés (Anjanappa & Gruissem, 2021; Imani & Kogel, 2020). La transformación genética además de permitir la expresión de genes foráneos, también es capaz de propiciar el silenciamiento de la expresión o modificar la actividad de uno o más genes endógenos (Anjanappa & Gruissem, 2021). Actualmente se han reportado y aprobado comercialmente más de 500 eventos transgénicos en al menos 32 cultivos diferentes (figura 4); los primeros de ellos fueron en *Nicotiana* y *Petunia* (Fraley et al., 1983; Herrera-Estrella et al., 1983; Kumar et al., 2020) y actualmente se incluyen en la lista de cultivos de importancia mundial como maíz, trigo y arroz, donde se buscan incrementar la resistencia a insectos, enfermedades, tolerancia a estrés abiótico y mejoramiento nutricional (figura 4).





**Figura 4.** OGMs modificados con mayor aceptación comercial en diferentes rubros de modificación genética (tomada y modificada de: Kumar et al., 2020)

A pesar de que la transformación genética se ha promovido con gran éxito, llevarlo a cabo de forma eficiente sigue siendo un cuello de botella porque muchas especies de plantas son recalcitrantes a las condiciones establecidas de cultivo de tejidos y/o muestran poca capacidad de transformación (Anjanappa & Gruissem, 2021; Klümper & Qaim, 2014).

Aunado a esto, los cultivos transgénicos han sido objeto de preocupaciones y críticas constantes, por lo que enfrentan una falta de aceptación pública en muchas partes del mundo. En gran medida las preocupaciones están basadas en el riesgo de flujo de genes entre cultivos transgénicos y silvestres, así como la posibilidad de una transferencia

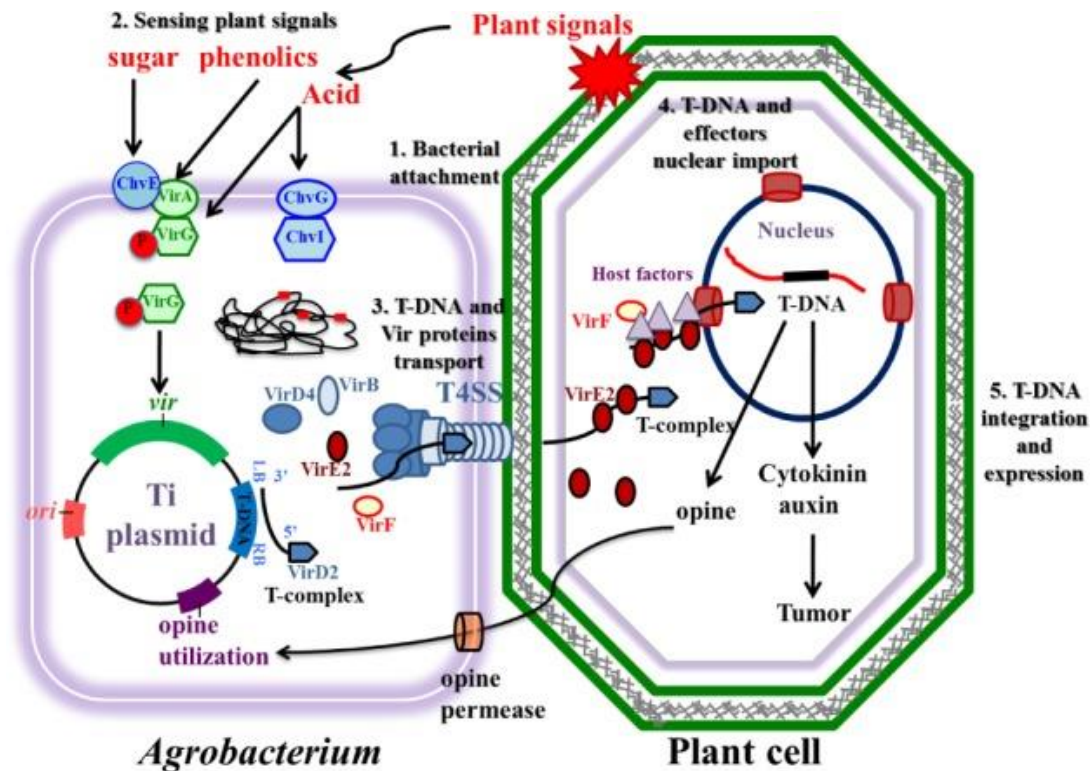
lateral de genes de resistencia a antibióticos a los microorganismos presentes en el medio ambiente (Kumar et al., 2020).

### **2. 3.1. Transformación genética vía *Agrobacterium tumefaciens***

El uso de *Agrobacterium tumefaciens* ha sido exitoso y exponencial en la transformación genética de plantas, convirtiéndose en herramienta básica para la biología molecular vegetal. Esta  $\alpha$ -proteobacteria gram negativa presente en el suelo, tiene la capacidad de infectar de forma natural heridas presentes en las plantas dicotiledóneas; en esos sitios de infección se genera una patología denominada agalla de la corona, la cual consiste en la formación de tumores (Imani & Kogel, 2020; Nonaka et al., 2019; Ramkumar et al., 2020).

De forma natural las plantas heridas secretan compuestos fenólicos que son percibidos por dos sistemas sensitivos VirG/VirA de *A. tumefaciens*, generando la inducción de genes de virulencia (*virD1* y *virD2*) por parte de la bacteria. Entre las señales químicas que percibe el patógeno se encuentran azúcares, hidrocarburos aromáticos monocíclicos como acetosiringona,  $\alpha$ -hydroxyacetosiringona, coniferyl alcohol y vainillina, y monosacáridos como la glucosa y el ácido glucorónico (Alpeter et al., 2016; Ramkumar et al., 2020).

Los genes *virD1* y *virD2* forman una endonucleasa sitio específica que rompe los bordes de la región del T-DNA, el cual se localiza dentro del plásmido Ti. En los laboratorios de biología molecular, este T-DNA puede ser incorporado artificialmente desde vectores binarios o del cromosoma bacteriano. VirD2 se une covalentemente a una cadena del T-DNA y libera hebras T a través de un sistema de secreción tipo IV (compuesto de proteínas VirB y VirD4) dentro de la célula vegetal (figura 5). Dentro de la planta, los complejos VirD2/hebras-T forman complejos con VirE2 y otras proteínas de la célula infectada; estos nuevos complejos acceden al núcleo y el T-DNA termina siendo integrado a los cromosomas vegetales (Alpeter et al., 2016; Humara et al., 1999; Hwang et al., 2017; Ramkumar et al., 2020; Ravanfar et al., 2017).



**Figura 5.** Proceso de transformación genética de células vegetales mediada por *Agrobacterium tumefaciens* para generar una planta transgénica (Hwang *et al.*, 2017)

El desarrollo de una planta transgénica mediada por *A. tumefaciens* fue informado por primera vez por Herrera-Estrella *et al.*, 1983; a partir de allí, durante los últimos 27 años se ha demostrado con una amplia gama de protocolos que las plantas dicotiledóneas son más fáciles de transformar que las monocotiledóneas (Anjanappa & Gruijsem, 2021; Herrera-Estrella *et al.*, 1983; Ramkumar *et al.*, 2020). La mayoría de los reportes coinciden en que se requiere de la optimización de cada fase del protocolo, incluida la producción de células competentes a partir de los tejidos y la regeneración de células a una planta sana después de la transformación, ya que son múltiples factores que tienen incidencia en una tasa alta de manipulación genética (Chakraborty *et al.*, 2020; Imani & Kogel, 2020; Keshavareddy *et al.*, 2018).

### **2. 3.2. Transformación genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* en monocotiledóneas: limitaciones y alternativas**

Como se mencionó anteriormente, *A. tumefaciens* infecta naturalmente a plantas dicotiledóneas, en contraste, en genotipos ornamentales de tipo monocotiledóneas, su eficacia de transformación ha sido limitada por la baja capacidad de *A. tumefaciens* para llegar a células competentes; inclusive se ve limitada a nivel de cultivar o variedad, pues se ha demostrado que algunos cultivares de una especie se pueden transformar con mayor facilidad que otros. A pesar de que existen protocolos excelentes de micropropagación en especies monocotiledóneas, son escasos los reportes de transformación genética; sin embargo, algunas innovaciones tecnológicas y estratégicas recientes han hecho cada vez más factible su transformación, por ejemplo en cereales como el arroz, maíz, cebada, trigo y centeno (Anjanappa & Gruissem, 2021; de Saeger et al., 2020; Imani & Kogel, 2020; Moyo et al., 2011; Koetle et al., 2015).

Entre tales innovaciones, se encuentra el uso de cepas super virulentas, así como el diseño y uso de vectores de expresión optimizados con promotores específicos. En cereales, por ejemplo, se ha encontrado una alta tasa de transformación ligada al uso de las cepas AGL-1 y LBA4404. El promotor facilita el control de la expresión génica, siendo el más comúnmente usado el promotor 35S de CaMV. El promotor ubiquitina también ha demostrado optimizar tales vectores de expresión para monocotiledóneas (Alok et al., 2017; Ishida et al 2007; Imani & Kogel, 2020; Kamo et al., 2009). Otros factores como el explante seleccionado para la infección con *A. tumefaciens* y la posterior regeneración *in vitro*, el periodo de co-cultivo y la fuente de luz, también están relacionados directamente con el éxito o fracaso de un protocolo de transformación en plantas recalcitrantes (Chakraborty et al., 2020; Koetle et al., 2015).

### **2. 3.3. Cepas de *Agrobacterium tumefaciens* con éxito en transformación genética de plantas monocotiledóneas**

En los protocolos de transformación genética de plantas, las cepas más empleadas comparten principalmente dos fondos cromosómicos: C58 o Ach5. Entre las más reportadas se encuentran las cepas: GV3101, EHA101, EHA105 y AGL-1; estas cuatro

son derivadas de *A. tumefaciens* C58 (de Saeger et al., 2020). En la tabla 2 se enlistan las cepas de *A. tumefaciens* de mayor impacto en biotecnología y algunas de sus características como resistencias a antibióticos y el plásmido original del cual derivan.

**Tabla 2.** Principales cepas de *Agrobacterium tumefaciens* empleadas en protocolos de transformación genética (modificada de: de Saeger et al., 2020)

Cepa de <i>A. tumefaciens</i>	Nombre de la cepa estandarizada*	Derivado del plásmido Ti
GV3101	C58C1 Rif <sup>R</sup>	N/D
GV3101::pMP90	C58C1 Rif <sup>R</sup> (pMP90 Gm <sup>R</sup> ) <sup>H</sup>	pTiC58
LBA288	C58C1 Rif <sup>R</sup> Nal <sup>R</sup>	N/D
LBA1100	C58C1 Rif <sup>R</sup> Nal <sup>R</sup> (pAL1100 Sp <sup>R</sup> ) <sup>H</sup>	pTiB6
NT1	C58C	N/D
A136	C58C Rif <sup>R</sup> Nal <sup>R</sup>	N/D
A281	C58C Rif <sup>R</sup> Nal <sup>R</sup> (pTiBo542)	pTiBo542
A348	C58C Rif <sup>R</sup> Nal <sup>R</sup> (pTiA6)	pTiA6
EHA101	C58C Rif <sup>R</sup> Nal <sup>R</sup> (pTiEHA101 Km <sup>R</sup> ) <sup>H</sup>	pTiBo542
EHA105	C58C Rif <sup>R</sup> Nal <sup>R</sup> (pTiEHA105) <sup>H</sup>	pTiBo542
AGL-0	C58C Rif <sup>R</sup> Nal <sup>R</sup> (pTiBo542ΔT) <sup>H</sup>	pTiBo542
AGL-1	C58C <i>recA</i> Rif <sup>R</sup> Cb <sup>R</sup> Nal <sup>R</sup> (pTiBo542ΔT) <sup>H</sup>	pTiBo542
C58-Z707	C58C (pSZ707 Kan <sup>R</sup> ) <sup>H</sup>	pTiC58
C58C1(pTiB6S3ΔT) <sup>H</sup>	C58C Rif <sup>R</sup> (pTiB6S3ΔT Cb <sup>R</sup> pCH32 Tet <sup>R</sup> ) <sup>H</sup>	pTiB6S3; pTiBo542 ( <i>virG</i> ) + pTiA6 ( <i>virE</i> )
NT1(pKPSF2)	C58C (pKPSF2 Ery <sup>R</sup> ) <sup>H</sup>	pTiChry5
LBA4404	Ach5C Rif <sup>R</sup> (pAL4404 Strep <sup>R</sup> ) <sup>H</sup>	pTiAch5
KYRT1	Chry5C Rif <sup>R</sup> (KYRT1 Cb <sup>R</sup> Gm <sup>R</sup> ) <sup>H</sup>	pTiChry5

\*Resistencias a antibióticos se abrevian seguidos por el superíndice <sup>R</sup>. *recA*, gen; Cb, carbenicilina; Ery, eritromicina; GM, gentamicina; Km, kanamicina; Nal, ácido nalidíxico; Rif, rifampicina; Sp, espectinomicina; Strep, estreptomicina; Tet, tetraciclina, N/D= No disponible.

Las cepas super virulentas sobreexpresan genes *vir* específicos, una característica que se ha empleado como herramienta accesible en variedad de especies recalcitrantes (de Saeger et al., 2020). Muchas de las cepas enlistadas anteriormente han sido objeto de estudio en protocolos de transformación genética de especies monocotiledóneas, algunas como *Setaria* spp y *Sorghum bicolor*, en estas evaluaciones han figurado principalmente las cepas EHA105, C58C1, LBA4404 y AGL-1 como las más exitosas (tabla 3).

**Tabla 3.** Reportes de transformación genética de plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas donde se han evaluado diferentes cepas

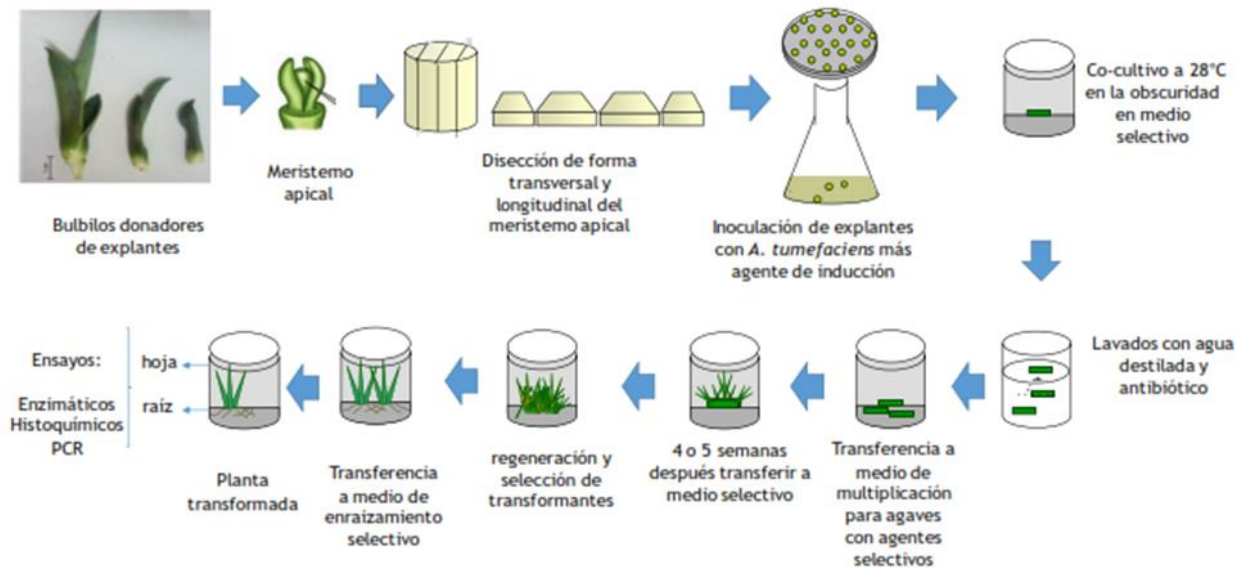
Grupo	Especie	Cepas evaluadas	Cepas exitosas	Referencia
Monocotiledóneas	<i>Musa</i> spp.	EHA105 LBA4404 C58C1 GV2260	1: EHA105 2: C58C1	Tripathi et al., 2005
Monocotiledóneas	<i>Setaria italica</i>	LBA4404 AGL1	1: LBA4404	Sood et al., 2020
Monocotiledóneas	<i>Setaria viridis</i>	AGL1 EHA105 GV3101 LBA4404	1: EHA105 2: AGL1	Saha & Blumwald, 2016
Monocotiledóneas	<i>Sorghum bicolor</i>	GV3101 C58C1	1: GV3101 2: C58C1	Sharma et al., 2020
Dicotiledóneas	<i>Solanum tuberosum</i>	GV2260	1: GV2260	Banerjee et al., 2006
Dicotiledóneas	<i>Pisum sativum</i> L.	LBA4404 EHA105 C58C1	1: EHA105 2: C58C1	Nadolska-Orczyk & Orczyk 2000
Dicotiledóneas	<i>Nicotiana tabacum</i> L.	LBA4404 GV2660 C58C1 EHA105 AGL1	1: LBA4404 2: GV2260	Bakhsh et al., 2014

### 2. 3.4. Transformación genética en *Agave*

El género *Agave* al igual que *Dracaena* pertenece a la familia Asparagaceae, está conformado por alrededor de 200 especies, de las cuales más del 80% son endémicas

de México y se cultivan principalmente para la producción de fibras y bebidas alcohólicas (Eguiarte et al., 2021; Stewart, 2015). Las especies más empleadas como fuentes de fibras naturales son: *Agave angustifolia*, *Agave americana*, *Agave fourcroydes*, *Agave lechuguilla* y *Agave 11648* (*(A. amaniensis x A. angustifolia) x A. amaniensis*) (Mielenz et al., 2015; Monja-Mio et al., 2019). Las fibras naturales extraídas de agaves están sustituyendo con gran éxito a las fibras sintéticas en la investigación, donde su alta resistencia al calor, a la sequía y su rigidez comparada con las de otras plantas han sido puntos de interés para una gran variedad de análisis experimentales, tales como: estudios de morfología, composición química, análisis térmicos, propiedades mecánicas, conductividad térmica, entre otros (Ali et al., 2021; Madhu et al., 2020).

Debido a la importancia que representan desde hace algunos años existe un interés nacional que busca mejorar a los agaves empleando herramientas biotecnológicas (AGARED, 2017; Eguiarte et al., 2021; Stewart, 2015). A pesar de esto y a la disponibilidad de muchos protocolos eficientes de micropropagación, una alta tasa de transformación genética en estos cultivos sigue sin ser reportada (Monja-Mio et al., 2019). Los intentos se han enfocado en métodos como bombardeo de partículas e infección con *A. tumefaciens*. Usando el sistema biológico se han reportado dos protocolos: el primero publicado por Gao et al., (2014) en *Agave* híbrido 11648, y el segundo en *Agave salmiana* reportado por Gutiérrez-Aguilar et al., (2016), este último resumido en la figura 6.

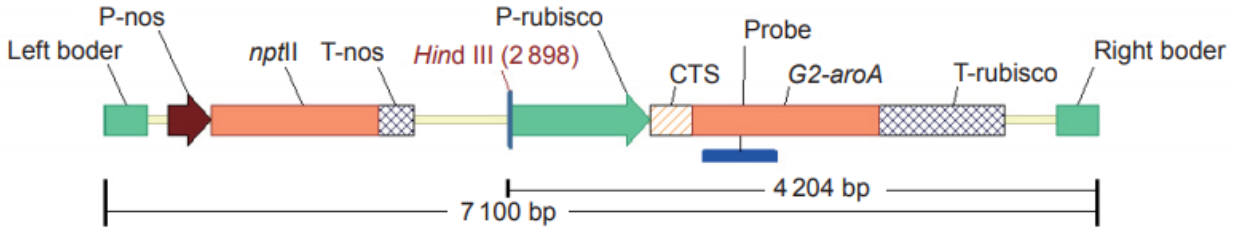


**Figura 6.** Diagrama general de cultivo in vitro y transformación de *Agave* mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (Gutiérrez-Aguilar et al., 2016).

## 2. 4. Vectores de expresión

Un vector de expresión usado con *A. tumefaciens* es un DNA plasmídico constituido por: T-DNA con bordes en la región 5' y 3', los cuales llevan el gen foráneo, un origen de replicación para multiplicarse en cepas de *E. coli* o *A. tumefaciens*, genes marcadores de selección para mantener al vector dentro de la célula bacteriana, al menos un gen reportero de selección de plantas transgénicas y por secuencias regulatorias que determinan el tiempo, nivel y tejido donde se expresarán los transgenes (Sharry et al., 2015; Ravanfar et al., 2017; Zhang et al., 2016). En la figura 8, se presenta gráficamente la constitución de un vector de expresión con las características anteriormente descritas.





**Figura 7.** Estructura molecular de un vector de expresión para plantas. P-rubisco: promotor de la subunidad pequeña Daisy Rubisco; T-rubisco: terminador de subunidad pequeña Daisy Rubisco; CTS: péptido señal de cloroplasto de subunidad pequeña Daisy Rubisco; P-nos: Nos promotor; T-nos: Nos terminador; *nptII*: gen de neomicina fosfotransferasa; *G2-aroA*: gen 5-enolpiruvil-shikimate-3-fosfato sintasa (Zhang *et al.*, 2016).

Los vectores binarios como pGreen, pCAMBIA, pBin y pSB (tabla 4), son los más empleados en dicotiledóneas y en algunas monocotiledóneas (Traore & Zhao, 2011; Ranvafar *et al.*, 2017; Zeevi *et al.*, 2013).

**Tabla 4.** Vectores binarios más comunes en transformación genética de plantas (Komari *et al.*, 2006; Revisada en: Ranvafar *et al.*, 2017).

Vector	Agente de selección plantas	Agente de selección bacterias	Fuente de bordes	Origen de replicación ( <i>E. coli</i> )	Movilización
pBin19	Kanamicina	Kanamicina	pTiT37	IncP	Sí
pB1121	Kanamicina	Kanamicina	pTiT37	IncP	Sí
pGrenn series	Kanamicina/Higromicina/Bar	Kanamicina	pTiT37 (sintético)	IncW	No
pCAMBIA series	Kanamicina/Higromicina	Cloramfenicol/Kanamicina	pTiC58	pVS1	Sí
pGA482	Kanamicina	Tetraciclina/Kanamicina	pTiT37	IncP	Sí
pBIBACC	Kanamicina/Higromicina	Kanamicina	Octopina	PRi	Sí
pSB11	ND	Spectinomomicina	pTiT37	ND	Sí
pSB1	ND	Tetraciclina	NA	IncP	Sí

ND= No disponible

Los genes de selección bacteriana que se usan frecuentemente son *nptII* y *aadA*, los cuales confieren resistencia a los antibióticos kanamicina y estreptomomicina, respectivamente (Lin *et al.*, 2011; Ravanfar *et al.*, 2017). Por su parte, cuando se trata de seleccionar plantas, los más utilizados son *nptII*, *bar*, *hpt* y *epsps* (tabla 5).

**Tabla 5.** Genes de selección usados en bacterias y plantas transgénicas para conferir resistencia a antibióticos o herbicidas (modificado de: Ravanfar et al., 2017)

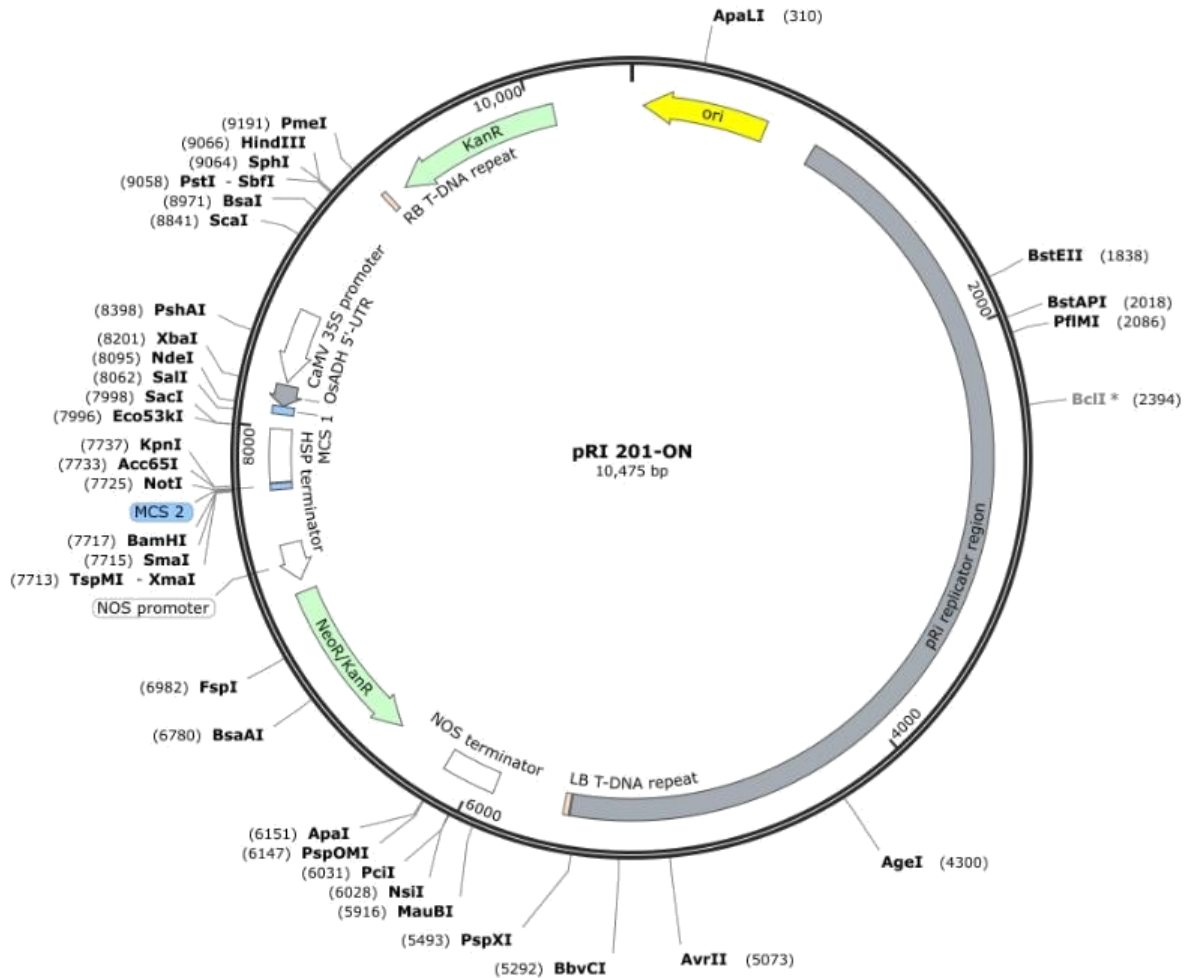
Gen	Producto de gen	Agente (s) de selección	Origen de gen
<i>nptIIIneo</i> <sup>P</sup>	Neomicina fosfotransferasa II	Kanamicina, neomicina, sulfato G418, paromomicina, amikacina	<i>Escherichia coli</i> , transposon Tn5
<i>bar</i> <sup>P</sup>	Fosfinotricina acetiltransferasa	Glufosinato de amonio, L-fosfinotricina (PPT), Bialafos	<i>Streptomyces hygroscopicus</i>
<i>pat</i> <sup>P</sup>	Fosfinotricina acetiltransferasa	Glufosinato de amonio, L-fosfinotricina (PPT), Bialafos	<i>Streptomyces viridochromogenes</i>
<i>Bla</i>	β-Lactamasa	Penicilina, ampicilina	<i>Escherichia coli</i>
<i>aadA</i> <sup>P</sup>	Aminoglucósido-3'-adeniltransferasa	Estreptomocina, Espectinomicina	<i>Shigella flexneri</i>
<i>Hpt</i>	Higromicina fosfotransferasa	Higromicina B	<i>Escherichia coli</i>
<i>nptIII</i>	Neomicina fosfotransferasa III	Amikacina, kanamicina, neomicina, sulfato G418, paromomicina	<i>Streptococcus faecalis</i> R plasmid
<i>epspslaroA</i> <sup>P</sup>	5-Enoilpiruvato Shikimato-3-fosfato	Glifosato	<i>Agrobacterium CP4</i> , <i>Zea mays</i> , <i>Petunia hybrid</i>
<i>Gox</i>	Glifosato oxidoreductasa	Glifosato	<i>Achromobacter LBAA</i>
<i>Bxn</i>	Bromoxinil nitrilasa	Bromoxinil	<i>Klebsiella pneumoniae</i> var, <i>iozaenae</i>
<i>Als</i>	Acetolactato sintasa	Sulfonilureas, imidazolinones, triazolopirimidinas	<i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>Nico Brassica napus</i>
<i>cat</i> <sup>P</sup>	Cloramfenicol acetiltransferasa	Cloramfenicol	Bacteriophage P1 Cm <sup>R</sup>
<i>TDC</i>	Triptofano decarboxilasa	4-Metiltripotofano	<i>Catharanthus roseus</i>
<i>uidAIGUS</i>	β-Glucuronidasa	Citoquinina glucuronidasa	<i>Escherichia coli</i>
<i>xylA</i>	Xilulosa isomerasa	D-Xilosa	<i>Thermoana</i>
<i>manA</i>	Fosfomanosa isomerasa	Manosa-6-fosfato	<i>Escherichia coli</i>
<i>BADH</i> <sup>P</sup>	Betaína aldehído deshidrogenasa	Betaína aldehído	<i>Spinacia oleracea</i>

Es importante determinar previamente a la etapa de selección de plántulas, una concentración inhibitoria mínima del agente (antibiótico o herbicida), que provoque

exclusivamente la muerte de los explantes no transformados; seleccionando positivamente a los que sí lo hicieron (Ravanfar et al., 2017).

#### **2. 4.1. Vectores de expresión para monocotiledóneas**

La habilidad para desarrollar vectores de expresión efectivos es uno de los obstáculos y requisitos principales para realizar ensayos de transformación genética exitosos (Baloglu *et al.*, 2013). Con plantas recalcitrantes, se han obtenido avances notables en el diseño de plásmidos optimizados; por ejemplo, el 5'-UTR (5'-región no traducida) funciona como un potenciador traduccional en células vegetales de monocotiledóneas y es necesario para expresar genes foráneos de forma eficaz. El 5'-UTR del gen codificante correspondiente a la enzima alcohol deshidrogenasa (*ADH*) de *Oryza sativa* se ha posicionado como un potenciador excelente para estas especies (Sugio *et al.*, 2007). El vector binario comercial pRI201-ON (Takara®) fue creado con la finalidad de sobreexpresar un gen foráneo en plantas monocotiledóneas, inclusive con la opción de expresar un segundo gen; este plásmido destaca por la incorporación del 5'UTR del gen *OsADH* (figura 8).



**Figura 8.** Vector binario comercial pRI201- ON de Takara® (plásmido vacío). Disponible en <https://takara-bio.com>

Una mayor expresión de genes foráneos en monocotiledóneas por el uso de 5´-UTRs puede mejorar la elección de genes de selección adecuados para cada especie bajo estudio. El vector pRI201-ON contiene el gen que otorga resistencia a kanamicina/neomicina, pero desafortunadamente se ha reportado que algunas especies monocotiledóneas son sumamente resistentes a estos antibióticos (Shuja, 2021; Yue et al., 2020). Por ende el agente de selección que más se recomienda es higromicina, un herbicida que provoca mayor susceptibilidad que el antibiótico kanamicina; por lo que el gen *hpt* luce como el adecuado a incluirse en vectores que pretenden ser optimizados

(Yue et al., 2020). La expresión de este gen suele potenciarse mediante el uso de promotores constitutivos fuertes, ejemplos de ellos son: Ubiquitina 1 del maíz (*ZmUbi1*), *ACTIN1* del arroz, o el virus del mosaico de la coliflor (CaMV) 35S (Mikami et al., 2015; Yue et al., 2020).

Contradictoriamente, también se han reportado con éxito el uso de otros genes en variedad de protocolos con algunas plantas, tales como *nptII*, *bar* y *als* en monocotiledóneas, evidenciando la necesidad de ensayos que permitan determinar experimentalmente los genes de selección para cada especie (Hu et al., 2016).

## **2. 5. *Sansevieria*: importancia dentro de la familia *Asparagaceae***

*Asparagaceae* es una familia que se conforma de plantas que producen flores e incluye 51 géneros y alrededor de 670 especies reportadas y clasificadas (APG III, 2009; Mabberley, 2008; Steele et al., 2012). La mayoría de estas especies son reconocidas por contener numerosos compuestos, tales como fenoles, esteroides, triterpenos, taninos, glicósidos y alcaloides, entre muchos otros. Son además fuente de productos valiosos como alimento y forraje, combustibles, bebidas, cosméticos, fibras para fabricar cuerdas, y variedad de fármacos. Debido al creciente conocimiento sobre los productos valiosos que se obtienen de ellas, el estado de conservación de algunas especies de esta familia es crítico provocado por una sobreexplotación ligada al incremento en las actividades antropogénicas (Qadir et al., 2017).

Desde 1974 hasta 2016, un grupo de alrededor de 70 especies monocotiledóneas conformó el género *Sansevieria* e incluía especies ornamentales de alto valor por sus propiedades estéticas, medicinales y por emplearse como fuente de fibras naturales (Lu and Morden et al., 2014; Mbugua and Moore, 1996; Patil and Pai, 2010; van Kleinwee et al., 2021, APG II). Sin embargo, recientemente con la ayuda de herramientas moleculares, surge una controversia taxonómica que plantea la posibilidad de incluir a estas especies (tabla 6) dentro del género *Dracaena*, subfamilia *Nolinoideae* y familia *Asparagaceae* (Chase et al., 2016; Guo et al., 2021; Lu and Morden, 2014; Tallei et al., 2016; Takawira-Nyenya et al., 2018; van Kleinwee et al., 2021; Webb and Newton, 2017).

**Tabla 6.** Listado de especies reportadas de *Sansevieria* (modificada de: Baldwin & Webb, 2016)

<b>Especie</b>	<b>Año</b>	<b>Morfología de hojas</b>
<i>Sansevieria aethiopica</i> Thunberg	1974	Aplanadas, estrechas
<i>Sansevieria arborens</i> Cornu ex Gérôme & Labroy	1903	Elípticas, caídas, planas
<i>Sansevieria ascendens</i> L.E. Newton	2010	Elípticas, caídas
<i>Sansevieria aubrytiana</i> Carriere	1861	Anchas
<i>Sansevieria bacularis</i> Pfennig ex Butler & Jankalski	2010	Cilíndricas
<i>Sansevieria bagamoyensis</i> N.E. Brown	1913	Aplanadas, estrechas
<i>Sansevieria ballyi</i> L.E. Newton	2004	Cilíndricas
<i>Sansevieria bella</i> L.E. Newton	2000	Cilíndricas
<i>Sansevieria braunii</i> Engler & Krause	1911	Anchas
<i>Sansevieria burdettii</i> Chahinian	2000	Cilíndricas
<i>Sansevieria burmanica</i> N.E. Brown	1915	Aplanadas, estrechas
<i>Sansevieria canaliculata</i> Carrière	1861	Cilíndricas, estriadas
<i>Sansevieria concinna</i> N.E. Brown	1915	Cóncavas
<i>Sansevieria conspicua</i> N.E. Brown	1913	Anchas
<i>Sansevieria cylindrica</i> Bojer ex Hocker	1859	Cilíndricas
<i>Sansevieria dawei</i> Stapf	1906	Anchas
<i>Sansevieria dooneri</i> N.E. Brown	1915	Aplanadas, estrechas
<i>Sansevieria downsii</i> L.E. Newton	2000	Elípticas, caídas
<i>Sansevieria dumetescens</i> L.E. Newton	2009	Amplias, aplanadas
<i>Sansevieria ebracteata</i> (Cavanilles) C.R. Suresh	1988	Cilíndricas, caídas
<i>Sansevieria ehrenbergii</i> Schweinfurth ex Baker	1875	Elípticas, caídas
<i>Sansevieria eilensis</i> Chahinian	1995	Elípticas, caídas
<i>Sansevieria elliptica</i> (Chiovenda) Cufodontis	1971	Anchas
<i>Sansevieria erythraeae</i> Mattei	1918	Elípticas
<i>Sansevieria fasciata</i> Cornu ex Gérôme	1903	Anchas
<i>Sansevieria fischeri</i> (Baker) Marais	1986	Cilíndricas
<i>Sansevieria formosa</i> Chahinian	2012	Elípticas, caídas
<i>Sansevieria forskaliana</i> (Schultes fil.) Hepper & Wood	1983	Anchas
<i>Sansevieria francisii</i> Chahinian	1995	Tipo bráctea
<i>Sansevieria frequens</i> Chahinian	2000	Anchas
<i>Sansevieria gracilis</i> N.E. Brown	1911	Cilíndricas
<i>Sansevieria gracillima</i> Chahinian	2005	Cilíndricas
<i>Sansevieria grandicuspis</i> Haworth	1812	Anchas
<i>Sansevieria hallii</i> Chahinian	1996	Elípticas, engrosadas
<i>Sansevieria hargeisana</i> Chahinian	1994	Cilíndricas

<i>Sansevieria humiflora</i> D.J. Richards	2004	Elípticas, engrosadas
<i>Sansevieria hyacinthoides</i> (Linné) Druce	1914	Anchas
<i>Sansevieria kirkii</i> Baker	1887	Anchas
<i>Sansevieria iberica</i> Gérôme & Labroy	1903	Anchas
<i>Sansevieria lineata</i> T.G. Forrest	2013	Anchas
<i>Sansevieria longiflora</i> Sims	1826	Anchas
<i>Sansevieria longistyla</i> la Croix	2004	Anchas
<i>Sansevieria lunatifolia</i> Newton	2014	Elípticas, caídas
<i>Sansevieria masoniana</i> Chahinian	2000	Anchas
<i>Sansevieria metallica</i> Gérôme & Labroy	1903	Anchas
<i>Sansevieria newtoniana</i> T.G. Forrest	2014	Anchas
<i>Sansevieria nilotica</i> Baker	1875	Anchas
<i>Sansevieria nitida</i> Chahinian	2001	Anchas
<i>Sansevieria parva</i> N.E. Brown	1915	Estrechadas, aplanadas
<i>Sansevieria patens</i> N.E. Brown	1915	Elípticas, caídas
<i>Sansevieria pearsonii</i> N.E. Brown	1911	Elípticas, caídas
<i>Sansevieria pedicellata</i> la Croix	2004	Anchas
<i>Sansevieria perroti</i> Warburg	1901	Elípticas, caídas
<i>Sansevieria pfisteri</i> D.J. Richards	2009	Elípticas, caídas
<i>Sansevieria phillipsiae</i> N.E. Brown	1913	Cilíndricas
<i>Sansevieria pinguicula</i> P.R.O. Bally	1964	Cónicas, caídas
<i>Sansevieria powellii</i> N.E. Brown	1915	Elípticas, caídas
<i>Sansevieria powysii</i> L.E. Newton	2010	Elípticas, caídas
<i>Sansevieria raffillii</i> N.E. Brown	1915	Anchas
<i>Sansevieria rhodesiana</i> N.E. Brown	1915	Elípticas, caídas
<i>Sansevieria robusta</i> N.E. Brown	1915	Elípticas, caídas
<i>Sansevieria rorida</i> (Lanza) N.E. Brown	1915	Elípticas, caídas
<i>Sansevieria roxburghiana</i> Schultes	1829	Cilíndricas, caídas
<i>Sansevieria scimitariformis</i> D.J. Richards	2002	Elípticas, engrosadas
<i>Sansevieria senegambica</i> Baker	1875	Anchas
<i>Sansevieria sinus-simiorum</i> Chahinian	2002	Elípticas, caídas
<i>Sansevieria stuckyl</i> Godefroy-Lebeuf	1903	Cilíndricas
<i>Sansevieria subspicata</i> Baker	1889	Anchas
<i>Sansevieria subtilis</i> N.E. Brown	1915	Anchas
<i>Sansevieria suffruticosa</i> N.E. Brown	1915	Cilíndricas
<b><i>Sansevieria trifasciata</i> Prain</b>	1903	Anchas, aplanadas, verticales
<i>Sansevieria volkensii</i> Gürke	1895	Cilíndricas
<i>Sansevieria zeylanica</i> (Linné) Wildenow	1799	Estrechadas, aplanadas

Las especies del género *Dracaena* tienen como característica una clara subdivisión del mesófilo dentro del parénquima y un tejido central incoloro destinado al almacenamiento de agua. Además presentan haces vasculares dispersos fibrosos y largos. El agua se contiene de forma efectiva en grupos de células de almacenamiento, mismas que se asocian a paredes delgadas no vivas y que son incrustadas en una red interconectada por pequeñas células vivas y que conduce a que las especies del género muestren diferentes grados de xeromorfismo y tipos de succulencias (Martin et al., 2019). Pueden también diferir en la forma de sus hojas, estas pueden ser cilíndricas, en forma de un cóncavo plano y verticales (*Sansevieria deserti*), o planas y horizontales (*Sansevieria trifasciata* cv. Hahnii) (Carlquist & Schneider, 2007; Martin et al., 2019).

### **2. 5.1. *Sansevieria trifasciata*: avances genómicos**

*Sansevieria trifasciata* Prain es una de las especies más atractivas del género *Dracaena*. Es una planta originaria de África occidental y de algunos países asiáticos (Takawira & Nordal, 2001; Thu et al., 2021); pero actualmente está ampliamente distribuida en zonas tropicales y subtropicales de todo el mundo, una adaptación posiblemente relacionada a su metabolismo CAM que le permite ser resistente a estrés hídrico y salino (Hematharshini & Seran, 2017; Lu & Morden, 2014). Las plantas cuentan con un ciclo vegetativo perenne y se han reportado muchos híbridos y variedades para su uso ornamental dentro de la especie que dificultan la identificación taxonómica correcta (Tallei et al., 2016; Yusnita et al., 2011). En la tabla 7 se enlistan algunas de las variedades más cultivadas y atractivas por los productores e investigadores.



**Tabla 7.** Listado de variedades destacadas de *Sansevieria trifasciata*

Especie	Variedad	Características foliares	Altura máxima
<i>Sansevieria trifasciata</i>	Black Gold	Hojas de color verde oscuro y un llamativo borde amarillo dorado	90 cm
<i>Sansevieria trifasciata</i>	Futura Robusta	Hojas de color verde grisáceo con patrones rayados	60 cm
<i>Sansevieria trifasciata</i>	Twisted Sister	Hojas verdes y amarillas se enrollan dando una forma distorsionada	30 cm
<i>Sansevieria trifasciata</i>	Golden Hahnii	Hojas anchas y afiladas con marcas de rayas horizontales verde oscuro y claro	20 cm
<i>Sansevieria trifasciata</i>	Futura Superba	Hojas de color verde brillante y tiras de color amarillo dorado	100 cm
<i>Sansevieria trifasciata</i>	Lorentii	Hojas altas y elegantes de color verde desordenado y amarillo en las bandas	90 cm
<i>Sansevieria trifasciata</i>	Hahnii	Hojas anchas con marcas de rayas de diversos tonos verdes	15 cm
<i>Sansevieria trifasciata</i>	Gold Flame	Hojas de color verde oscuro con verde-amarillo en el centro	30 cm
<i>Sansevieria trifasciata</i>	Midnight Shine	Hojas gruesas de tonos verdes con márgenes de color amarillo brillante	30 cm
<i>Sansevieria trifasciata</i>	Bantel Sensation	Hojas largas y delgadas, tonos verdes bajos y rayas blancas longitudinales	90 cm

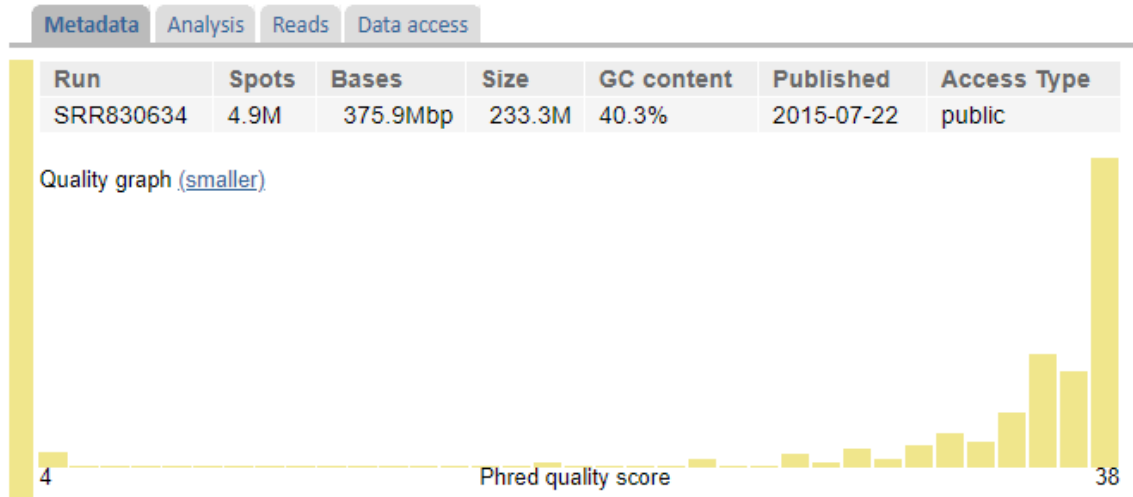
Fuentes: Pérez-León et al., 2013; <https://www.hortnculture.com/>, <https://snakeplantcare.com/>, <https://www.naturalista.mx/>, <https://leafyplace.com/>

En la península de Yucatán, *S. trifasciata* es de suma importancia cultural, pues se emplea como materia prima en la elaboración de artesanías y textiles a partir de sus fibras duras y finas (Arroyo-Irigoyen & Terán-Contreras, 2010; Rwawiire & Tomkova, 2015; Wolela, 2019). A diferencia de las especies de *Agave* que son empleadas con el mismo fin como henequén (*Agave fourcroydes*), sisal (*Agave sisalana*) y agave híbrido 11648 ((*A. amaniensis* x *A. angustifolia*) x *A. amaniensis*), *S. trifasciata* es de menor tamaño, es abundante en germoplasma, tiene un ciclo biológico más corto y su reproducción es mucho más fácil (Raya et al., 2021; Steele et al., 2012; Arroyo-Irigoyen & Terán-Contreras, 2010).

*S. trifasciata*, o lengua de suegra o planta serpiente como es conocida comúnmente, cuenta con un primer draft de secuenciación de su genoma nuclear, el cual indica un

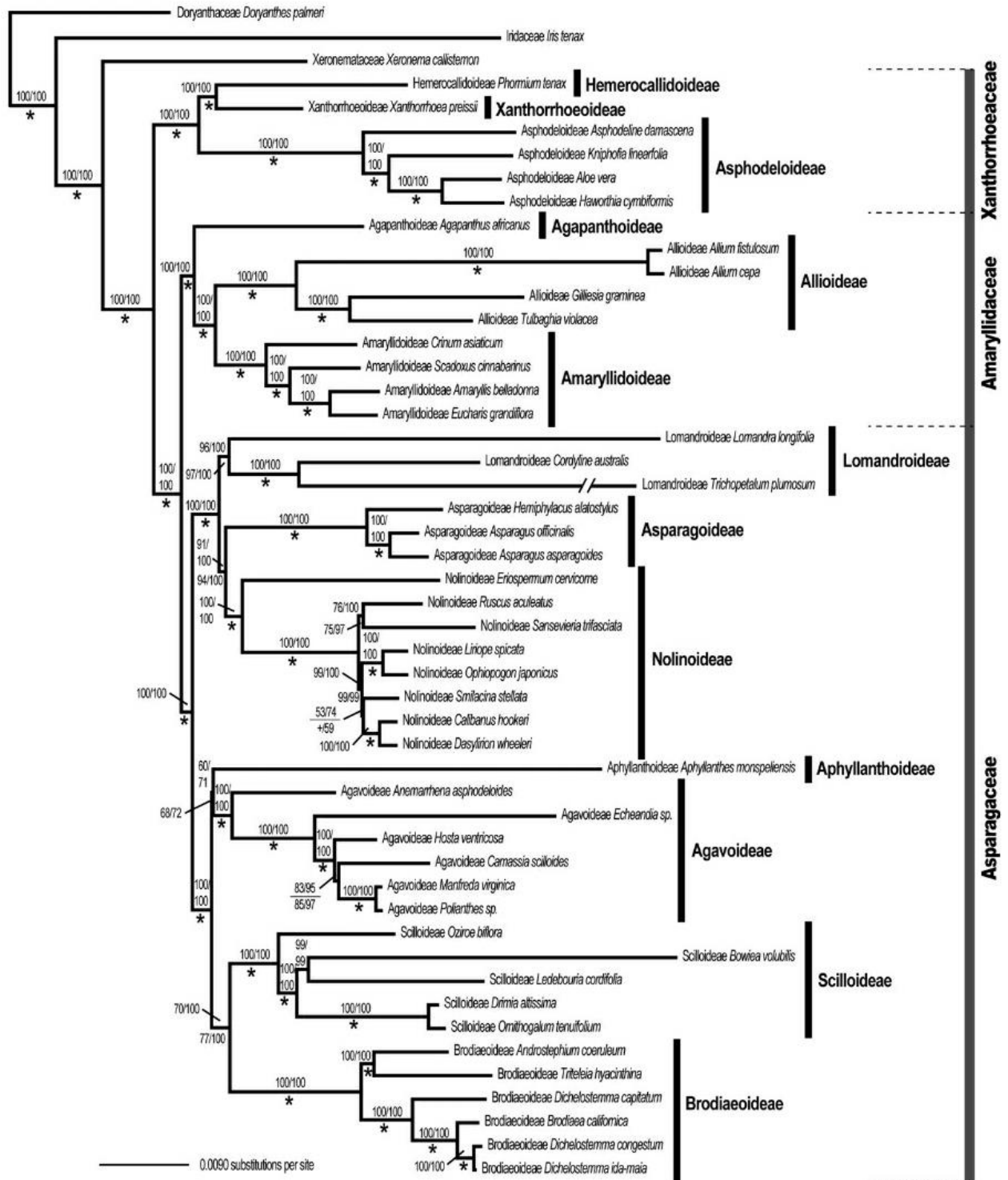
tamaño de aproximadamente 375.9 Mpb (figura 9). La secuenciación de su genoma fue una iniciativa de la Universidad de Missouri titulada "Collaborative Research: From Acorus to Zingiber - Assembling the Phylogeny of the Monocots", fue realizada con la finalidad de establecer relaciones evolutivas entre linajes de la clase monocotiledóneas (Givnish et al., 2010).

### Sansevieria trifasciata GSS (SRR830634)



**Figura 9.** Datos de secuenciación del genoma nuclear de *Sansevieria trifasciata* disponible en NCBI (tomada de: <https://trace.ncbi.nlm.nih.gov/Traces/sra/?run=SRR830634>).

Dentro de la iniciativa "Collaborative Research: From Acorus to Zingiber - Assembling the Phylogeny of the Monocots" Steele *et al* (2012) secuenciaron el DNA genómico total de muestras en dos linajes de plantas monocotiledóneas, Poaceae y Asparagales, en la plataforma Illumina con un arreglo múltiple. Se analizaron también 50 plastomas de Asparagales para evaluar relaciones entre los clados principales dentro del orden, ensamblando los plastomas completos de tres Asparagales: *Asparagus officinalis* (Asparagoideae), *Sansevieria trifasciata* (Nolinoideae) y *Trichopetalum plumosum* (Lomandroideae). En la figura 10 se ilustra el árbol inferido en ese estudio.



**Figura 10.** Árbol Maximum Likelihood (ML) inferido de 79 genes marcadores de plástidos, y de combinaciones de genes mitocondriales, de plástido y ribosomales nucleares; de 50 muestras (Steele *et al.*, 2012).

Aunado a este draft del genoma, existe un antecedente de secuenciación del transcriptoma de *S. trifasciata* ([https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/ERX2099802\[accn\]](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/ERX2099802[accn])), el cual se obtuvo como parte de un proyecto de transcriptomas de plantas (OneKP o 1KP), desarrollado por un consorcio internacional multidisciplinario que ha generado datos de secuenciación de genes a gran escala para más de 1000 especies de plantas. La iniciativa 1KP secuenció transcriptomas de 1342 muestras de 1173 especies de plantas que contienen cloroplastos. Sus criterios de selección no se sesgaron hacia los organismos modelo y las especies de cultivos donde otros esfuerzos de secuenciación de plantas se han centrado históricamente (Carpenter *et al.*, 2019). Para *S. trifasciata* se realizó una ejecución en ILLUMINA (Illumina Genome Analyzer II), lo que arrojó un total de 2Gpb y se hizo público en NCBI en 2017. Adicionalmente a los resultados de la iniciativa OneKP, algunas secuencias de genes marcadores de cloroplasto y de mRNA han sido depositados en el Genbank de NCBI. Estas secuencias corresponden a resultados de diferentes experimentos relacionados con *S. trifasciata*; en la tabla 8 se enlistan las principales secuencias.

**Tabla 8.** Secuencias de genes marcadores para *Sansevieria trifasciata* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

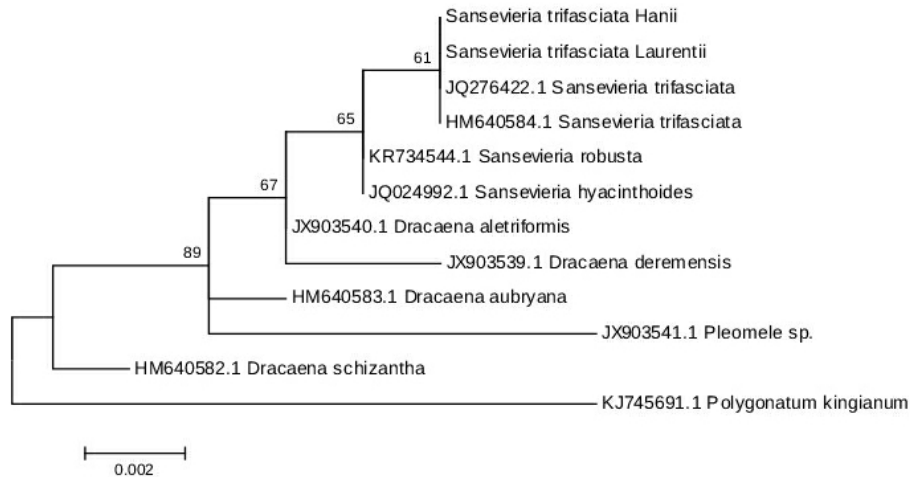
Gen	Tamaño	Estudio realizado	Referencia
<i>S. trifasciata</i> voucher Hosam 00474 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene, partial cds; chloroplast	552 pb DNA	Marcador secuenciado a partir de 225 especímenes de 161 especies y 62 familias de plantas de importancia hortícola	Elansary et al., 2017.
<i>S. trifasciata</i> isolate MVRF _2062256 putative LOV domain-containing protein mRNA	2814 pb mRNA	Identificación de 6,782 proteínas LOV de ~42 millones de ORF (> 5,700 organismos que abarcan dos bases de datos, Interpro y OneKP (~1300 plantas terrestres)	Glantz et al., 2016.
<i>S. trifasciata</i> voucher D.K. Kim 07-005 ATP synthase beta subunit (atpB) gene	1446 pb DNA	Análisis filogenético de red vecina para analizar un conjunto de datos de muestreo a mayor escala de Asparagales	Chen et al., 2013.
<i>S. trifasciata</i> voucher DK Kim 07-05(TUT) maturase K-like (matK) gene, complete sequence; chloroplast	1556 pb DNA	Análisis filogenético de un conjunto de datos combinados para 126 taxones de Ruscaceae s.l. y grupos relacionados en Asparagales basados en tres genes de codificación de ADN nuclear y plastídico, 18S rDNA (1796 pb), rbcl (1338 pb) y matK (1668 pb)	Kim et al., 2010.

## 2. 6. *Sansevieria trifasciata* como modelo de estudio de fibras naturales

*Sansevieria trifasciata* es la especie más comercializada del grupo *Sansevieria*, en la actualidad representa una de las plantas más recomendadas para promover una alta calidad y pureza en el aire ya que es capaz de absorber alrededor de 107 tipos de toxinas, incluyendo la contaminación del aire y humo de cigarro. Además esta especie contiene altas concentraciones de fitoquímicos como flavonoides, saponinas y glucósidos que se están demostrando cuentan con actividad antimicrobiana. Su riqueza en metabolitos secundarios la están posicionando como planta medicinal potencial (Rembet et al., 2016; Berame et al., 2017).

Las hojas de lengua de vaca son diversas, hermosas y de fácil mantenimiento, buenas como plantas de interior o exterior lo cual explica el gran auge que tienen en el mercado internacional. Al menos 20 cultivares de *S. trifasciata* son vendidos en todo el mundo, entre algunas de ellas recientemente se ha demostrado que no hay variación intraespecífica (Wahyuningsih et al., 2013; Rembet et al., 2016; Tallei et al., 2016).

*S. trifasciata* cv. *Lorentii* y *S. trifasciata* cv. *Hahnii* figuran entre las preferidas por el mercado internacional; las características morfológicas de ambas son muy distintas, por ende, han llegado a ser consideradas como dos especies, sin embargo, se demostró que no existen diferencias en secuencias genéticas para ambas variedades (gen *matK*) (Rembet et al., 2016). En la figura 11 se ilustra el análisis filogenético realizado con algunas accesiones de especies de *Sansevieria* y de estas dos variedades de *S. trifasciata*.



**Figura 11.** Análisis filogenético de *Sansevieria trifasciata* (tomada de: Tallei et al., 2016)

Las hojas y raíces de *S. trifasciata* han sido empleadas en medicina tradicional asiática para el tratamiento de enfermedades como asma, diarrea, hemorroides, hipertensión, reumatismo y deficiencias nutricionales; e inclusive es útil ante mordeduras de serpiente (Kredy et al., 2010; Berame et al., 2017). Actualmente a nivel mundial se ha incrementado el interés en el uso de fibras naturales como posibles refuerzos en los denominados materiales compuestos, esto ha llamado la atención de los científicos e ingenieros de materiales debido a la necesidad de desarrollar un material amigable con el medio ambiente y como reemplazo de las fibras sintéticas (Sreenivasan et al., 2011). Algunos autores han documentado sus avances y los posibles usos de las fibras naturales, obtenidas de especies como el bambú, lino, caña de azúcar, yute, paja de trigo, coco, plátano, entre otras (Vega & Távora, 2018).

En este contexto *S. trifasciata* es de suma importancia en las zonas tropicales de México, pues es una planta que se ha empleado para la elaboración de distintos productos en la Península de Yucatán. Aunque inicialmente esta especie fue introducida al estado de Yucatán para usarse como barrera física contra incendios en cultivos de henequén (*Agave fourcroydes* Lem), en la actualidad es un cultivo de avistamiento común entre los huertos de pequeños agricultores mayas y mestizos del estado de Campeche (Neulinger et al., 2013; Kozłowski et al., 2020).

Las fibras duras obtenidas de las hojas de *S. trifasciata* al igual que de *S. zeylanica*, otra especie importante, son un poco más delgadas y finas que las que se extraen de henequén (Arroyo-Iriogoyen & Terán-Contreras, 2010; de Stefano et al., 2016). Su potencial uso se ve limitado por la complejidad del proceso de extracción, requieren de desfibradoras adecuadas para no afectarlas en tal procedimiento de obtención.

## **2. 7. Micropropagación de *Sansevieria trifasciata***

*Sansevieria trifasciata* fue mencionada por primera vez en un protocolo de micropropagación, hace unos 38 años, en 1984, por Blazich y Novitzky. El protocolo describía la inducción de organogénesis a partir de segmentos de hojas en un medio MS (Murashige and Skoog) enriquecido con la auxina 2, 4-D (ácido 2, 4 – diclorofenoxiacético) a una concentración de 0.25 mg·L<sup>-1</sup> durante dos semanas. Después de una etapa de dos semanas en medio sin reguladores de crecimiento, lograron inducir callos y posteriormente para inducir la formación de yemas adventicias usaron Kinetina a una concentración de 0.3 mg·L<sup>-1</sup>. Posterior a éste, en 2011 se reportó con mayor sustento que la promoción de yemas adventicias se consigue también con medios de cultivo suplementados con Benziladenina y no solo con Kinetina (Yusnita et al., 2011).

La ruta de regeneración mediante organogénesis en *S. trifasciata* se han realizado con *S. trifasciata* cv. Hahnii y cv. Lorentii, tanto de forma indirecta (Yusnita et al., 2011) como de forma directa (Hematharshini & Serán, 2017). Estos protocolos son aún escuetos, por lo que, mediante la ruta de embriogénesis somática, se realizó un intento reciente, en donde se indujeron callos tipo embriogénicos a partir de láminas foliares de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> (Loera-Quezada et al., 2019; datos sin publicar). En la tabla 9 se resumen los protocolos de organogénesis reportados.

**Tabla 9.** Avances recientes en protocolos de micropropagación de *Sansevieria trifasciata*

Cultivo	Estrategia de micropropagación	Observaciones	Referencia
<i>S. trifasciata</i> cv. Lorentii	Organogénesis indirecta usando 2, 4-D y Kin	Inducción de callos en 0.35 mg·L <sup>-1</sup> de 2, 4-D en 1 mes, proliferación de brotes en Kin después de 2.5 meses	Sarmast et al., 2009
<i>S. trifasciata</i> cv. Lorentii	Organogénesis indirecta usando 2, 4-D, BAP y ANA	Inducción de callos en 0.25 mg·L <sup>-1</sup> de 2, 4-D. En combinación de 0.5 mg·L <sup>-1</sup> de 2,4-D y 2.0 mg·L <sup>-1</sup> de BAP, diferenciación de brotes	Yu-Zhong et al., 2011
<i>S. trifasciata</i> cv. Hahnii y cv. Lorentii	Organogénesis indirecta usando 2, 4-D y BAP	Inducción de brotes en 2.0 mg·L <sup>-1</sup> de BAP, Lorentii proliferó una tasa mayor de regeneración que Hahnii después de 14 semanas	Yusnita et al., 2011
<i>S. trifasciata</i> cv. Lorentii	Organogénesis indirecta usando 2,4-D y BAP	Proliferación de 4.5 brotes por explante en 3 meses, y 11.1 brotes por explante después de 4 meses en 2.0 mg·L <sup>-1</sup> de BAP	Wahyuningsih et al., 2013
<i>S. trifasciata</i> cv. Lorentii	Organogénesis directa usando BAP y ANA	Sacarosa tiene influencia en elongación de brotes, al 3% hay mayor número de brotes y al 5% se induce el alargamiento del brote. Medio óptimo de proliferación fue de 2.0 mg·L <sup>-1</sup> de BAP y 0.5 mg·L <sup>-1</sup> de ANA	Hematharshini & Seran, 2017
<i>S. trifasciata</i> cv. Lorentii	Organogénesis directa usando BAP y ANA	Obtención de un promedio de 4.8 brotes por explante en 0.5 mg·L <sup>-1</sup> de ANA y 2.0 mg·L <sup>-1</sup> de BAP	Simbolon, 2017
<i>S. trifasciata</i> cv. Hahnii y cv. Lorentii	Embriogénesis somática usando 2, 4-D y BAP	Inducción de callos en 4 semanas en 2.0 y 3.0 mg·L <sup>-1</sup> de 2, 4-D, obtención de plántulas en 12-16 semanas en 4.0 mg·L <sup>-1</sup> de BAP, multiplicación de yemas adventicias en 12.0 mg·L <sup>-1</sup> de BAP y 0.025 mg·L <sup>-1</sup> de 2,4-D	Loera-Quezada et al., 2019 (datos sin publicar)



### **III. HIPÓTESIS**

Callos primarios tipo embriogénicos, inducidos a partir de tejido foliar de *Sansevieria trifasciata*, son susceptibles a transformación genética mediada por co-cultivo con *Agrobacterium tumefaciens*.

### **IV. OBJETIVOS**

#### **4.1. Objetivo general**

Desarrollar un protocolo de transformación genética de cultivo *in vitro* de *Sansevieria trifasciata* mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

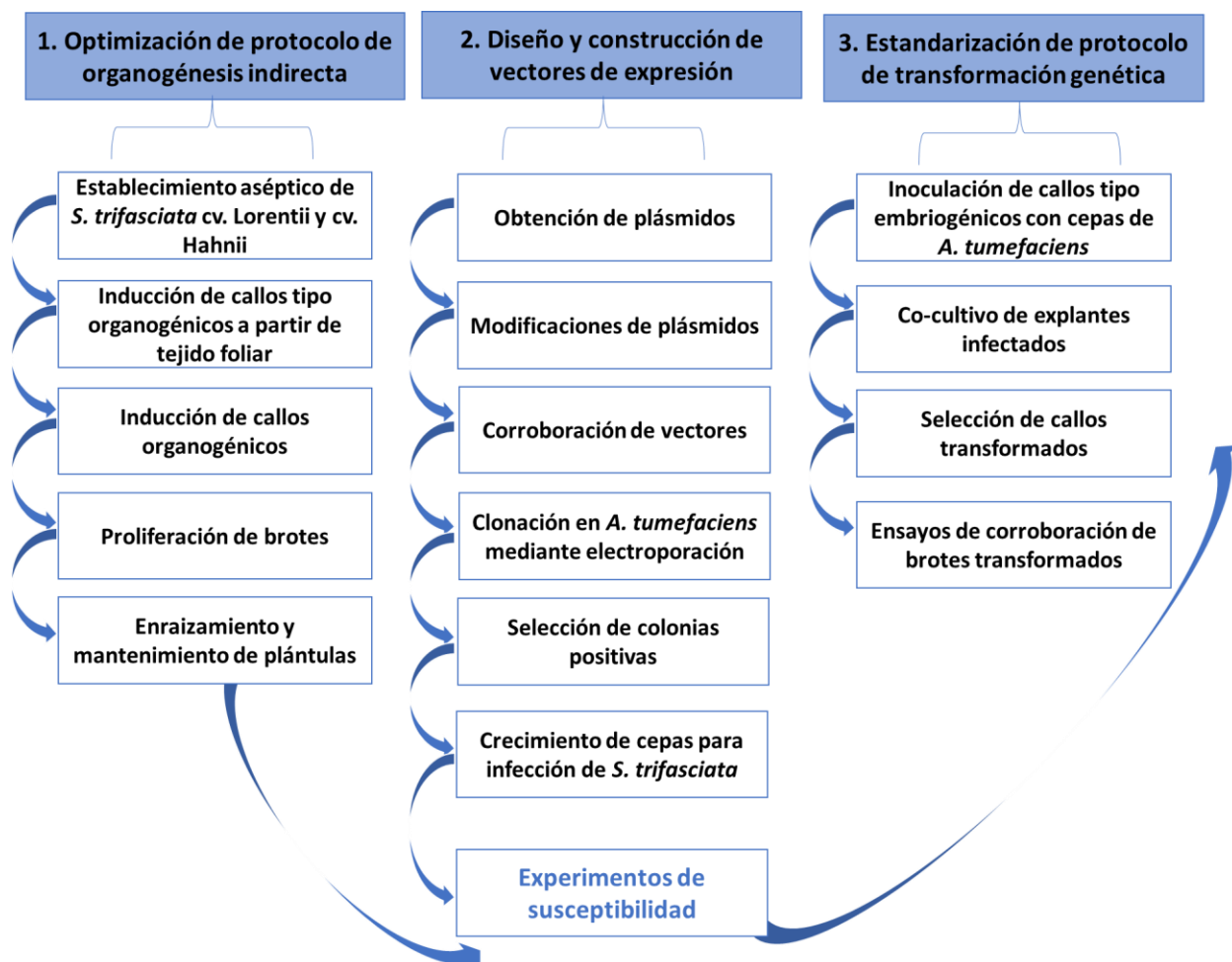
#### **4.2. Objetivos específicos**

1. Optimizar un protocolo de organogénesis indirecta a partir de explantes de tejido foliar de dos variedades contrastantes de *S. trifasciata*.
2. Diseñar y construir vectores de expresión que permitan realizar un seguimiento de eventos de transformación genética usando *A. tumefaciens*.
3. Estandarizar las condiciones de transformación genética de *S. trifasciata* mediante co-cultivo con *A. tumefaciens*

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Metodología general

Las actividades experimentales desarrolladas en este trabajo están comprendidas en tres fases relacionadas; la primera consistió en la optimización de un protocolo de organogénesis indirecta de dos variedades (Hahnii y Lorentii) de *Sansevieria trifasciata*, la segunda y tercera comprenden el establecimiento de un protocolo de transformación genética mediado por *Agrobacterium tumefaciens*, los cuales comprendieron la construcción de los vectores de expresión y los análisis de tolerancia a los agentes de selección y los ensayos de transformación, respectivamente. En la figura 12 se ilustra este proceso general.



**Figura 12.** Metodología general de manipulación *in vitro* de dos variedades de *Sansevieria trifasciata*

A continuación, se describen brevemente cada una de las fases de la metodología:

### 1. *Optimización de protocolo de organogénesis indirecta:*

El establecimiento *in vitro* del cv. Hahnii y cv. Lorentii de *S. trifasciata*, fundamental para realizar todo el proyecto se llevó a cabo en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales y Laboratorio de Genómica Funcional perteneciente al Colegio de Postgraduados Campus Campeche. El objetivo de esta primera fase consistió en determinar dosis óptimas de auxinas y tiempo para la inducción de callos primarios en ambos cultivares, así como el momento y células que originan dichos tejidos desdiferenciados en segmentos foliares. El proceso se caracterizó determinando tasas de proliferación de brotes, el tiempo requerido y el contenido de los medios de cultivo diseñados. Subsecuentemente, con estos datos, se determinó el comportamiento organogénico de cada variedad y se eligió en base a su rendimiento organogénico indirecto cuál de los dos cultivares representa la mejor opción para fines de micropropagación y transformación genética.

### 2. *Diseño de vectores de expresión*

Los vectores de expresión utilizados para ser movilizados vía *A. tumefaciens* fueron seleccionados comercialmente, se sometieron a análisis moleculares para corroborar su configuración, se modificaron conforme los comportamientos de los ensayos de susceptibilidad y finalmente se introdujeron en dos cepas de *A. tumefaciens*. Posterior a ello, se corroboraron las colonias positivas seleccionadas y se almacenaron a -80°C en un ultracongelador. Este proceso se llevó a cabo en el Laboratorio de Genómica Funcional perteneciente al Colegio de Postgraduados Campus Campeche.

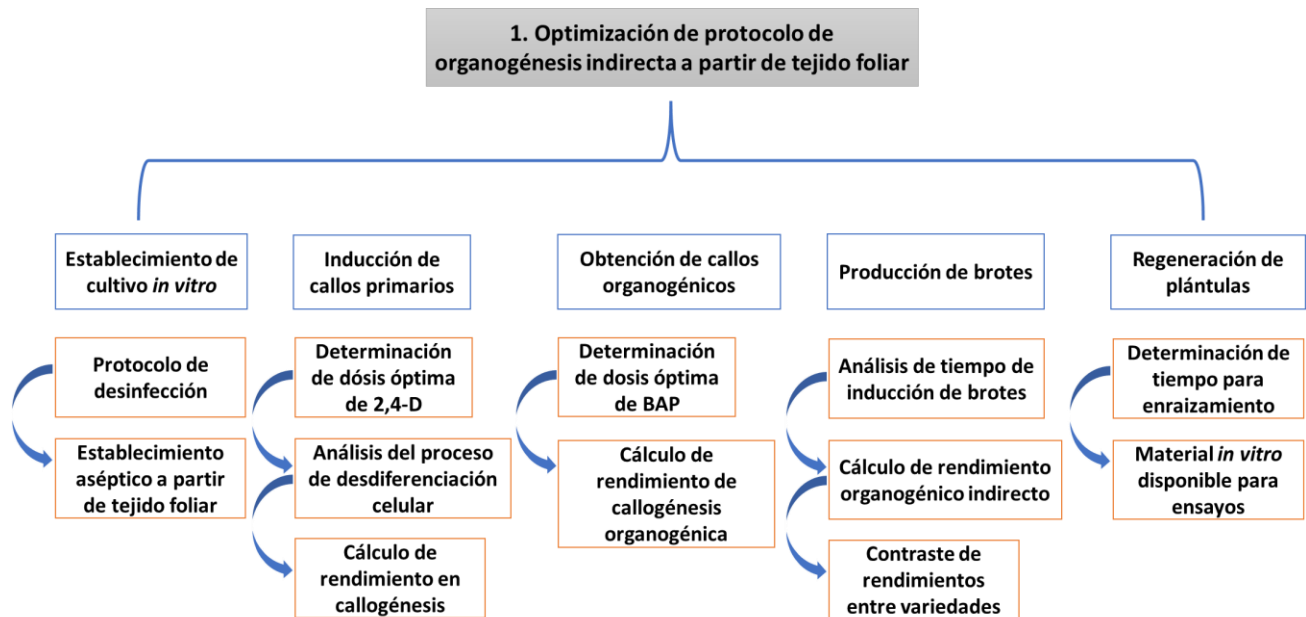
### 3. *Establecimiento de condiciones de transformación genética*

Esta fase se realizó en los dos laboratorios anteriormente mencionados, realizando los ensayos de susceptibilidad al agente de selección de acuerdo al vector de expresión usado y evaluando diferentes explantes. Posteriormente se prepararon los inóculos bacterianos necesarios, se infectaron callos tipo embriogénicos y bajo el sistema co-

cultivo se establecieron los primeros ensayos de transformación genética tomando como variables; la cepa, el vector y el tiempo de co-cultivo.

## 5.2. Optimización de protocolo de organogénesis indirecta

La optimización del protocolo de micropropagación mediado por organogénesis indirecta conlleva una serie de fases bien determinadas, en la figura 1 se ilustra el proceso llevado a cabo durante este primer objetivo.



**Figura 13.** Procedimiento general para optimización y cálculo de rendimiento durante organogénesis indirecta

### 5. 2.1. Material vegetal: establecimiento *in vitro*

El establecimiento *in vitro* de *S. trifasciata*, se realizó con éxito a partir de tejido foliar de plantas adultas adquiridas en viveros de la ciudad de San Francisco de Campeche y posteriormente propagadas en el sombreadero del Colegio de Postgraduados Campus Campeche. Caracterizamos las plantas madre midiendo el número de hojas, el largo, el ancho, el área, el peso fresco y seco de las tres hojas adultas completamente expandidas; se establecieron además las bases para un protocolo de organogénesis indirecta y uno para inducción de callos tipo embriogénicos (Quezada-Loera et al., 2019; datos sin publicar). No obstante, los tiempos para el desarrollo de ambos protocolos

fueron muy prolongados. Plántulas *in vitro* en fase de enraizamiento de *S. trifasciata* cv. Hahnii y cv. Lorentii fueron seleccionadas al azar (figura 14).



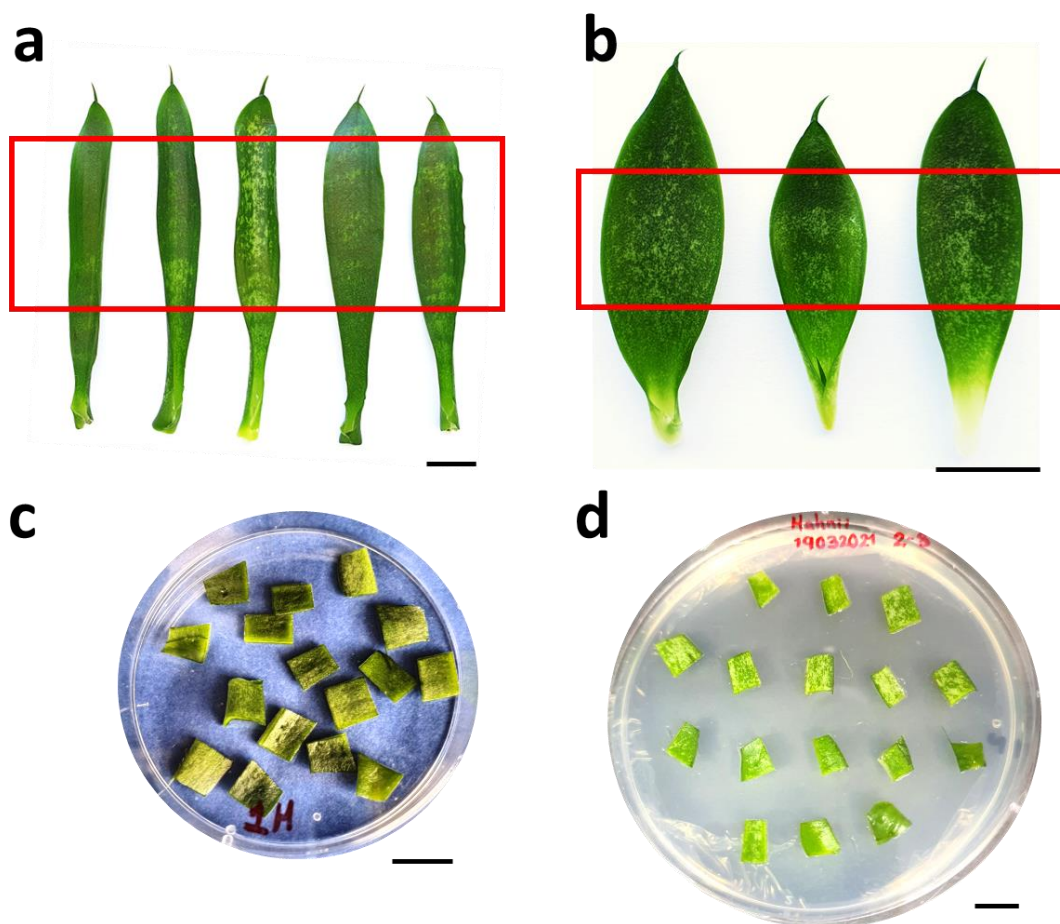
Variedad Lorentii

Variedad Hahnii

**Figura 14.** Plantas madre y plántulas *in vitro* de dos variedades altamente contrastantes de *Sansevieria trifasciata*

### 5. 2.2. Inducción de callos primarios (ICP)

Se seleccionaron plántulas *in vitro* de *S. trifasciata* cv. Hahnii y cv. Lorentii de entre 5 - 10 cm de altura. Los explantes consistieron en segmentos foliares de entre 0.5 - 1.0 cm<sup>2</sup> y fueron tomados de la parte central-apical de las hojas (figura 15a,b) debido a que previamente se ha reportado como la zona más callogénica (Gueye et al., 2009). Los explantes se sembraron durante 6 semanas en placas de Petri (figura 15c,d) que contenían 25 mL de medio MS (Phytotechnology laboratories®) suplementado con 2.0 o 3.0 mg·L<sup>-1</sup> del ácido 2, 4-Diclorofenoxiacético (Caisson labs®) y 0.65% (p / v) de Agar-micropropagation type (Caisson labs®) agregado como agente gelificante (tabla 10). El pH fue ajustado a 5.8±0.05. El material se incubó dentro de un cuarto de cultivo, bajo condiciones reguladas, con una temperatura constante de 25°C - 28° C y un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad.



**Figura 15.** Explantes usados para la obtención de callos primarios en *Sansevieria trifasciata*. Se muestra la zona dentro de la lámina foliar adecuada para la toma de segmentos de hoja. a) Tejido foliar de *S. trifasciata* cv. Lorentii, b) Tejido foliar de *S. trifasciata* cv. Hahnii, c) cortes de aproximadamente 0.5-1.0 cm<sup>2</sup>, d) siembra en medio MS suplementado con 2, 4-D. Barra= 1 cm.

**Tabla 10.** Diseño experimental para ensayos de inducción de callos primarios

Variedad	Tratamiento	Explante	Unidades experimentales* y réplicas**
Lorentii	MS + 2,4-D (2 mg·L <sup>-1</sup> )	Láminas foliares de 0.5-1 cm <sup>2</sup>	16x10
	MS + 2,4-D (3 mg·L <sup>-1</sup> )	Láminas foliares de 0.5-1 cm <sup>2</sup>	16x10
Hahnii	MS + 2,4-D (2 mg·L <sup>-1</sup> )	Láminas foliares de 0.5-1 cm <sup>2</sup>	16x10
	MS + 2,4-D (3 mg·L <sup>-1</sup> )	Láminas foliares de 0.5-1 cm <sup>2</sup>	16x10

\*Unidad experimental: segmento foliar \*\*Réplica: placa Petri con segmentos

Previo a la siembra en los medios de cultivo, los segmentos foliares cortados fueron pesados con ayuda de placas de Petri estériles y una balanza analítica. Se pesaron por réplica (figura 15c) y posteriormente, una vez sembrados, se fotografiaron homogéneamente todas las réplicas. Este diseño experimental se llevó a cabo tres veces antes de proceder a la fase de inducción de callos organogénicos (en presencia de BAP), los callos obtenidos también fueron pesados, se calculó el área de crecimiento y el porcentaje de eficiencia de inducción.

### **5. 2.3. Inducción de callos organogénicos (ICO)**

Posterior a las 6 semanas de inducción en medio con auxina, los callos primarios (tipo embriogénicos) se resembraron en medio MS (Phytotechnology laboratories®) adicionado con  $4.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de 6-Bencilaminopurina (Caisson labs®) con la finalidad de promover callos organogénicos, los cuales se caracterizan por tener pigmentos fotosintéticos. Esta fase duró 4 semanas.

### **5. 2.4. Inducción y proliferación de brotes (IB)**

Los callos organogénicos fueron obtenidos a las 4 semanas después del cambio de tratamiento, y se mantuvieron en resiembras periódicas en el mismo medio MS (Phytotechnology laboratories®) adicionado con  $4.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de 6-Bencilaminopurina (Caisson labs®), durante 8 - 12 semanas en placas de Petri para la inducción y proliferación de brotes. Los callos se incubaron a una temperatura de  $25^{\circ}\text{C}$ - $28^{\circ}\text{C}$  y un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad. Se realizó un monitoreo de multiplicación en cada variedad, se tomaron datos correspondientes a número y longitud de brotes, peso fresco y seco de masa organogénica total y exclusivamente de los brotes.

### **5. 2.5. Enraizamiento**

Para la regeneración de plántulas, los brotes inducidos fueron resembrados en medio MS libre de hormonas (Phytotechnology laboratories®), en frascos de vidrio transparente con tapa. Una vez obtenida la rizogénesis, las plántulas se subcultivaron cada 4 semanas

en el mismo medio de cultivo para su manutención *in vitro*. Las condiciones de crecimiento fueron las mismas que en las fases anteriores.

### 5. 2.6. Descripción de cálculo de rendimiento organogénico indirecto

Se estableció un experimento completo al azar con 160 segmentos foliares de *S. trifasciata* cv. Hahnii y cv. Lorentii (por triplicado) en presencia de dos concentraciones de 2,4-D (2 mg·L<sup>-1</sup> y 3 mg·L<sup>-1</sup>), el diseño experimental se detalló anteriormente. A continuación, se enlistan las variables evaluadas y la metodología usada para medir cada una de ellas:

**Peso segmentos foliares:** La obtención de pesos de los segmentos foliares se determinó con la siguiente fórmula:

$$\text{Peso de segmentos foliares por réplica} = \\ \text{Peso de placa Petri con segmentos foliares} - \text{Peso de placa Petri vacía}$$

**Para callos primarios:** El cálculo de peso fresco de los callos obtenidos a las 6 semanas de inducción, se obtuvo empleando la siguiente fórmula:

$$\text{Peso de callos primarios por réplica} = \\ \text{Peso de placa Petri con callos primarios} - \text{Peso de placa Petri vacía}$$

**Área de callos:** El área de crecimiento de callos se determinó en cada uno de los segmentos foliares de cada réplica técnica, usando la herramienta Image J® (versión 1.53e, Java 1.8.0\_172 64 bit) mediante la fórmula:

$$\text{Área adquirida} = \\ \text{Área de segmento foliar inicial} - \text{Área de callo primario}$$

**Porcentaje de inducción de brotes:** El porcentaje de inducción se obtuvo mediante el cálculo:



*Tasa de inducción = Número de segmentos desdiferenciados/Número de segmentos iniciales*

Una vez obtenidos los brotes proliferados a partir de los callos organogénicos, éstos se manipularon sin necesidad de un ambiente estéril, se determinó el número obtenido por réplica técnica y se relacionó con las fases iniciales callogénicas (tanto primaria como organogénica), las fórmulas empleadas fueron:

$$\begin{aligned} \text{Ganancia de biomasa durante organogénesis} = \\ \text{Peso de biomasa organogénica total} - \text{Peso de callos primarios} \end{aligned}$$

Donde: biomasa organogénica total= biomasa de callos organogénicos + biomasa de brotes

$$\text{Eficiencia de tasa organogénica} = \text{número de brotes/número de callos}$$

$$\text{Eficiencia organogénica en peso} = \text{número de brotes/gramo de callo primario}$$

$$\text{Eficiencia organogénica en peso} = \text{número de brotes/gramo de callo organogénico}$$

Finalmente se graficaron los datos recopilados para evaluar el contraste de rendimiento organogénico indirecto entre ambas variedades estudiadas. Los análisis ANOVA en ambas fases de micropropagación se llevaron a cabo de forma independiente utilizando el software SAS v. 9.2 (SAS Institute, Cary, NC, EE. UU.). Para las comparaciones entre tratamientos se realizaron las pruebas de diferencia honestamente significativa (HSD) de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

### **5. 2.7. Análisis histológicos de fibras y callos primarios de *Sansevieria trifasciata***

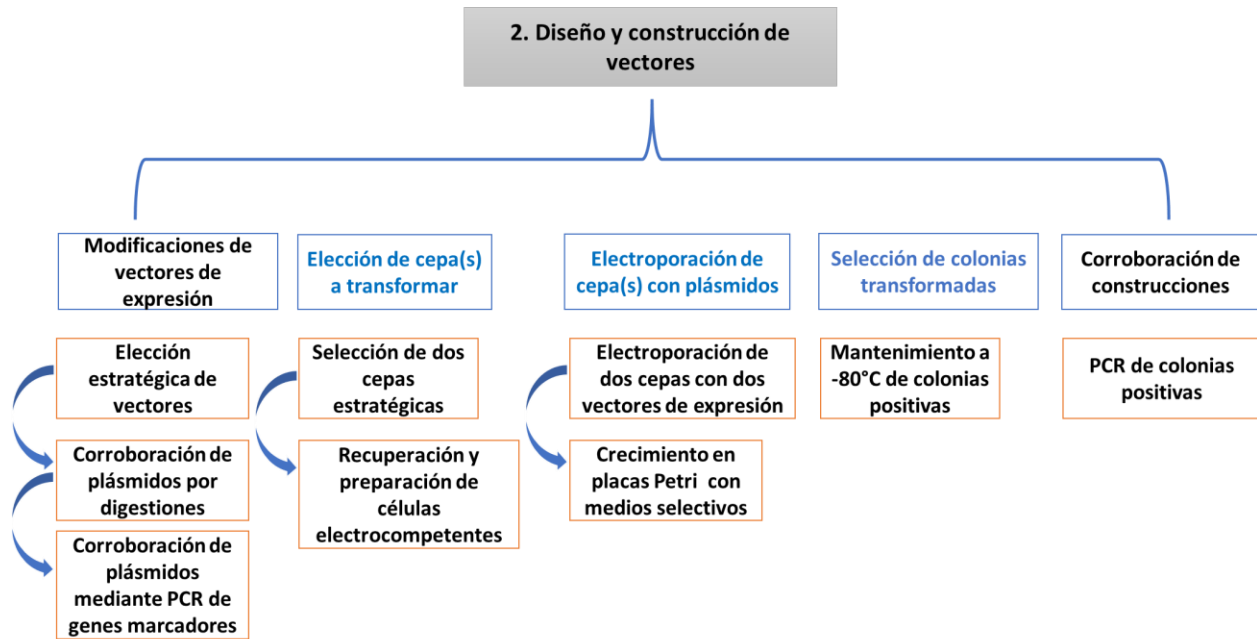
Se realizaron cortes histológicos de segmentos foliares de plantas madre de *S. trifasciata* con el objetivo de comparar la disposición de fibras entre ambos cultivares, así como también de segmentos foliares *in vitro* en etapas tempranas de callogénesis para identificar el tejido de origen y el momento ontogénico inicial en la inducción del callo. Segmentos foliares de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> obtenidos de plántulas *in vitro* de ambos cultivares fueron inoculados en medio MS suplementado con 2.0 mg·L<sup>-1</sup> de 2,4-D. Las

muestras *in vitro* en proceso de desdiferenciación celular (2, 4, 7, y 14 días después de inoculación) se retiraron de las placas de Petri y junto con muestras de explantes foliares recolectadas de plantas madre, se fijaron inmediatamente en paraformaldehído al 4% (p / v) en solución salina tamponada con fosfato 1X y se incubaron a 4° C durante una semana. Después de eso, se realizó la deshidratación de los tejidos recolectados en series graduadas de etanol (30, 50, 70, 85, 96 y 100%) dos veces durante dos horas cada vez a temperatura ambiente. Subsecuentemente, las muestras fueron incrustadas utilizando el kit de incrustación JB-4 (Polysciences®) de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Finalmente los explantes se cortaron en secciones longitudinales de 8-12 µm de grosor utilizando un micrótopo rotatorio automático (Leica RM2255). Inicialmente se hicieron observaciones bajo microscopía óptica convencional a través de un microscopio Leica DM6000 y se fotografiaron. Posteriormente las secciones transversales se tiñeron con una solución de azul de metileno al 1 % y azure B al 1 % (1:1) 65 durante 20 segundos a temperatura ambiente y se lavaron con agua destilada, se secaron a 50 °C durante la noche y se montaron sobre resina sintética (Hycel, 7987). Se utilizaron microscopios Leica DM2000 y Carl Zeiss Axioakop 2 plus para obtener imágenes de las secciones teñidas.

### **5. 3. Diseño, construcción y corroboración de vectores de expresión para**

#### ***Sansevieria trifasciata***

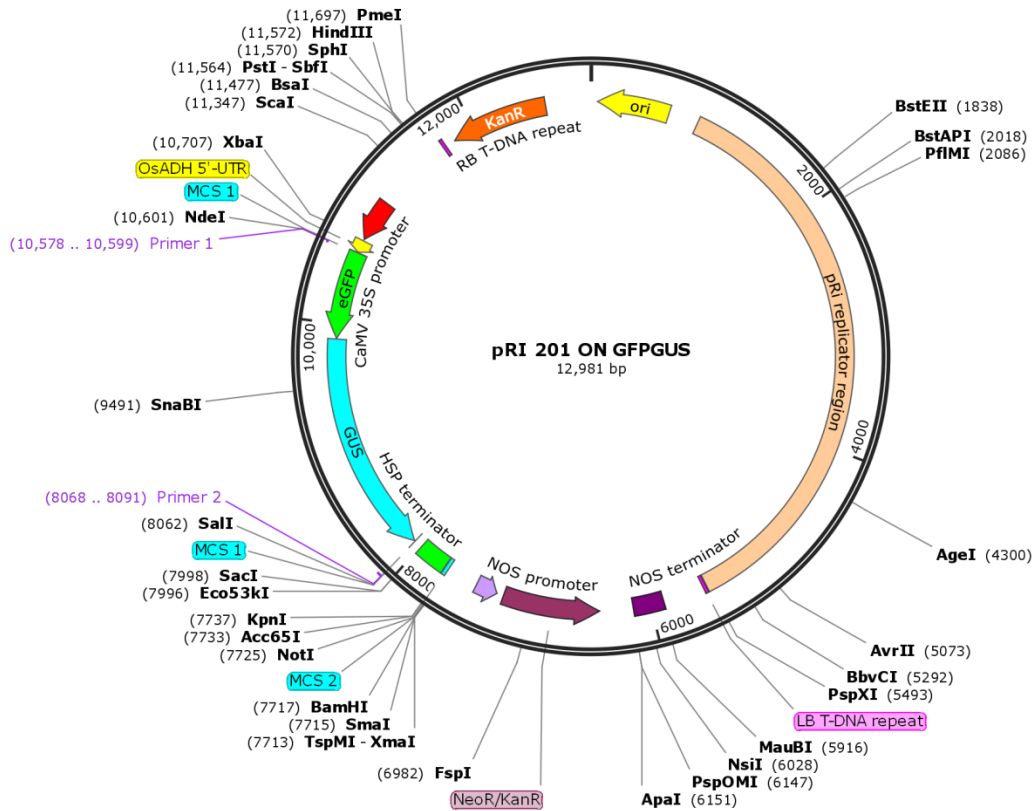
En la figura 16 se ilustran los distintos pasos del proceso de preparación de los vectores y su movilización a las cepas usadas de *A. tumefaciens*.



**Figura 16.** Metodología para obtención de cepas transformadas previo a ensayos de susceptibilidad y transformación.

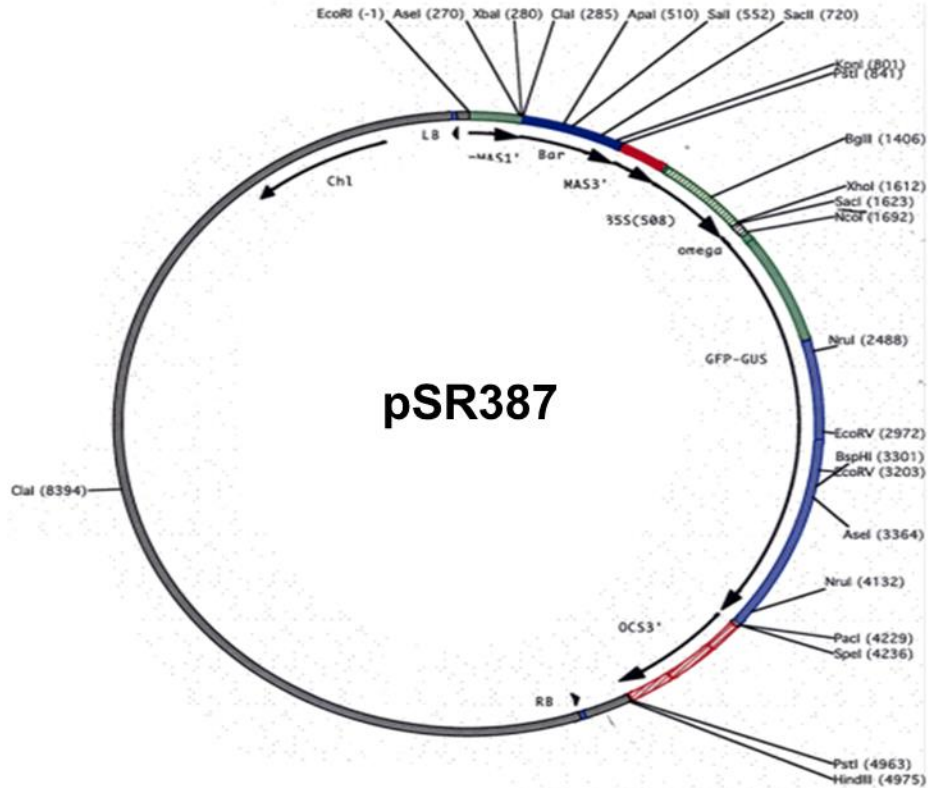
### 5. 3.1. Vectores de expresión y cepas de *Agrobacterium tumefaciens* usadas

- **Vector pRI201-ON\_eGFP/GUS:** En 2019, Loera-Quezada y García-Hernández modificaron el vector pRI201-ON (Takara©) con la inserción de un doble gen reportero eGFP-GUS mediante enzimas de restricción para ubicarlo bajo el control del promotor 35S CaMV y la región sin traducir 5´(5´-UTR) del gen codificante para alcohol deshidrogenas de arroz (Os-ADH) (figura 17, datos sin publicar), generando así el vector pRI201-ON\_eGFP/GUS. La secuencia de eGFP-GUS fue amplificada por PCR usando como molde el plásmido 35S GFP/GUS (figura 18) previamente reportado por Alatorre-Cobos et al 2012.



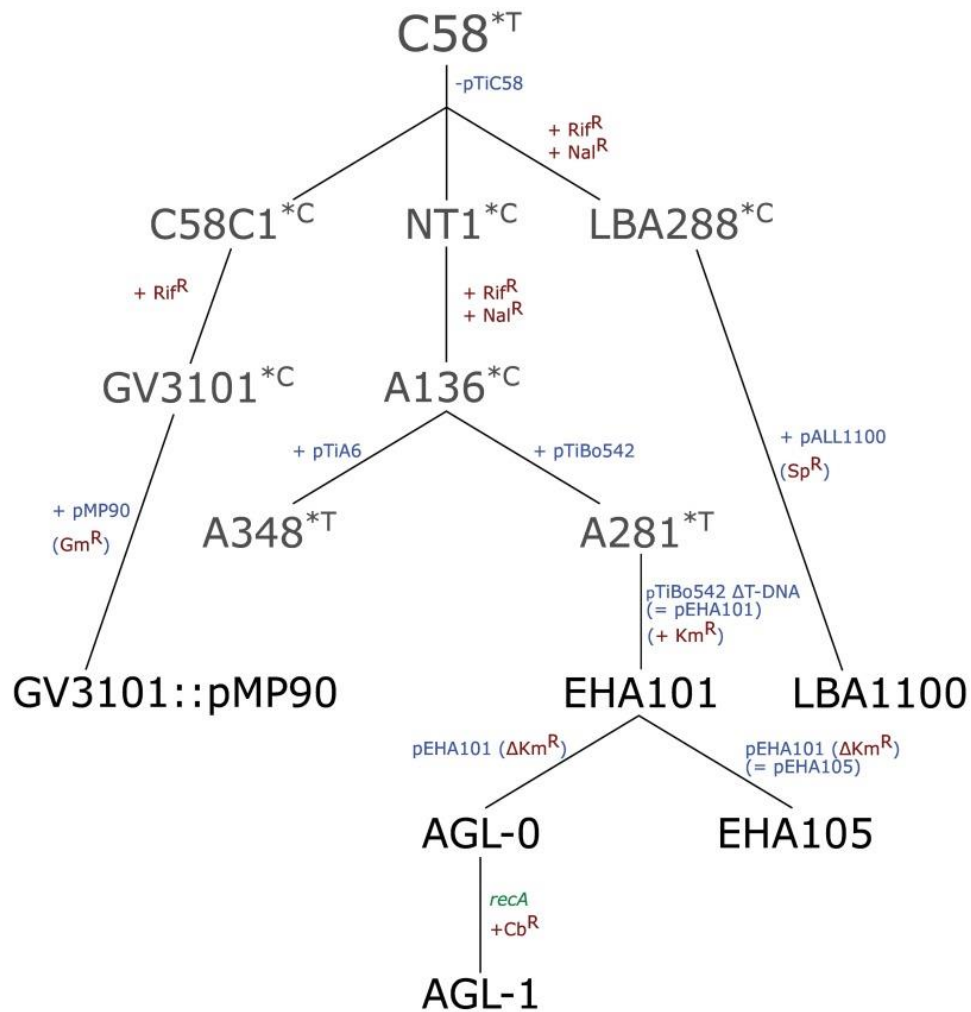
**Figura 17.** Vector pRI201-ON\_eGFP/GUS. Esta versión modificada del pRI201-ON contiene las secuencias eGFP-GUS insertada en el sitio de clonación múltiple 1 (MCS1) señalado en color azul claro.

- Vector pSR387: Este vector contiene a eGFP-GUS como un doble gen reportero bajo la regulación del promotor 35S CaMV. La alta expresión constitutiva para ambos genes reporteros ha sido previamente descrita en dicotiledóneas como *Arabidopsis* (Alatorre-Cobos et al., 2012) o monocotiledóneas como *Agave* (Gutiérrez-Aguilar et al., 2016), y lo hace por tanto un vector adecuado para evaluarse en *S. trifasciata* (figura 18).

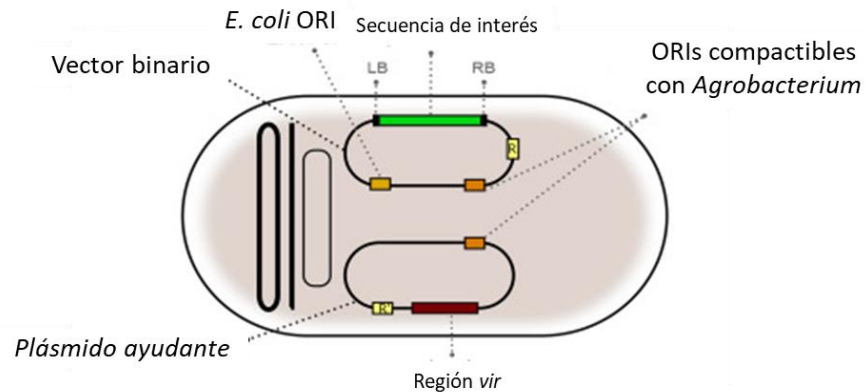


**Figura 18.** Vector pSR387 donador de la secuencia eGFP-GUS. Plásmido que contiene la secuencia correspondiente del gen *bar* que promueve resistencia a Bialaphos. (Mapa de plásmido otorgado por el Dr. Alatorre-Cobos).

- **Cepa C58C1:** *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 es una de las cepas derivadas del fondo cromosómico C58, esta cepa es resistente naturalmente al antibiótico Rifampicina (figura 19). Es una cepa curada de su plásmido original, incapaz de infectar células vegetales. Por lo que requiere de la reintroducción de un plásmido Ti modificado con una región de T-DNA eliminada para evitar la formación de tumores y, por lo general, también se divide en dos o más plásmidos diferentes para facilitar la clonación, es decir, el sistema de vector binario (figura 20).



**Figura 19.** Relación de cepas derivadas de *Agrobacterium tumefaciens* C58. Las resistencias cromosómicas a sus respectivos antibióticos están indicadas en rojo (tomada de: de Saeger et al., 2020). Rif, Rifampicina; Km, Kanamicina; Gm, Gentamicina; Nal, Ácido Nalidixico; Cb, Carbenicilina.



**Figura 20.** Organización de moléculas de DNA en cepa C58C1 de *Agrobacterium tumefaciens* con vector binario incluido (modificada de: de Saeger et al., 2020).

- **Cepa GV2260:** *Agrobacterium tumefaciens* GV2260 es una cepa poco ensayada en protocolos de transformación genética, esta comparte similitud con otras cepas más reconocidas como: EHA105, GV3101, LBA4404 y MP90 (Nonaka et al., 2019). Debido a que comparte el mismo cromosoma que la cepa original C58, es resistente al antibiótico Rifampicina, pero en menor dosis que la cepa C58C1 y al antibiótico Carbenicilina (Deblaere et al., 1985; Nonaka et al., 2019). A pesar de su poco empleo, es denominada como una cepa super virulenta y se ha reportado con éxito en especies como *Solanum lycopersicum* “Micro-Tom,” *Nicotiana benthamiana*, *Solanum chacoense* y en *Solanum tuberosum* L. (Aycan et al., 2021; Dönmez et al., 2019; Nonaka et al., 2019).

### **5. 3.2. Corroboración de construcciones y movilización de vectores de expresión en *Agrobacterium tumefaciens***

La identidad de los dos vectores pSR387 y pRI201-ON\_eGFP/GUS y de la presencia de las construcciones (GFP-GUS) en ellos, se corroboró mediante patrones de restricción simples y dobles; y por amplificación de fragmentos de la región codificante de genes reporteros presentes. Posteriormente los vectores se clonaron en células electrocompetentes de las dos cepas de *A. tumefaciens* (C58C1 y GV2260) mediante el método de electroporación. En la tabla 11 se resumen las transformaciones realizadas con la combinación de los dos vectores y ambas cepas.

**Tabla 11.** Transformaciones realizadas en *Agrobacterium tumefaciens*

Cepa	Construcción	Gen reportero	Gen de resistencia	Agentes de selección
	pSR387	<i>gfp/uidA</i>	<i>Bialaphos resistance (bar)</i>	Bialaphos, PPT, Glufosinato de amonio*
<b>C58C1</b>	pRI 201-ON_eGFP/GUS	<i>gfp/uidA</i>	<i>Aminoglycoside phosphotransferase (aph)</i>	Kanamicina*/Neomicina
	pSR387	<i>gfp/uidA</i>	<i>Bialaphos resistance (bar)</i>	Bialaphos, PPT, Glufosinato de amonio*
<b>GV2260</b>	pRI 201-ON_eGFP/GUS	<i>gfp/uidA</i>	<i>Aminoglycoside phosphotransferase (aph)</i>	Kanamicina*/Neomicina

\*Agente designado para ensayos de susceptibilidad

Para la electroporación se procedió de la siguiente forma: 50 ng de plásmido se mezclaron suavemente con una alícuota de 50  $\mu$ L de células electrocompetentes de *A. tumefaciens*, y se incubó en hielo durante 5 minutos. Luego se transfirió el volumen de la mezcla a una celda de electroporación (2mm, BIO-RAD©) colocada en hielo previamente. Los parámetros usados en el electroporador (BIO-RAD©) para cada transformación fueron: 25  $\mu$ F, 400  $\Omega$  y un pulso de 2.5 KV. Inmediatamente después de la transformación se agregaron 300  $\mu$ L de medio LB a la cubeta, y se transfirió la mezcla a un tubo Eppendorf™ estéril el cual se incubó durante 2 horas a 28°C y en agitación constante a 180 rpm.

La recuperación de transformantes se realizó plaqueando diferentes volúmenes del cultivo en placas de Petri con medio LB adicionado con antibióticos de acuerdo al plásmido utilizado (tabla 12). Las placas de Petri se incubaron a 28°C durante 24-48 horas; de las colonias obtenidas se seleccionaron 6 por cada transformación, las cuales se sembraron durante 24 horas.



**Tabla 12.** Medios específicos para transformaciones de *Agrobacterium tumefaciens*

Construcción	Medio de selección
C58C1_pSR387	LB + Cloramfenicol** 25 mg/L + Rifampicina* 100 mg/L
C58C1_pRI 201-ON_eGFP/GUS	LB + Kanamicina** 50 mg/L + Rifampicina* 100 mg/L
GV2260_pSR387	LB + Rifampicina* 50 mg/L + Carbenicilina* 100 mg/L + Cloramfenicol** 25 mg/L
GV2260_pRI 201-ON_eGFP/GUS	LB + Rifampicina* 50 mg/L + Carbenicilina* 100 mg/L + Kanamicina** 50 mg/L +

\*Antibiótico de selección determinado por cepa \*\*Antibiótico de selección determinado por plásmido

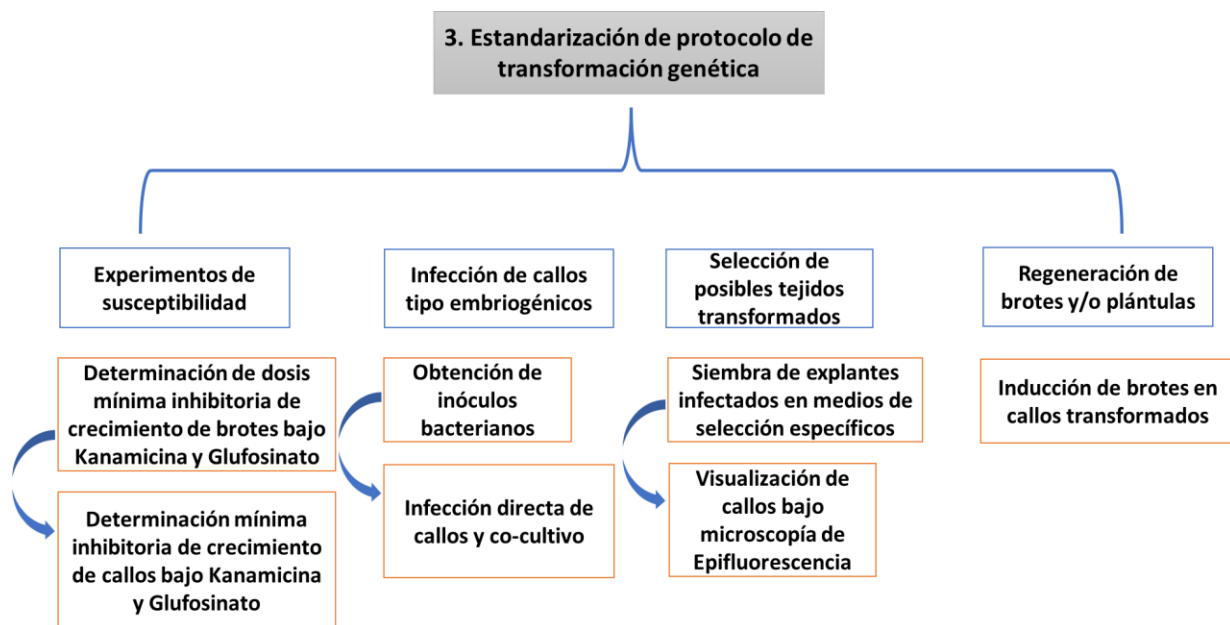
Finalmente se comprobó cada construcción mediante PCR en colonia usando oligonucleótidos específicos para los genes reporteros. La secuencia de los primers, temperaturas de alineamiento y tamaño de los fragmentos esperados se muestran en la tabla 13.

**Tabla 13.** Oligonucleótidos diseñados para amplificar fragmentos de *gfp*, *uidA* y *bar*

Gen	Nombre	Secuencia (5' - 3')	TM	Tamaño fragmento
<b>eGFP</b>	FW-GFP1	tacggcaagctgaccctgaagt	60.7°C	308 pb
	REV-GFP1	Agcttgtgccccaggatggtg	61.0°C	
<b>GUS</b>	FW-GUS	tgctgtcggctttaacctct	56.5°C	332 pb
	REV-GUS	Ggcacagcacatcaaagaga	55.5°C	
<b>Bar</b>	FW-BAR	acagcgaccacgctctgaag	59.9°C	312 pb
	REV-BAR	ctgcaccatcgtaaccactacat	59.2°C	

### 5. 4. Estandarización de condiciones de transformación genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

Una vez obtenidas y corroboradas las construcciones clonadas en *A. tumefaciens*, se procedió a estandarizar el protocolo de transformación genética de callos primarios de *S. trifasciata*. La estandarización del proceso incluyó experimentos de susceptibilidad, determinación de tiempos y condiciones de co-cultivo de *A. tumefaciens*-explantante y selección de los callos posiblemente transformados. El proceso de esta fase se ilustra en la figura 21.



**Figura 21.** Metodología para la estandarización del protocolo de transformación genética de *Sansevieria trifasciata* mediante *Agrobacterium tumefaciens*

#### 5. 4.1. Pruebas de susceptibilidad de *Sansevieria trifasciata* a glufosinato de amonio y kanamicina

Los ensayos de susceptibilidad de ambos cultivares de *S. trifasciata* incluyeron la exposición de callos y brotes a los agentes de selección: glufosinato de amonio, uno de origen comercial disponible como herbicida (FINALE®) y otro grado reactivo (Sigma-Aldrich®) y al antibiótico kanamicina (Phytotechnology laboratories®).

#### 5. 4.1.1 Susceptibilidad de brotes de *Sansevieria trifasciata* a herbicida FINALE® que contiene glufosinato de amonio

Se diseñó un experimento completo al azar para brotes con 2-3 cm de altura bajo concentraciones de 0 a 200 mg·L<sup>-1</sup> del herbicida comercial FINALE® (tabla 14). Los tratamientos consistieron en medios de cultivo MS basal (Phytotechnology laboratories®) adicionado con el glufosinato de amonio, sacarosa 3% (p / v), pH 5.8 y agar 6.5 g·L<sup>-1</sup>. Los brotes fueron posicionados de forma vertical y se monitorearon semanalmente durante 24 días.

**Tabla 14.** Diseño experimental de susceptibilidad de brotes de *S. trifasciata* al herbicida FINALE®

Tratamiento	Réplicas técnicas	Unidades experimentales*
0 mg·L <sup>-1</sup>	4	6
20 mg·L <sup>-1</sup>	4	6
40 mg·L <sup>-1</sup>	4	6
60 mg·L <sup>-1</sup>	4	6
80 mg·L <sup>-1</sup>	4	6
100 mg·L <sup>-1</sup>	4	6
150 mg·L <sup>-1</sup>	4	6
200 mg·L <sup>-1</sup>	4	6
Total:	32	192

\*Ambas variedades se sembraron en una misma placa Petri

#### 5. 4.1.2. Susceptibilidad de segmentos foliares de *S. trifasciata* al herbicida FINALE® que contiene glufosinato de amonio

Se diseñó un experimento completo al azar para segmentos foliares de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> de altura bajo concentraciones de 0 a 2.5 mg·L<sup>-1</sup> del herbicida comercial FINALE® (tabla 15). Los tratamientos consistieron en medios de cultivo MS basal (Phytotechnology laboratories®) adicionado con glufosinato de amonio, sacarosa 3% (p / v), pH 5.8 y agar 6.5 g·L<sup>-1</sup>. Los segmentos foliares se posicionaron de forma horizontal y se monitorearon semanalmente durante 24 días.

**Tabla 15.** Diseño experimental de susceptibilidad de láminas foliares de *S. trifasciata* al herbicida FINALE®

Tratamiento	Réplicas técnicas (placas)	Unidades experimentales
0 mg·L <sup>-1</sup>	4	6
0.5 mg·L <sup>-1</sup>	4	6
1.0 mg·L <sup>-1</sup>	4	6
1.5 mg·L <sup>-1</sup>	4	6
2.0 mg·L <sup>-1</sup>	4	6
2.5 mg·L <sup>-1</sup>	4	6
Total:	24	144

#### 5. 4.1.3. Susceptibilidad de brotes de *S. trifasciata* al herbicida glufosinato de amonio (Sigma-Aldrich®)

Se diseñó un experimento completo al azar para brotes de ambos cultivares de *S. trifasciata* de aproximadamente 3-5 cm de altura bajo concentraciones de 0 a 10 mg·L<sup>-1</sup> (tabla 16). Los tratamientos consistieron en medios de cultivo MS basal (Phytotechnology laboratories®) adicionado con glufosinato de amonio, sacarosa 3% (p / v), pH 5.8 y agar 6.5 g·L<sup>-1</sup>. Se monitorearon semanalmente durante 21 días.

**Tabla 16.** Diseño experimental susceptibilidad de brotes de *S. trifasciata* a glufosinato de amonio (Sigma-Aldrich®)

Tratamiento	Réplicas técnicas (placas)	Unidades experimentales por variedad	Brotes totales
0 mg·L <sup>-1</sup>	4	5	40
0.5 mg·L <sup>-1</sup>	4	5	40
1.0 mg·L <sup>-1</sup>	4	5	40
5.0 mg·L <sup>-1</sup>	4	5	40
10.0 mg·L <sup>-1</sup>	4	5	40
Total:	20	25	200

#### 5. 4.1.4. Susceptibilidad de callos primarios y organogénicos de *S. trifasciata* a glufosinato de amonio (Sigma-Aldrich®)

Se diseñó un experimento completo al azar para callos primarios de *S. trifasciata* de 6 semanas de inducción bajo concentraciones de 0 a 20 mg·L<sup>-1</sup> de glufosinato de amonio

grado reactivo (Sigma-Aldrich®) (tabla 17), al igual que para callos organogénicos de 10 semanas de edad (tabla 18). Los tratamientos consistieron en medios de cultivo MS (Phytotechnology laboratories®) basal adicionado con glufosinato de amonio, sacarosa 3% (p / v), pH 5.8 y agar 6.5 g·L<sup>-1</sup>. Se monitorearon semanalmente durante 21 días.

**Tabla 17.** Diseño experimental de susceptibilidad de callos primarios de *S. trifasciata* a glufosinato de amonio (Sigma-Aldrich®)

Tratamiento	Réplicas técnicas (placas)	Unidades experimentales por variedad	Callos totales
0 mg·L <sup>-1</sup>	4	8	64
1.0 mg·L <sup>-1</sup>	4	8	64
2.5 mg·L <sup>-1</sup>	4	8	64
5.0 mg·L <sup>-1</sup>	4	8	64
10.0 mg·L <sup>-1</sup>	4	8	64
20.0 mg·L <sup>-1</sup>	4	8	64
Total:	24	32	384

**Tabla 18.** Diseño experimental de susceptibilidad de callos organogénicos de *S. trifasciata* a glufosinato de amonio (Sigma-Aldrich®)

Tratamiento	Réplicas técnicas (placas)	Réplicas biológicas por variedad	Callos totales
0 mg·L <sup>-1</sup>	4	8	64
5.0 mg·L <sup>-1</sup>	4	8	64
10.0 mg·L <sup>-1</sup>	4	8	64
20.0 mg·L <sup>-1</sup>	4	8	64
Total:	16	32	256

#### 5. 4.1.5. Susceptibilidad de callos primarios de *Sansevieria trifasciata* a kanamicina (Phytotechnology laboratories®)

Se diseñaron dos experimentos completos al azar para callos primarios de *S. trifasciata* de 6 semanas de inducción bajo concentraciones de 0 a 200 mg·L<sup>-1</sup> (tabla 19) y bajo concentraciones de 0 a 600 mg·L<sup>-1</sup> (tabla 20). Los tratamientos consistieron en medios de cultivo MS (Phytotechnology laboratories®) basal adicionado con kanamicina, sacarosa 3% (p / v), pH 5.8 y agar 6.5 g·L<sup>-1</sup>. En el experimento 1 los callos fueron seccionados por la mitad (debido a la limitación de material), por lo que los callos

consistieron de 0.5 cm<sup>2</sup> aproximadamente; por su parte, en el experimento 2 se emplearon callos de 1 cm<sup>2</sup> aproximadamente. Se monitorearon durante 56 días.

**Tabla 19.** Diseño experimental 1 de susceptibilidad de callos primarios de *S. trifasciata* a kanamicina

Tratamiento	Réplicas técnicas	Unidades experimentales	Callos
0 mg·L <sup>-1</sup>	3	8	48
50 mg·L <sup>-1</sup>	3	8	48
100 mg·L <sup>-1</sup>	3	8	48
150 mg·L <sup>-1</sup>	3	8	48
200 mg·L <sup>-1</sup>	3	8	48
Total:	15	24	240

**Tabla 20.** Diseño experimental 2 de susceptibilidad de callos primarios de *S. trifasciata* a kanamicina

Tratamiento	Réplicas técnicas	Unidades experimentales	Callos
0 mg·L <sup>-1</sup>	3	8	48
200 mg·L <sup>-1</sup>	3	8	48
400 mg·L <sup>-1</sup>	3	8	48
600 mg·L <sup>-1</sup>	3	8	48
Total:	15	24	192

#### 5. 4.1.6. Evaluación de efectos en el desarrollo de callos primarios de *Sansevieria trifasciata* expuestos a glufosinato de amonio y kanamicina

Se realizó un experimento final de susceptibilidad de callos primarios tipo embriogénicos de *Sansevieria trifasciata* con dosis anteriormente contempladas de glufosinato de amonio y kanamicina, el diseño experimental se describe en la tabla 21. Posterior a ocho semanas de estrés en medio MS basal adicionado con los agentes de selección respectivos se determinó el efecto de cada uno de ellos, tomando como variables el contenido de clorofila y la ganancia de biomasa. Para estos cálculos se empleó el método de Welburn (1994) y similar a la fase de inducción de callos, se pesaron los callos previos a la siembra y después de ocho semanas de tratamiento.

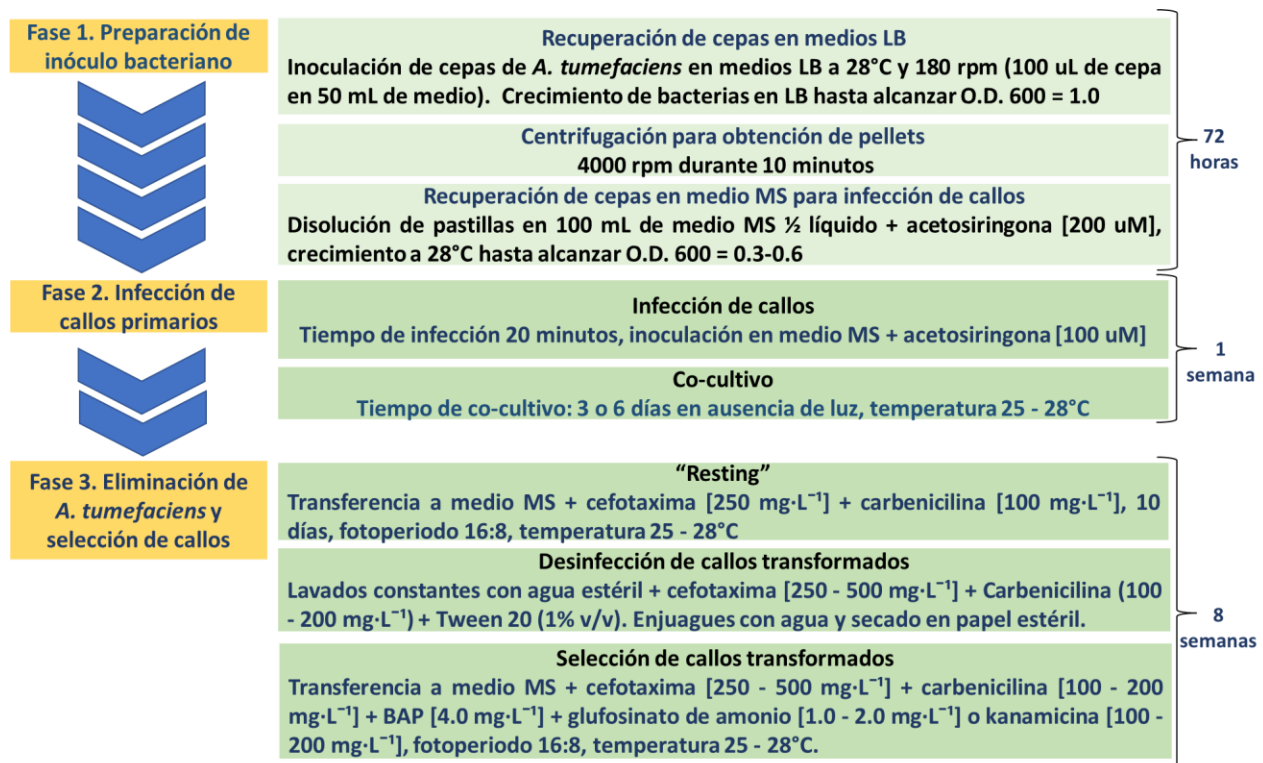
**Tabla 21.** Diseño experimental de susceptibilidad con dosis finales de agentes de selección para callos primarios de *Sansevieria trifasciata*

Agente de selección	Tratamiento	Réplicas técnicas	Unidades experimentales*	Callos**
	0 mg·L <sup>-1</sup>	4	8	32
Glufosinato	0.5 mg·L <sup>-1</sup>	4	8	32
Glufosinato	1.0 mg·L <sup>-1</sup>	4	8	32
Glufosinato	2.0 mg·L <sup>-1</sup>	4	8	32
Glufosinato	5.0 mg·L <sup>-1</sup>	4	8	32
Kanamicina	50 mg·L <sup>-1</sup>	4	8	32
Kanamicina	100 mg·L <sup>-1</sup>	4	8	32
Kanamicina	200 mg·L <sup>-1</sup>	4	8	32
Kanamicina	500 mg·L <sup>-1</sup>	4	8	32
	Total	36	72	288

\*Unidades experimentales por cada variedad en una misma placa de Petri \*\*Número de callos por cada variedad en un mismo tratamiento

### 5. 5. Ensayos de transformación genética de *Sansevieria trifasciata* mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

Los callos primarios de 6 semanas de edad de ambos cultivares de *S. trifasciata* fueron elegidos como explantes para inoculación con las cepas transformadas. El protocolo general de transformación genética se describe en la figura 22.



**Figura 22.** Fases experimentales de ensayos de transformación genética en callos tipo embriogénicos de *Sansevieria trifasciata*

Las cepas transformadas de *A. tumefaciens* mantenidas a -80°C se recuperaron en sus respectivos medios de cultivo líquidos, inoculando 100 µL de cepa en 50 mL de medio LB en matraces de 250 mL; se incubaron durante 12 - 16 horas a 28°C y 180 rpm. Una vez que las cepas crecieron, se midió su densidad óptica (O.D.) en un espectrofotómetro (Thermo Scientific™) para resembrar 200 µL de caldo bacteriano nuevo en 50 mL de medio LB. Después de crecerlas durante un aproximado de 16 horas se obtuvo su densidad óptica hasta que alcanzó una O.D.600=1.0.

El cultivo se centrifugó durante 10 minutos a 4000 rpm en tubos tipo Falcon, los pellets obtenidos se resuspendieron en medio MS basal suplementado con acetosiringona a una concentración final de 200 µM. Los inóculos se monitorearon constantemente, hasta que alcanzaron una O.D.600= 0.3 - 0.6. Los inóculos con la O.D. deseada se transfirieron a tubos tipo Falcon de 50 mL donde también se colocaron los callos tipo embriogénicos de 6 semanas de edad. Debido a que se usaron dos vectores clonados en dos diferentes



cepas, se realizaron dos diseños experimentales de infección, los cuales se muestran en las tablas 22 y 23.

**Tabla 22.** Diseño experimental de transformación genética de *Sansevieria trifasciata* usando cepas de *Agrobacterium tumefaciens* con vector pSR387

Tratamiento	Cepa-plásmido	Variedad de <i>Sansevieria trifasciata</i>	Tiempo de co-cultivo	Unidades experimentales*	Réplicas
1L	C58C1-pSR387	Lorentii	72 horas	10	3
2L	C58C1-pSR387	Lorentii	144 horas	10	3
3H	C58C1-pSR387	Hahnii	72 horas	10	3
4H	C58C1-pSR387	Hahnii	144 horas	10	3
5L	GV2260-pSR387	Lorentii	72 horas	10	3
6L	GV2260-pSR387	Lorentii	144 horas	10	3
7H	GV2260-pSR387	Hahnii	72 horas	10	3
8H	GV2260-pSR387	Hahnii	144 horas	10	3
9L	Testigo	Lorentii	72 horas	10	3
10H	Testigo	Hahnii	72 horas	10	3

\*Callos primarios

**Tabla 23.** Diseño experimental de transformación genética de *Sansevieria trifasciata* usando cepas de *Agrobacterium tumefaciens* con vector pRI201-ON\_eGFP/GUS

Tratamiento	Cepa-plásmido	Variedad de <i>Sansevieria trifasciata</i>	Tiempo de Co-cultivo	Unidades experimentales*	Réplicas
1L	C58C1-pRI 201 ON	Lorentii	72 horas	10	3
2L	C58C1-pRI 201 ON	Lorentii	144 horas	10	3
3H	C58C1-pRI 201 ON	Hahnii	72 horas	10	3
4H	C58C1-pRI 201 ON	Hahnii	144 horas	10	3
5L	GV2260-pRI 201 ON	Lorentii	72 horas	10	3
6L	GV2260-pRI 201 ON	Lorentii	144 horas	10	3
7H	GV2260-pRI 201 ON	Hahnii	72 horas	10	3
8H	GV2260-pRI 201 ON	Hahnii	144 horas	10	3
9L	Testigo	Lorentii	72 horas	10	3
10H	Testigo	Hahnii	72 horas	10	3

\*Callos primarios

Las infecciones detalladas en ambas tablas se llevaron a cabo bajo condiciones estériles. Los explantes una vez infectados durante 20 minutos con su cepa correspondiente, se secaron en papel estéril y se sembraron en medio MS libre de fitohormonas

(Phytotechnology laboratories®) suplementado con 100  $\mu$ M de acetosiringona, los cuales se cubrieron con papel filtro estéril, esto para evitar el contacto directo y colonización de las bacterias en el medio de cultivo. La fase de co-cultivo consistió en dejarlos bajo condiciones de oscuridad durante 3 o 6 días, según el tratamiento; posteriormente, los callos se sometieron a lavados abundantes con agua estéril y antibióticos, se secaron en papel estéril y resembraron en medio MS suplementado con antibióticos durante 10 días (fase de resting). Posteriormente se retiraron de los medios de cultivo, se lavaron con agua abundante estéril y antibióticos; para finalmente resembrarse en medio MS suplementado con los agentes de selección correspondientes (glufosinato de amonio o kanamicina).

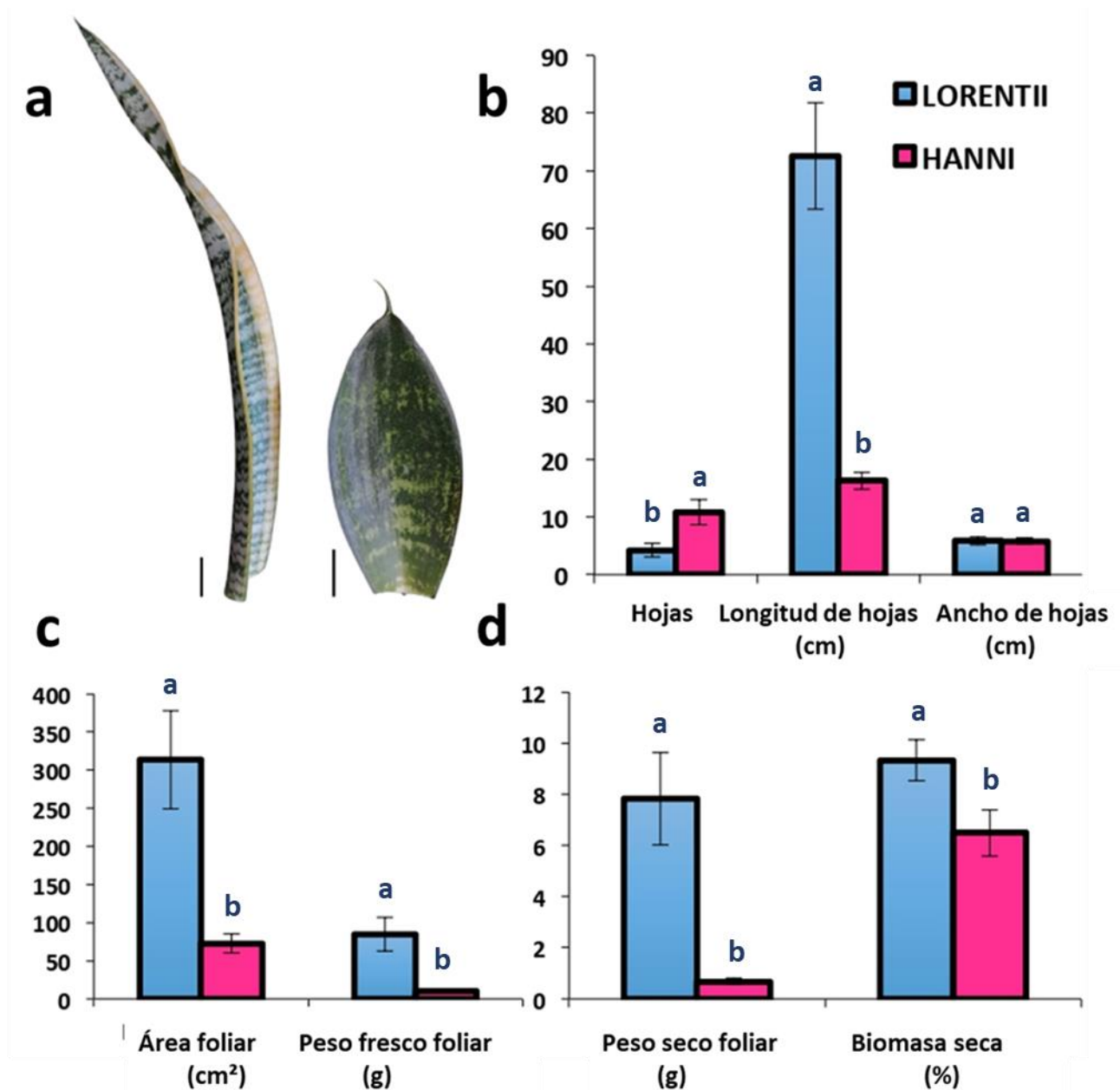
## VI. RESULTADOS Y DISCUSIONES

### 6. 1. Caracterización de plantas adultas de *Sansevieria trifasciata* cv. Hahnii y cv. Lorentii

A pesar de que los dos cultivares utilizados en este trabajo muestran diferencias morfológicas evidentes, no se ha reportado hasta ahora una caracterización detallada para ambos. Nuestros resultados muestran que el contraste entre los dos cultivares de *Sansevieria trifasciata* está dado principalmente por el tamaño y tonalidades de sus hojas, lo cual coincide con previas descripciones, ya que *S. trifasciata* cv. Lorentii ha sido reportado como un ejemplar que posee hojas elongadas verdes con márgenes bien marcados de tono amarillo claro, por otro lado *S. trifasciata* cv. Hahnii se ha descrito como una variedad que se originó a partir de Lorentii y que contiene hojas más pequeñas distribuidas en forma de roseta, de tonos verdes más oscuros y sin márgenes (Butler, 1997; Marcotrigiano & Morgan, 1998; Carlquist & Schneider, 2007).

La caracterización morfológica de plantas donadoras de explantes para el establecimiento *in vitro* incluyó la cuantificación de altura, ancho, área, así como peso fresco y seco de tejido foliar adulto (figura 23). Los datos recopilados en el Colegio de Postgraduados Campus Campeche arrojaron que una planta adulta del cultivar Lorentii tiene en promedio 4.18 hojas, mientras que el cultivar Hahnii alrededor de 10.96 hojas. En cuanto a longitud, el promedio de la hoja adulta más extendida de Lorentii fue de 72.55 cm, mientras que para Hahnii fue de 16.38 cm; lo cual es muy similar con lo señalado por Rêgo et al., (2020), y Gilman (1999), quienes reportaron para Lorentii una altura de hoja promedio de 80.27 cm y para Hahnii de 15.24 cm, respectivamente. El ancho de sus hojas es muy cercano en ambos, ya que en promedio tuvieron 5.8 cm aproximadamente (figura 23b). El área foliar es directamente proporcional a la longitud de la hoja, por lo que dado el evidente contraste entre ambos cultivares, la hoja más extendida de Lorentii alcanzó un área promedio de 313.77 cm<sup>2</sup> y en Hahnii un promedio de 73.29 cm<sup>2</sup>. El peso fresco de tejido foliar adulto también es contrastante, Lorentii alcanzó 84.56 g, mientras que Hahnii solamente 10.54 g (figura 23c). El porcentaje de biomasa seca en ambos cultivares fue menor al 10 %, Lorentii contiene 9.31 % y Hahnii 6.45 % en su hoja adulta más extendida; valores que coinciden con el 93.99 % de

contenido de humedad en hojas de *S. trifasciata* reportado por Widyasanti et al., (2020) (figura 23d).



**Figura 23.** Contraste morfológico entre cv. Lorentii y cv. Hahnii de *Sansevieria trifasciata*. a) hoja adulta de cv. Lorentii (izquierda) y hoja adulta de cv. Hahnii (derecha), b) altura y ancho de hojas, c) área y peso fresco foliar, d) porcentaje de biomasa seca foliar. Barras de error = D.E. Barra= 5 cm. Medias con letras diferentes son significativamente diferentes según la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

## 6. 2. Objetivo 1: Optimización de protocolo de cultivo *in vitro*

Se logró optimizar y determinar el rendimiento de un protocolo de organogénesis indirecta con ambos cultivares de *Sansevieria trifasciata*. El protocolo aquí propuesto, con cada una de sus fases y detalles técnicos se describe en la figura 24. Se evaluaron las cuatro fases en las que se divide el protocolo: inducción de callos primarios, inducción de callos organogénicos, proliferación de brotes y enraizamiento de plántulas. Todo el proceso toma alrededor de 20 semanas.



**Figura 24.** Protocolo optimizado de organogénesis indirecta de *Sansevieria trifasciata* cv. Hahnii y cv. Lorentii a partir de segmentos foliares. Fase 1: subcultivos cada 3 semanas, fase 2 y 3: subcultivos cada 2 semanas, fase 4: subcultivos cada 4 semanas.

### 6. 2.1. Inducción de callos

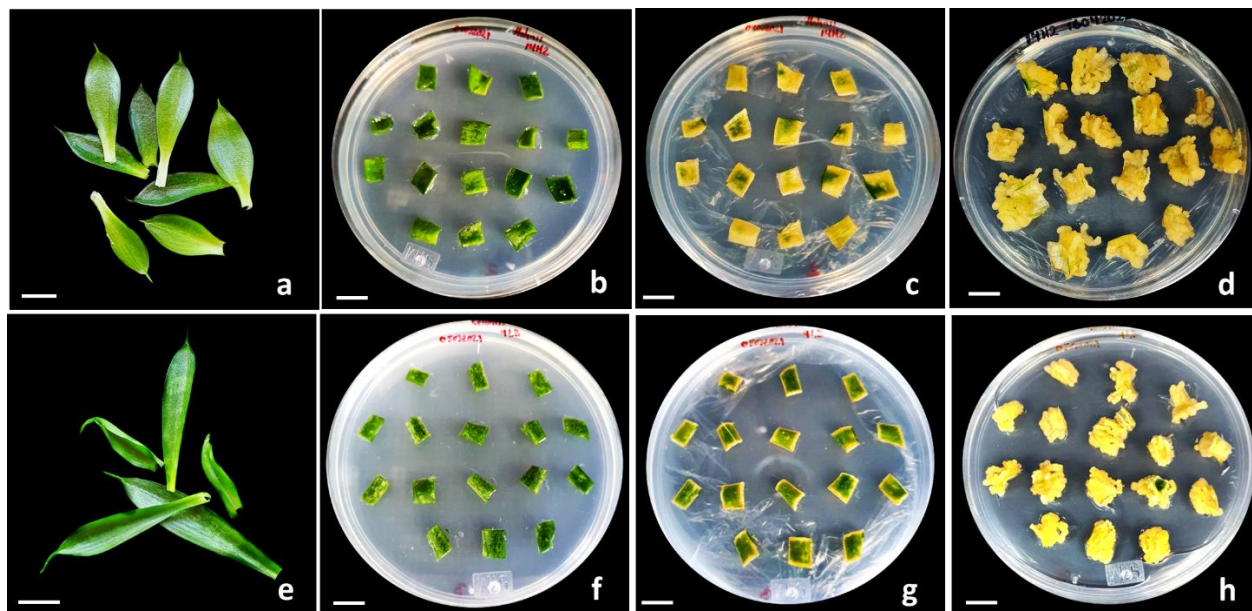
Los callos primarios lograron inducirse con alta eficiencia usando como explantes segmentos foliares de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> sometidos a un medio MS que contenía 2,4-D. A partir de los 14 días de tratamiento, la inducción de callos primarios provocó pérdida exponencial de clorofila, fenómeno observable sobre todo en el haz y en el envés de los segmentos foliares, así como el engrosamiento de las zonas donde se realizó el corte debido a la acelerada multiplicación celular; estos primeros indicios de dediferenciación notables a simple vista se presentaron por lo menos una semana antes de lo reportado por Hemarhashini & Serán (2017), o bien, sin la necesidad de transferir los explantes a un segundo medio de cultivo MS en ausencia de hormonas como lo describieron Blazich & Novitzky (1984), Sarmast et al., (2009), Wahyuningsih et al., (2013), y Yusnita et al., (2011). A las cuatro semanas de cultivo se observó una drástica

disminución en el contenido de clorofila, así como un tono amarillento-cremoso y fragilidad en los callos inducidos, características ampliamente utilizadas para referirse a callos tipo embriogénicos (Chege et al., 2020; Maulidiya et al., 2020; Wu et al., 2021). Finalmente, los callos primarios completamente desarrollados fueron visibles a los 42 días de tratamiento, donde el haz y envés de los explantes originales se secan y se desprenden de las masas de células indiferenciadas (figura 25). La respuesta de dediferenciación celular fue más rápida en el cultivar Hahnii (figura 25c), debido a que los segmentos foliares del cultivar Lorentii presentaron mayor contenido de clorofila a las dos semanas de inducción (figura 25g).

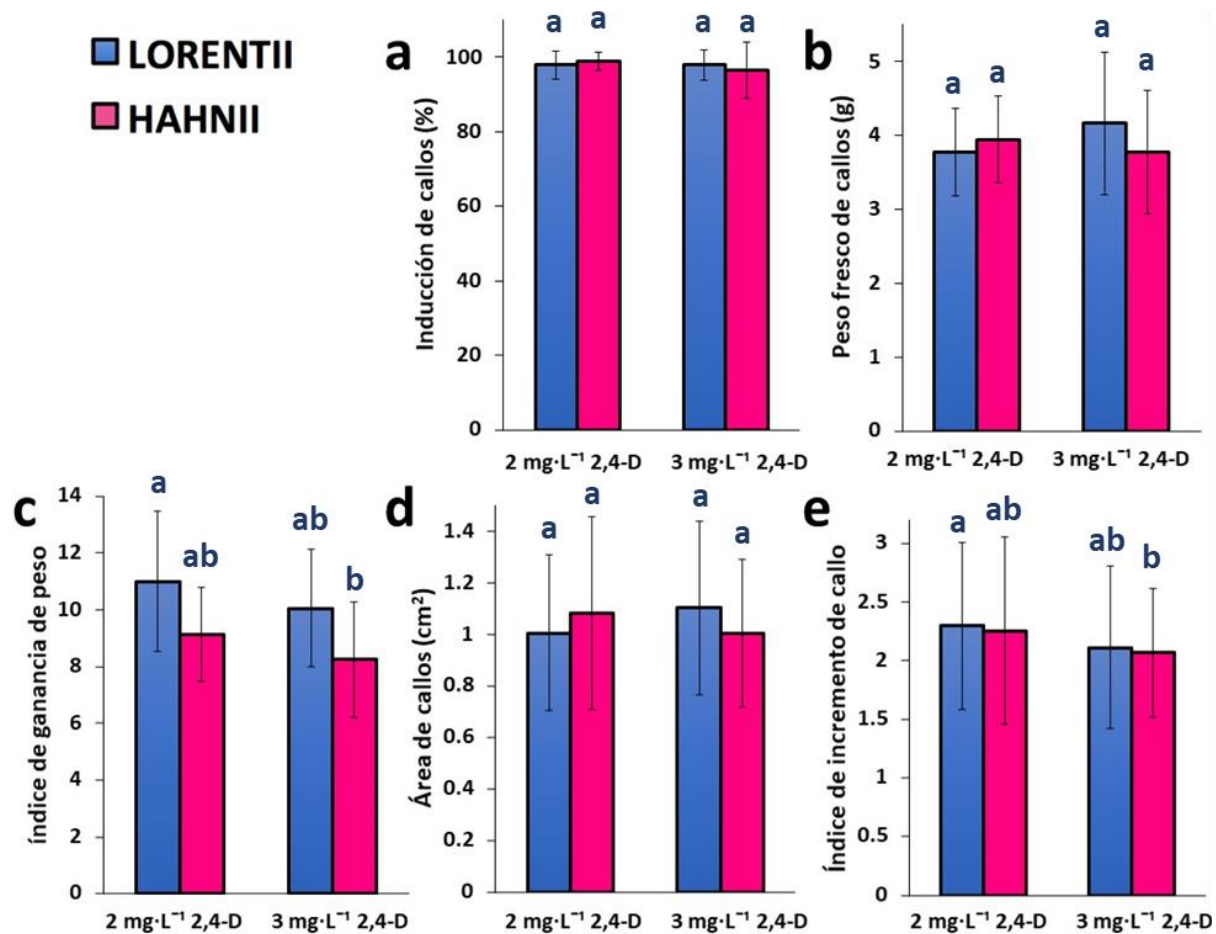
Para cuantificar las diferencias arriba mencionadas durante esta primera fase del protocolo de micropropagación, se evaluó el porcentaje de inducción, algunas características de los callos (área y peso) y el rendimiento obtenido bajo dos diferentes dosis de la hormona 2,4-D (figura 26). Después de los 42 días de tratamiento, el porcentaje de inducción fue mayor al 90 % en ambas variedades en cualquiera de las dos dosis probadas (figura 26a). El rendimiento fue expresado como la cantidad de gramos de callos primarios producidos por cada gramo de tejido foliar inicial. Los datos arrojaron que bajo la dosis de  $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de 2,4-D ambas variedades respondieron mejor que en  $3.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , comportamiento que coincide con algunos reportes en otras especies monocotiledóneas, como agave (*Agave spp.*), caña de azúcar (*Saccharum officinarum*), coco (*Cocos nucifera*), sorgo (*Sorghum spp.*) y desho (*Pennisetum pedicellatum*), donde a dosis muy elevadas de 2,4-D el porcentaje y el rendimiento de inducción disminuye considerablemente (Chávez-Ortiz et al., 2021; Maulidiya et al., 2020; Maulida et al., 2020; Bath et al., 2021; Omer et al., 2021).

Obtener la mayor cantidad posible de biomasa es un objetivo de suma importancia en un protocolo optimizado de micropropagación por lo que con el propósito de obtener un índice de rendimiento y crecimiento, los callos primarios fueron pesados en el nivel máximo de indiferenciación. A las semanas de tratamiento los callos primarios de ambos cultivares en ambas dosis tuvieron un peso fresco cercano de 4 gramos (figura 26b), lo que representaría nula diferencia entre tratamientos y cultivares; sin embargo los ensayos aquí realizados analizados bajo nuestro índice de ganancia de peso fresco

destacan a Lorentii como el cultivar con la mejor tasa de desdiferenciación celular, ya que bajo la dosis más efectiva alcanzó un promedio de 11.0033 g callo/g tejido foliar, mientras que Hahnii un promedio de 9.1327 g callo/g tejido foliar, diferencia entre ambas equivalente a casi un 20 % (figura 26c). Por otro lado, el área de callos obtenido fue de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> para ambos cultivares en ambas dosis (figura 26d), lo que representa en el índice de incremento de callo, una expansión duplicada del espacio que ocupa un callo con respecto a su explante original (figura 26e). Estos cálculos de rendimiento y crecimiento de callos no se han realizado con anterioridad en *S. trifasciata*, de hecho, se ha empleado en pocas especies vegetales, ejemplo de ellas son *Zingiber officinale* donde se han obtenido hasta 3.89 g/explante de tejido foliar después de 30 días en medio MS con 2.0 mg·L<sup>-1</sup> de 2,4-D y 1.0 mg·L<sup>-1</sup> de BAP (Abd El-Hameid et al., 2020), *Echinacea purpurea* en la que bajo dosis de 1.0 mg·L<sup>-1</sup> de ANA y 1.0 mg·L<sup>-1</sup> de BAP obtuvieron 0.507 g/explante de tejido foliar después de cuatro semanas de tratamiento (Erkonyuncu et al., 2021), o *Haycinthus orientalis* con la cual se obtuvieron 0.9 g callo/explante proveniente de tejido foliar posterior a las 6 semanas de tratamiento en presencia de 2.0 mg·L<sup>-1</sup> de BAP y 1.0 mg·L<sup>-1</sup> de Kinetina (Gheisari & Miri, 2017).



**Figura 25.** Inducción de callos primarios en *Sansevieria trifasciata* en medio MS suplementado con 2,4-D. a-d) cv. Hahnii, e-h) cv. Lorentii; a,e) hojas de plántulas, b,f) segmentos foliares de 0.5-1.0 cm<sup>2</sup> en medio MS + 2, 4-D, c,g) inicio de desdiferenciación celular a los 14 días, d,h) callo tipo embriogénico obtenido a los 42 días. Barra= 1 cm.



**Figura 26.** Rendimiento de inducción de callos primarios en protocolo de organogénesis indirecta en *Sansevieria trifasciata*. a) porcentaje de inducción de callos, b) biomasa fresca de callos, c) índice de ganancia de peso de callos, d) área de callos, e) índice de incremento de callos. Índice de ganancia de peso= peso fresco de callos/peso fresco de explantes iniciales. Índice de incremento de callos= área final de callo/área inicial de explante. Barras de error= D.E. Medias con letras diferentes son significativamente diferentes según la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

### 6. 2.1.1. Cambios anatómicos durante la dediferenciación celular en tejido foliar de *Sansevieria trifasciata*

Las hojas de ambos cultivares de *S. trifasciata* no solo se distinguen por sus tonalidades, sino que también por su grosor, longitud y resistencia, por lo que con la finalidad de observar diferencias anatómicas en la disposición de fibras se analizaron cortes



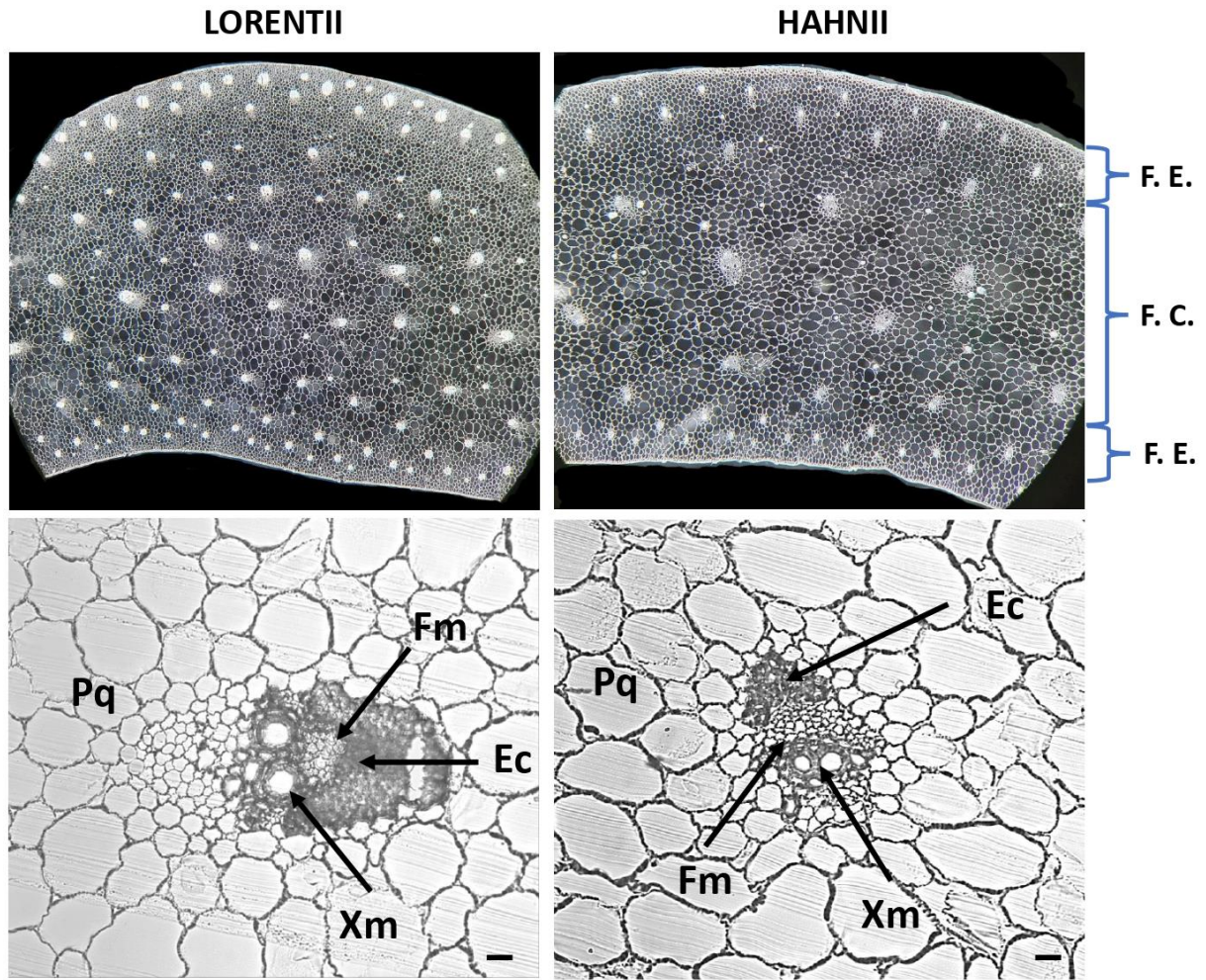
histológicos de segmentos foliares de plantas adultas. Los cortes transversales permitieron observar el arreglo de las fibras y los patrones de distribución a través del mesófilo foliar. Se identificaron dos tipos de fibras en ambos cultivares. Las fibras estructurales se identificaron como células de esclerénquima con paredes celulares secundarias engrosadas que forman haces de fibras poliédricas distribuidas en filas periféricas en los lados abaxial y adaxial de las hojas. En el cultivar *Lorentii* las fibras estructurales se encuentran en haces compuestos por hasta 150 células. En cambio, en *Hahnii* este tipo de haces de fibras está integrado por pocas células, especialmente en el lado abaxial de la hoja (hasta 29 células). Las fibras de cinta se encontraron dispersas en la parte media del tejido de la hoja de *S. trifasciata*, que tiene un patrón de vascularización bidimensional como se describe para las suculentas (Melo-de-Pinna et al., 2016) (Figura 27). Las fibras de cinta de *S. trifasciata* se convierten en una estructura que rodea a los haces vasculares; en *Lorentii* son de hasta 93 células mientras que en *Hahnii* están integrados por hasta 25. En ambos casos, las fibras en cinta son fibras esclerenquimatosas perivasculares que protegen al floema, pero nunca cerca del haz vascular.

La morfología de las fibras estructurales y de cinta descritas aquí para *S. trifasciata* es consistente con lo reportado para *S. cylindrica* (Sreenivasan et al., 2011). Las variaciones encontradas en la morfología de las fibras estructurales en los dos cultivares analizados pueden estar asociadas a desarrollos diferenciales del parénquima que derivan en hojas unifaciales o bifaciales, lo cual se ha observado previamente en especies de Asparagales, incluyendo *Sansevieria* spp. (Kaplan et al., 1975; Solano et al., 2013).

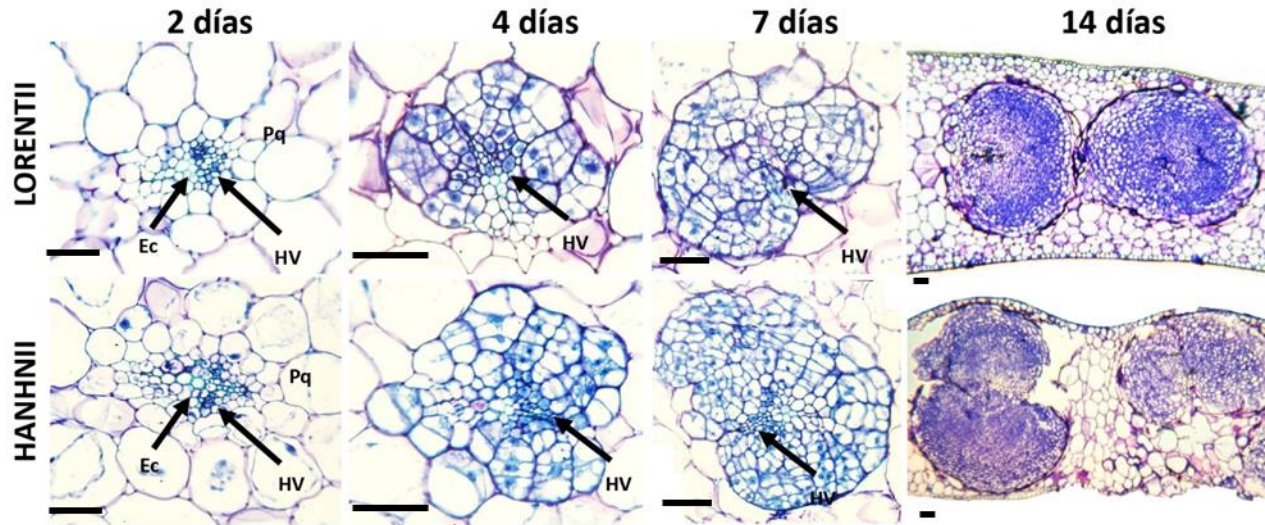
A pesar de que la mayor parte del contenido de pigmentos fotosintéticos se perdió y de que la tasa alta de multiplicación y desdiferenciación celular ya eran visibles en los cortes de los explantes después de 14 días de inducción de callos, incluso una semana antes de lo informado previamente para *S. trifasciata* (Hematharshini & Seran, 2017), se llevó a cabo un análisis histológico de evolución temporal a los 2, 4, 7 y 14 días de tratamiento en medio suplementado con  $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  de 2,4-D. Este análisis histológico reveló una respuesta muy temprana en las células de *S. trifasciata* a la desdiferenciación en

condiciones de cultivo *in vitro*. A los cuatro días, las secciones transversales de los explantes de hojas iniciales mostraron grupos celulares perfectamente definidos, conformados por un alto número de células mitóticas, dispersos en el tejido del mesófilo, y se encontraron exclusivamente alrededor de los haces vasculares y en las capas de fibras centrales. Estas estructuras se desarrollaron más rápido en el cultivar Hahnii en comparación con el cultivar Lorentii, sin embargo, a los 14 días, los grupos de células en ambos cultivares han aumentado su volumen y están cerca de romper la epidermis de la hoja (Figura 28), lo que respalda nuestras observaciones previas sobre la distinción de callos ubicados en los bordes de los segmentos de la hoja.

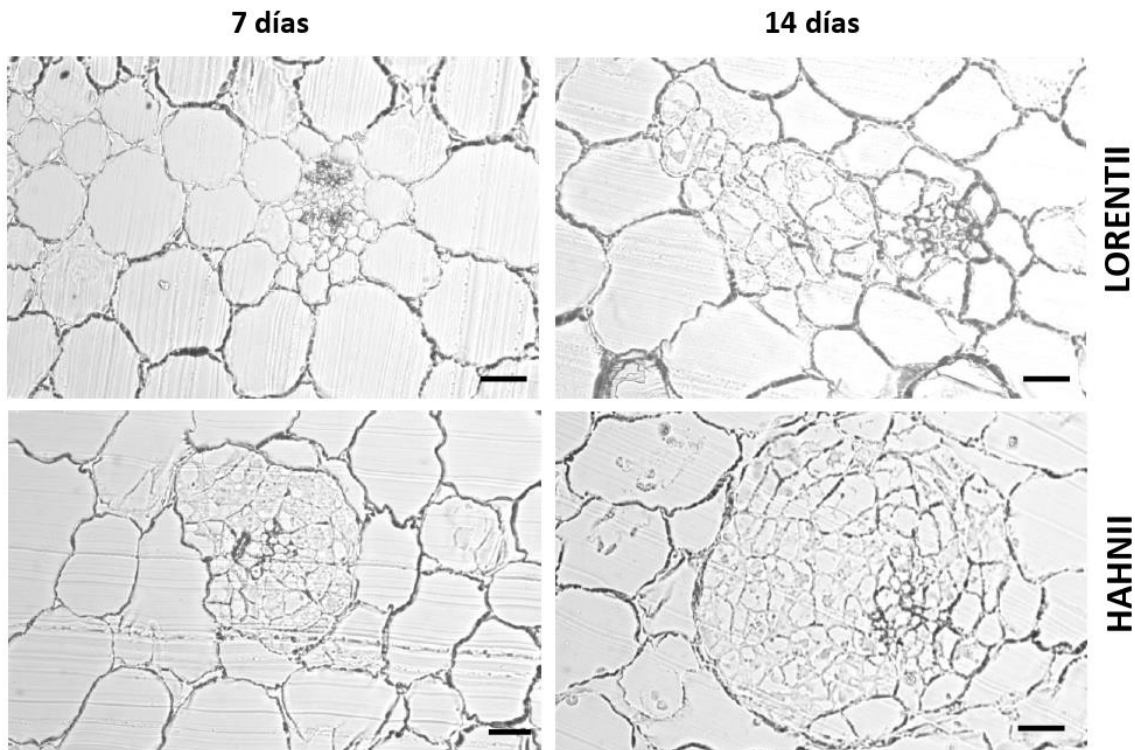
En el último estadio muestreado, también se encontraron grupos de células alrededor de las fibras estructurales en ambos cultivares (figura 29). En cultivo *in vitro*, los callos derivados de hojas se han descrito con una ontogénesis diferente, la cual depende fundamentalmente de la especie. Por ejemplo, en la monocotiledónea leñosa *Phoenix dactylifera*, los callos se forman a partir de células del parénquima fascicular o bien de las células de la vaina perivascular (PSC) según el grado de diferenciación del explante foliar utilizado (Gueye et al., 2009). Por su parte, en *Coffea arabica*, la masa y el callo proembriogénico se origina a partir de células mitóticamente activas que se encuentran cerca de los haces vasculares (Ferrari et al., 2021). De manera muy similar a lo reportado en café, en nuestro estudio, los callos de las hojas ambos cultivares de *S. trifasciata* parecen derivar de PSC o de células totipotentes que rodean las fibras (esclerénquima) exclusivamente. Las PSC pueden considerarse células similares a periciclos, que se cree que sirven como células madre pluripotentes para la iniciación de callos (Xu & Huang, 2014, Shin et al., 2020). En el caso de los callos formados alrededor de las fibras estructurales de *S. trifasciata*, es posible que pueden derivar de células reminiscentes del meristemo, que se sabe que dan lugar a tales fibras extraxilares (Evert, 2006).



**Figura 27.** Cortes histológicos transversales de fibras de *Sansevieria trifasciata* cv. Lorentii (izquierda) cv. Hahnii (derecha). F.E.= fibras estructurales, F.C.= Fibras de cinta, Pq= parénquima, Fm= floema, Xm= xilema, Ec= esclerénquima, barra= 20  $\mu$ m.



**Figura 28.** Cortes histológicos de callos inducidos en zona central (fibras de cinta) en segmentos foliares de *Sansevieria trifasciata*. Callos teñidos con una solución 1:1 de azul de metileno al 1 % y azul B al 1 %. Ec= Esclerenquima, Pq= parénquima, HV= haces vasculares. Barra= 100  $\mu$ m



**Figura 29.** Cortes histológicos de callos inducidos en zonas periféricas (fibras estructurales) en segmentos foliares de *Sansevieria trifasciata*. 7 días de tratamiento (izquierda), 14 días de tratamiento (derecha). Barra= 20  $\mu$ m.

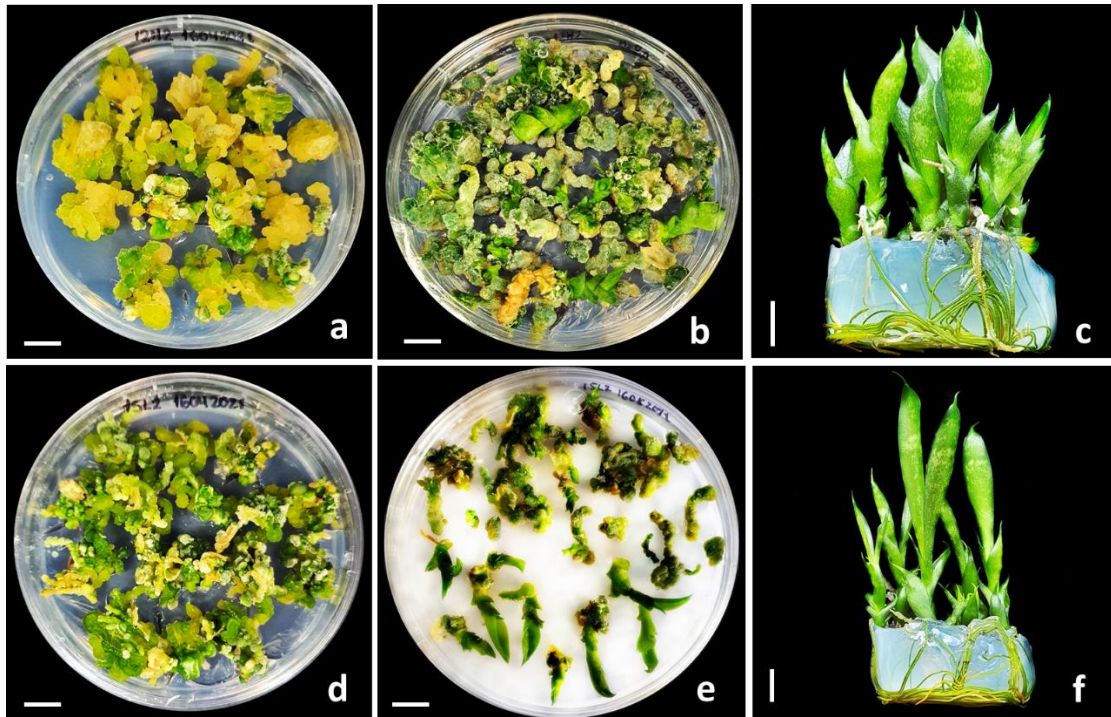
## 6. 2.2. Inducción de callos organogénicos y producción de brotes de novo

Los callos primarios inducidos fueron transferidos a un medio MS suplementado con 4.0 mg·L<sup>-1</sup> de BAP para promover su conversión a callos organogénicos y posteriormente, para la inducción y proliferación de brotes. La transformación a callos organogénicos, caracterizado por la adquisición de clorofila en los callos primarios se presentó tras las primeras cuatro semanas de cultivo en este nuevo tratamiento; mientras que los brotes emergieron a partir de la semana número 8 en ambos cultivares (figura 30a,d). Los brotes alcanzaron un alto nivel de desarrollo después de 12 semanas en este medio de cultivo, es decir, ocho semanas posterior a la obtención de los callos organogénicos (figura 30b,e). Una vez que los brotes de ambos cultivares alcanzaron una longitud mayor a 2.0 cm fueron transferidos a medio MS basal con la finalidad de promover el desarrollo de raíces y, por ende, obtener plántulas completas (figura 30c,f).

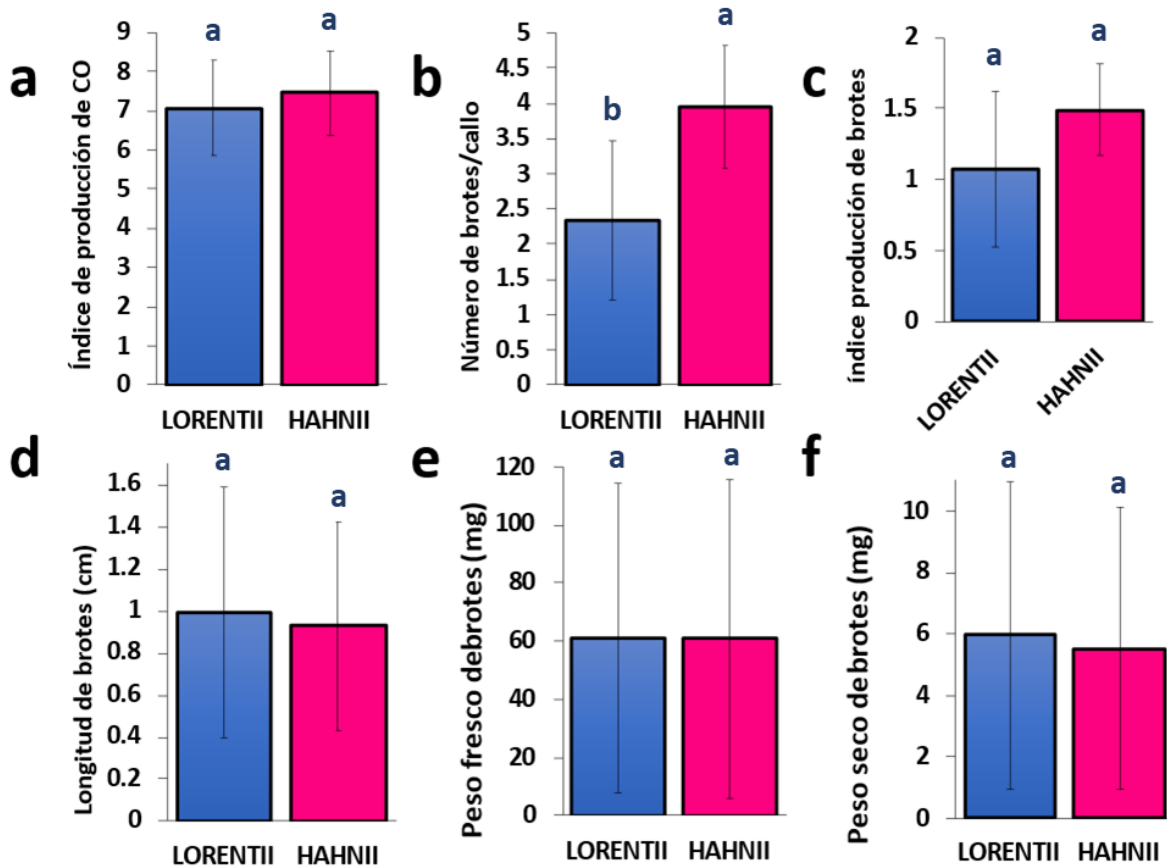
Con la finalidad de cuantificar el rendimiento de callos organogénicos, se determinó su peso fresco y se normalizó contra el peso fresco inicial de los callos primarios. Los resultados arrojaron una diferencia mínima en rendimiento de biomasa organogénica, pues ambos cultivares produjeron aproximadamente 7.5 g de callo organogénico/g de callo primario inicial (figura 31a). Contradictoriamente a esto, si existió una diferencia importante en la tasa de proliferación de brotes entre cultivares. El rendimiento final de micropropagación de *S. trifasciata* mediado por organogénesis indirecta se expresó normalizando el número de brotes obtenidos por gramo de callo organogénico y por el número de callos. Considerando la cantidad de brotes por explante, Hahnii produjo en promedio 3.9541 brotes/callos y Lorentii 2.3361 brotes/callos después de 12 semanas de tratamiento (figura 31b). El promedio de brotes generado por Hahnii fue de 1.4921 brotes/g callos, mientras que para Lorentii fue de 1.0695 brotes/g callos (figura 31c). Nuestros resultados revelaron una alta tasa de micropropagación de *S. trifasciata* similar a la reportada por Hemarhashini & Seran en 2017, quienes obtuvieron hasta 3 brotes por explante de tejido foliar después de 16 semanas de cultivo. En este trabajo se evidencia a Hahnii como el cultivar que mejor responde a nivel *in vitro*, hecho contradictorio a lo reportado por Yusnita et al., (2011), quienes observaron una mayor tasa de multiplicación en el cultivar Lorentii.

A diferencia de Hematharshini & Seran (2017) y Simbolon (2017) quienes además de usar BAP adicionaron una dosis baja de ANA en el medio de cultivo para esta fase del protocolo, nuestra tasa de proliferación de brotes se logró limitándonos al uso exclusivo de la citoquinina, aunque a una dosis más elevada, con lo que hemos demostrado al igual que Sarmast et al., (2009), Yusnita et al., (2011) y Wahyuningsih et al., (2013) que la auxina solamente es necesaria para la inducción de los callos tipo embriogénicos.

Finalmente se realizó una caracterización de los brotes comparando los datos correspondientes a la longitud, peso fresco y seco de estos. En tales parámetros evaluados existió nula diferencia entre variedades, la longitud promedio de brotes fue de 1.0 cm (figura 31d), en promedio los brotes alcanzaron un peso fresco de 60 mg (figura 31e) y la biomasa seca fue de aproximadamente 10 % (figura 31f), muy similar al obtenido en la caracterización de plantas madre mencionado anteriormente. Debido a que Lorentii naturalmente es un cultivar más alto que Hahnii, este comportamiento indiferenciado entre brotes se presentó solamente durante el tiempo que permanecieron en presencia de BAP, ya que cuando se indujo el enraizamiento y se obtuvieron plántulas, alcanzaron un desarrollo mucho más elongado y, por ende, se pueden apreciar diferencias morfológicas evidentes en sus hojas (figura 32 y 33).

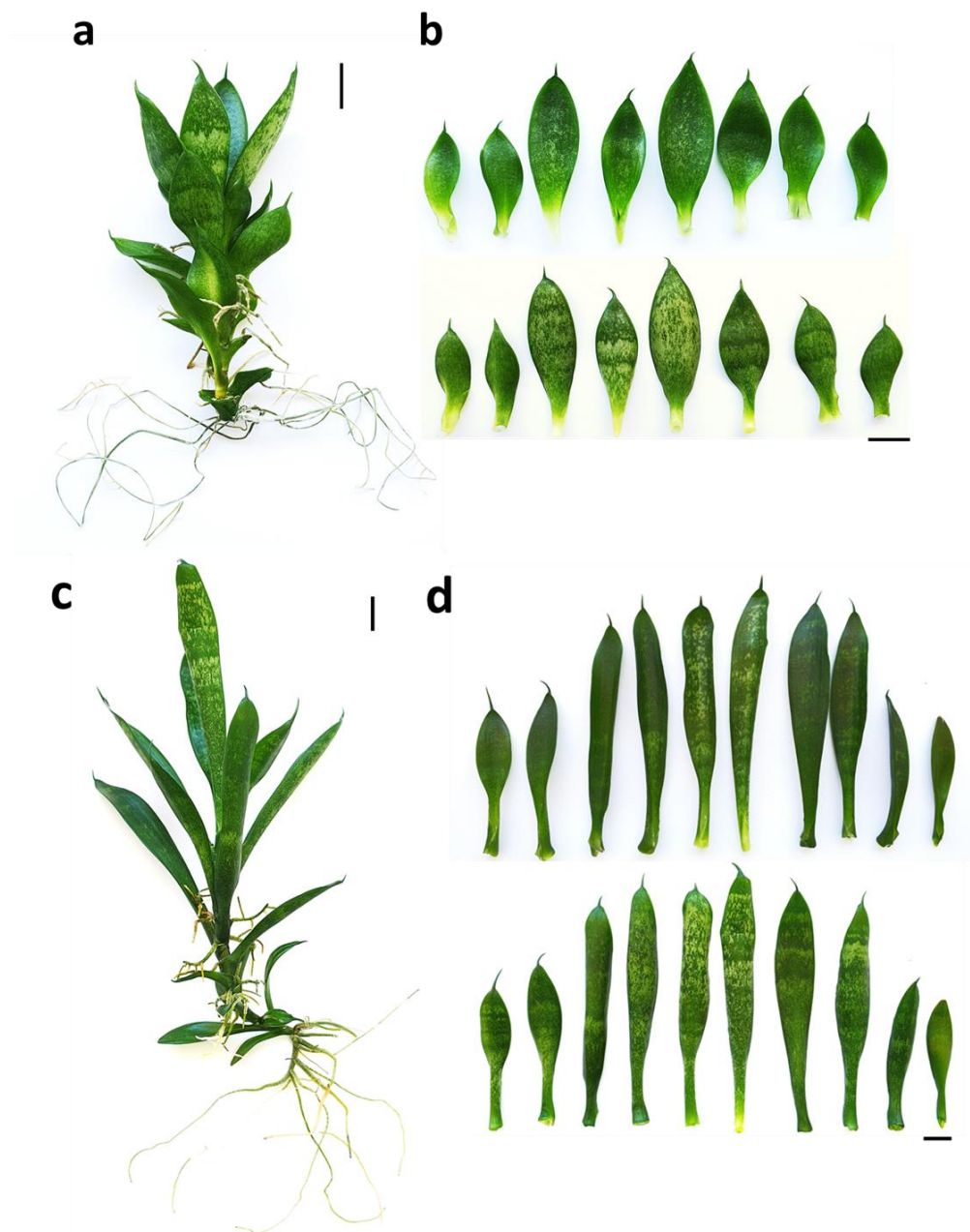


**Figura 30.** Obtención de plántulas a partir de callos organogénicos de *Sansevieria trifasciata*. a-c) cv. Hahnii, d-f) cv. Lorentii; a,d) callos organogénicos proliferando microbrotes (8 semanas en medio con BAP), b,e) brotes desarrollados después de 12 semanas en medio con BAP, c,f) plántulas completamente desarrolladas después de transferirse a medio MS basal. Barra= 1 cm.



**Figura 31.** Rendimiento organogénico de dos cultivares de *Sansevieria trifasciata*. a) índice de producción de CO en gramos durante inducción de callos organogénicos, b) número de brotes obtenidos por callo organogénico, c) índice de producción de brotes, d) longitud promedio de brotes, e) peso fresco promedio de brotes, f) peso seco promedio de brotes. Índice de producción de CO= gramos de CO/gramo de CP. Índice de producción de brotes= número de brotes/gramo de callo. CO= callos organogénicos, CP= callos primarios. Barras de error= D.E. Medias con letras diferentes son significativamente diferentes según la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).





**Figura 32.** Diferencias morfológicas en plántulas de *Sansevieria trifasciata*. a-b) cv. Hahnii, c-d) cv. Lorentii, a,c) plántula, b,d) hojas. Barra= 1 cm



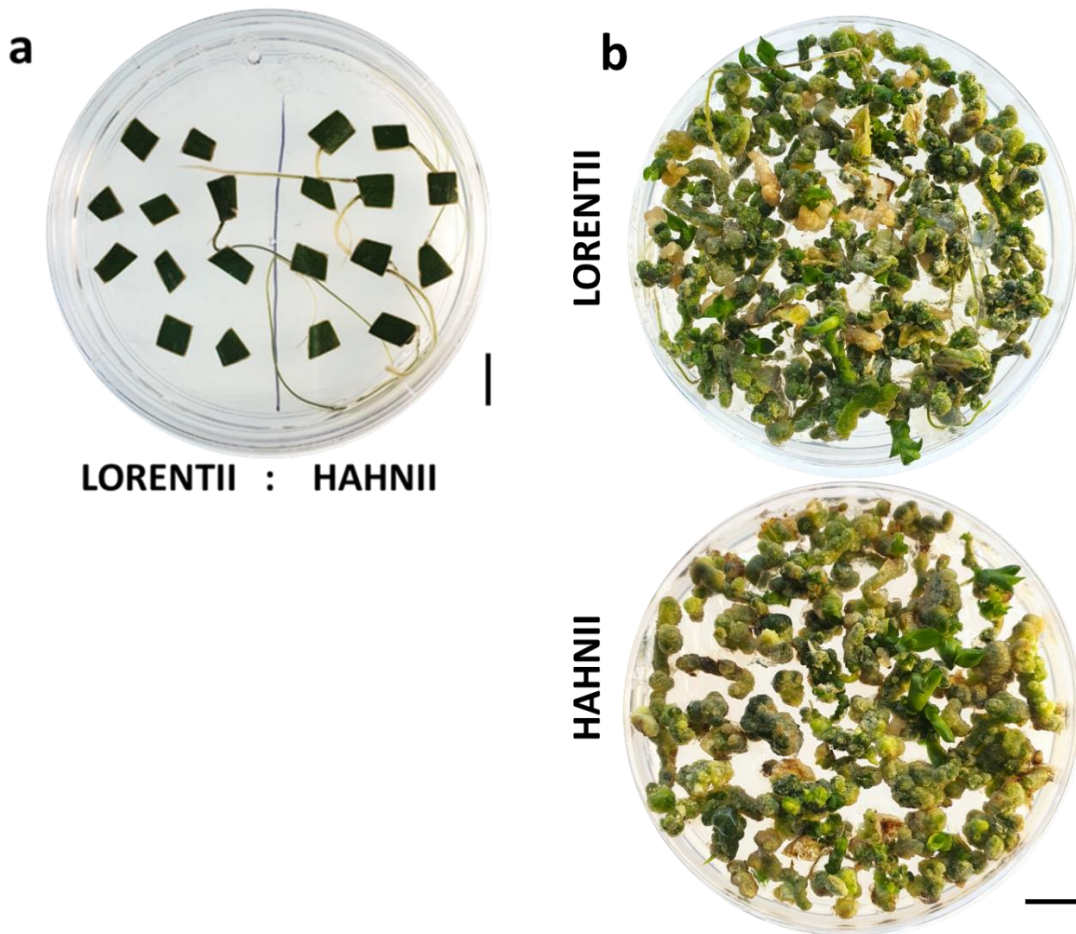
**Figura 33.** Anatomía y desarrollo de plántulas de *Sansevieria trifasciata* en distintos estadios-subcultivos en medio MS libre de hormonas. a) cultivar Lorentii, b) cultivar Hahnii. d= días, m= meses. Barra= 5 cm.

### 6. 2.3. Enraizamiento de brotes

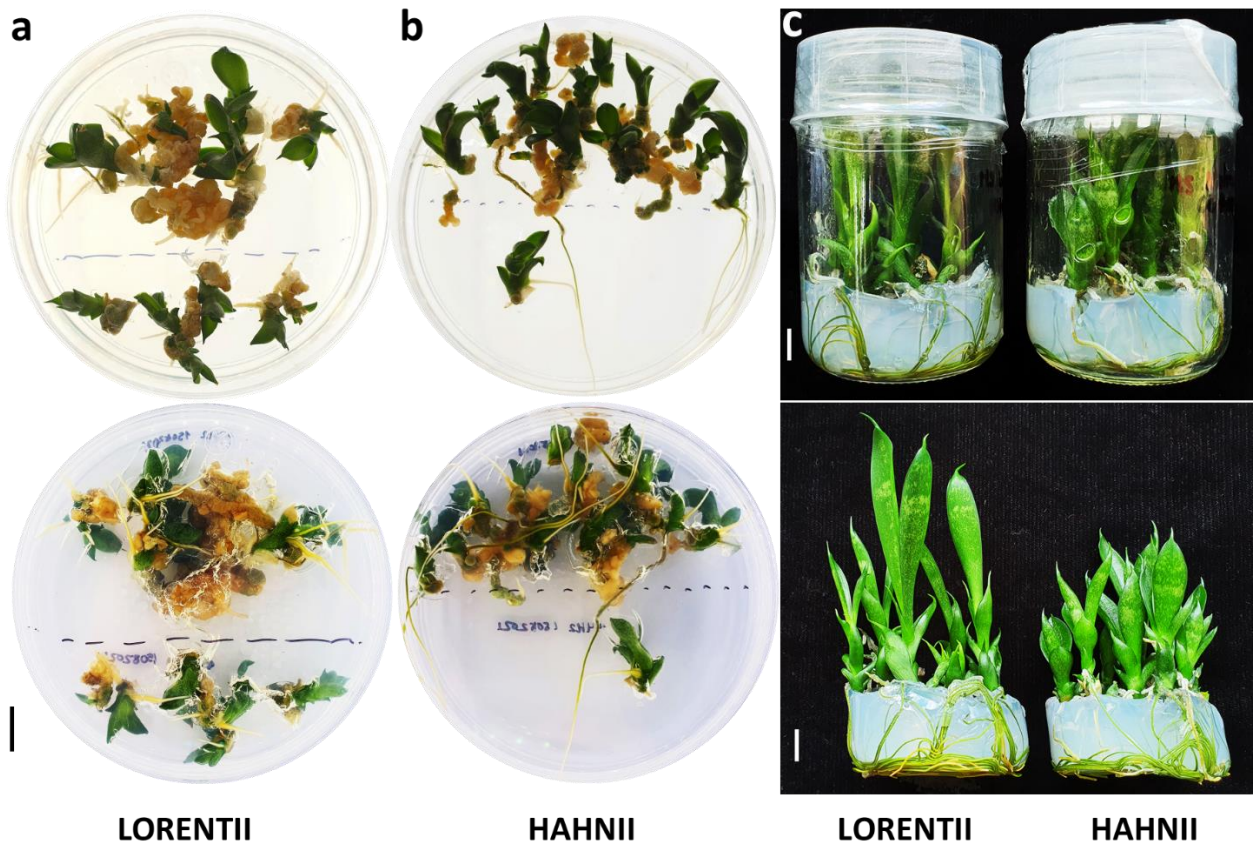
*Sansevieria trifasciata* es una suculenta que también es reconocida por su acelerada producción de raíces a partir de propagación convencional mediante rizomas o esquejes de hojas adultas (Hematharshini & Seran, 2017; Hematharshini & Seran, 2019; Kaur, 2021). Este comportamiento en condiciones naturales sugiere una alta biosíntesis de auxinas endógenas en dicha especie, hipótesis que se refuerza con nuestros ensayos *in vitro* donde en tratamientos testigos de ensayos previos para determinar las dos dosis finales de 2,4-D a evaluar en inducción de callos ( $2.0$  y  $3.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), observamos una alta producción de sistemas radiculares sobre todo en explantes de cultivar Hahnii (figura 34a), mientras que los brotes generados después de 12 semanas en medio MS +  $4.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de BAP fueron capaces de generar raíces (figura 34b). Además, pudimos observar la generación de sistemas radiculares mucho más desarrollados en brotes que se mantuvieron mayor tiempo en placas de Petri con este tratamiento (figura 35a,b) y cuando los brotes se transfirieron a medio de cultivo MS libre de hormonas en frascos con tapa, estos consiguieron su enraizamiento en un tiempo no mayor a las dos semanas (figura 35c).

A diferencia de Hematharshini & Seran (2017) y Simbolon (2017) quienes usaron la combinación  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de ANA y  $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de BAP para producir tanto brotes como

raíces, o Kaur (2021) quien empleó AIB en el medio de cultivo a dosis altas (5.0 - 10.0 mg·L<sup>-1</sup>) e inclusive en contraste a Sarmast et al., (2009) y Wahyuningsih et al., (2013) quienes optaron por una inmersión de los brotes durante 3 segundos en AIB a 2000 mg·L<sup>-1</sup> para inducir enraizamiento, nosotros evitamos el uso de fitohormonas para esta fase de generación de sistema radicular.



**Figura 34.** Capacidad rizogénica de *Sansevieria trifasciata* de diferentes tejidos y bajo distintas condiciones de cultivo. a) tejido foliar en medio MS libre de hormonas, b) callos organogénicos y brotes inducidos en medio MS + BAP. Barra= 1 cm.



**Figura 35.** Enraizamiento de *Sansevieria trifasciata*. a,b) brotes obtenidos a partir de callos organogénicos después de 16 semanas en medio MS + 4.0 mg·L<sup>-1</sup> de BAP, c) plántulas obtenidas en medio MS libre de hormonas. Líneas punteadas en placas Petri fueron marcadas como una guía para separar brotes obtenidos de distintas réplicas, sin embargo, pertenecen al mismo cultivar. Barra= 1 cm.

### 6. 3. Objetivo 2: Diseño y construcción de vectores de expresión

En nuestros experimentos, los vectores binarios pSR387 y pRI201-ON-eGFP/GUS que contienen en sus regiones T-DNA los genes reporteros *gfp* y *gus*, y los genes marcadores de selección *bar* y *ntplI*, respectivamente, fungieron como vectores estratégicos para los ensayos de transformación genética; por lo que previo a su movilización en dos cepas de *Agrobacterium tumefaciens*, su identidad e integridad fueron corroboradas mediante digestiones con enzimas de restricción.

### 6. 3.1. Digestiones de construcciones

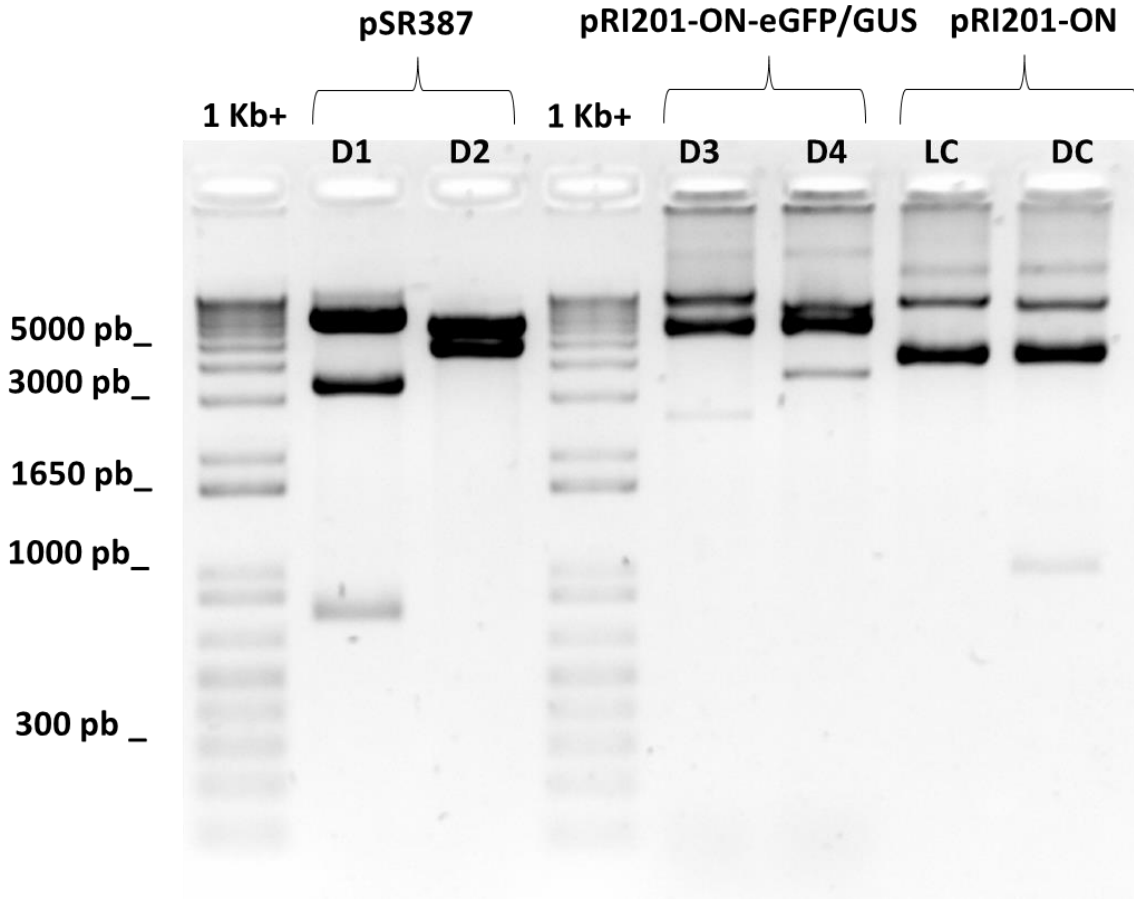
La finalidad de los análisis de restricción o digestiones es corroborar la identidad e integridad de un vector, el cual contiene una secuencia o fragmento específico delimitado por sitios de reconocimiento para diferentes enzimas de restricción (Anand et al., 2018). El primer análisis consistió en la liberación de los fragmentos correspondientes a los genes *bar*, *gfp* y *gus*, usando a pRI201-ON como vector de referencia para su visualización y comparación en gel de agarosa. Con el vector pSR387 se realizaron dos digestiones, la primera consistió en la liberación del fragmento eGFP/GUS y se emplearon las enzimas *SacI* y *PstI*, la segunda tuvo como blanco el fragmento BAR-eGFP/GUS y se utilizaron las enzimas *NdeI* y *SalI*. Por su parte, la liberación del fragmento correspondiente a eGFP/GUS del vector pRI201-ON-eGFP/GUS se buscó con las enzimas *NdeI* y *SalI* (tabla 24).

El patrón de restricción con 3 y 2 bandas bien definidas para la digestión D1 y D2 respectivamente, sugieren una digestión completa para pSR387, una liberación exitosa del fragmento correspondiente al inserto de genes marcadores (*gfp* y *gus*) y de selección (*bar*). Para las dos versiones del vector pRI201-ON se obtuvieron patrones de restricción parcialmente consistentes con lo esperado en la tabla 24, en ambos vectores se visualizó la presencia de configuraciones alternas, dado que en los carriles correspondientes se observó una banda extra a las esperadas. Aunado a esto, la banda más pequeña en las dobles digestiones (D3, D4 y DC) es de baja intensidad; tales comportamientos sugieren digestiones parciales para los vectores pRI201-ON y pRI201-ON-eGFP/GUS (figura 36).

**Tabla 24.** Análisis de restricción para corroborar identidad de vectores de expresión

Plásmido	Inserto	Tamaño	Clave*	Enzimas	Fragmentos
pSR387	eGFP/GUS	3340 pb	D1	<i>SacI</i> + <i>PstI</i>	6475 pb + 3340 pb + 903 pb
pSR387	BAR-eGFP/GUS	4975 pb	D2	<i>EcoRI</i> + <i>HindIII</i>	5743 pb + 4975 pb
pRI 201-ON-eGFP/GUS	eGFP/GUS	2539 pb	D3	<i>NdeI</i> + <i>SalI</i>	10442 pb + 2539 pb
pRI201-ON-eGFP/GUS	Análisis control	3510 pb	D4	<i>SalI</i> + <i>HindIII</i>	9471 pb + 3510 pb
pRI201-ON	Linearizado control	11479 pb	LC	<i>SalI</i>	10475 pb
pRI201-ON	Digestión control	1004 pb	DC	<i>SalI</i> + <i>HindIII</i>	9471 pb + 1004 pb

\*Nombres usados en gel de agarosa



**Figura 36.** Gel de agarosa al 1% de análisis de restricción de genes marcadores y de selección de plásmidos pSR387, pRI201-ON-eGFP/GUS y pRI201-ON.

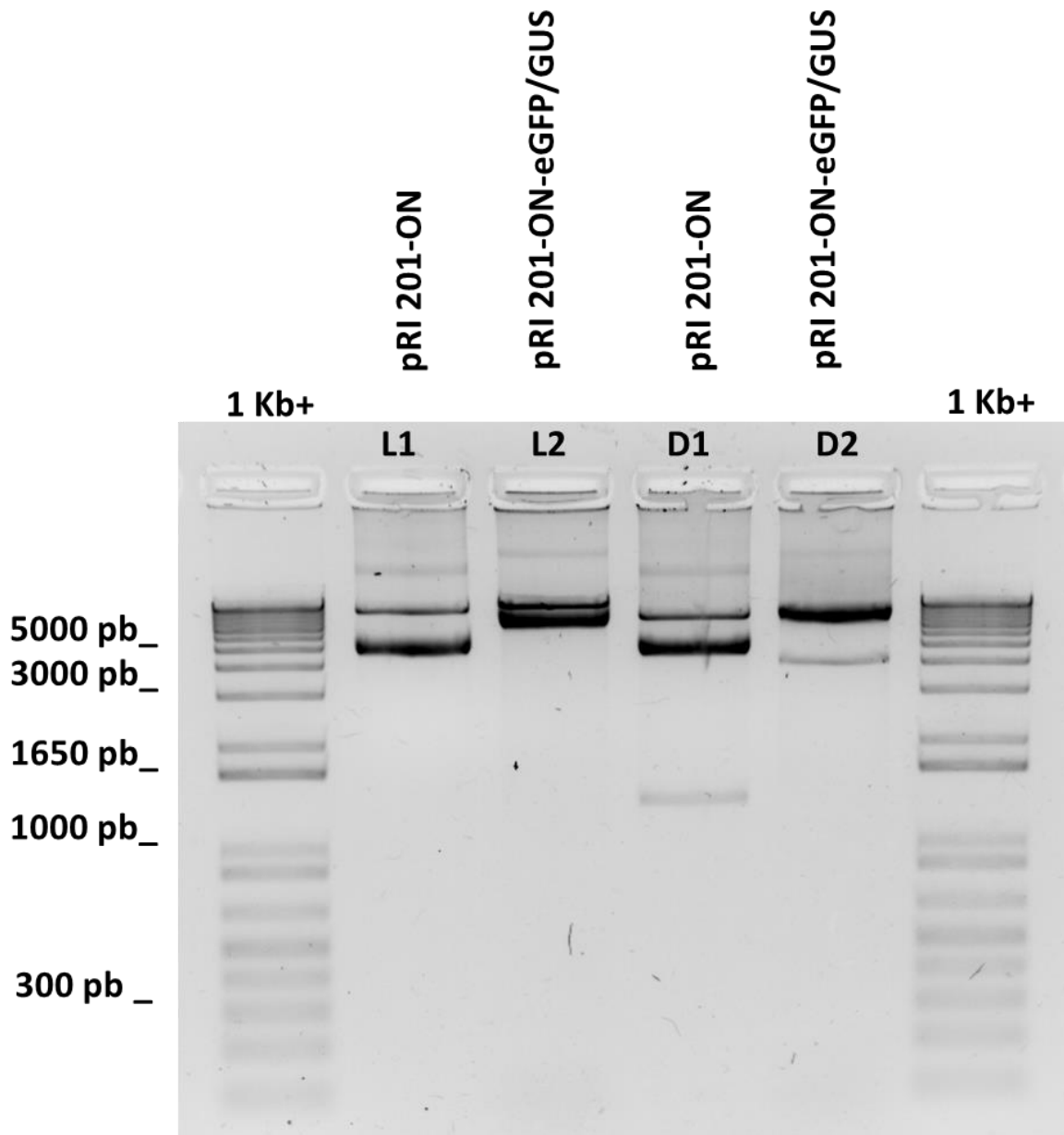
El segundo análisis de restricción se llevó a cabo exclusivamente con los plásmidos pRI201-ON y pRI201-ON-eGFP/GUS. En este se buscó la linearización y doble digestión de ambos vectores para demostrar la diferencia de tamaños otorgada por el inserto eGFP/GUS. Los linearizados se llevaron a cabo con la enzima HindIII y las dobles digestiones se realizaron con las enzimas HindIII y BamHI (tabla 25). El patrón de restricción fue parcialmente consistente a lo esperado, si bien fue posible evidenciar la diferencia de tamaños entre ambos vectores, en el gel de agarosa nuevamente se visualizó la presencia de patrones de restricción con una banda extra, así como también baja intensidad en la banda más pequeña correspondiente al fragmento liberado en las dobles digestiones (figura 37).

Los resultados obtenidos de los vectores pRI201-ON y pRI201-ON-eGFP/GUS en ambos análisis de restricción posiblemente se deben a la presencia de moléculas de plásmido en diferentes conformaciones, como lo pueden ser las formas superenrollada o relajada. Estos estados topológicamente distintos de una misma secuencia genómica ocupan un volumen efectivo diferente y por lo tanto migran a distinta velocidad a través de los poros del gel de agarosa (Cebrián et al., 2021; Liu et al., 2018; Smrek et al., 2021).

**Tabla 25.** Análisis de restricción para corroborar integridad y tamaño de vector pRI201-ON-eGFP/GUS

Plásmido	Análisis	Clave*	Enzimas	Fragmentos
pRI201-ON	Linearizado 1	L1	HindIII	10475 pb
pRI201-ON-eGFP/GUS	Linearizado 2	L2	HindIII	12981 pb
pRI201-ON	Doble digestión 1	D1	HindIII + BamHI	9126 pb + 1394 pb
pRI201-ON-eGFP/GUS	Doble digestión 2	D2	HindIII + BamHI	9126 pb + 3855 pb

\*Nombres usados en gel de agarosa



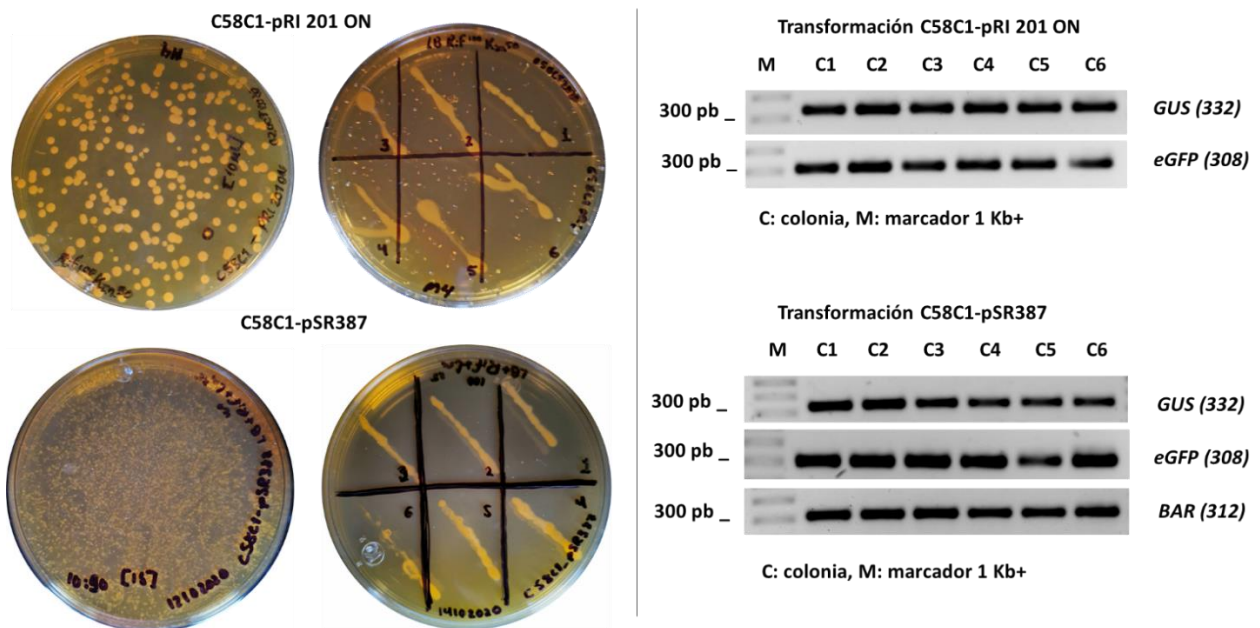
**Figura 37.** Gel de agarosa al 1% de linearizado y doble digestión de plásmidos pRI201-ON y pRI201-ON-eGFP/GUS

### 6. 3.2. Transformaciones de cepas de *Agrobacterium tumefaciens*

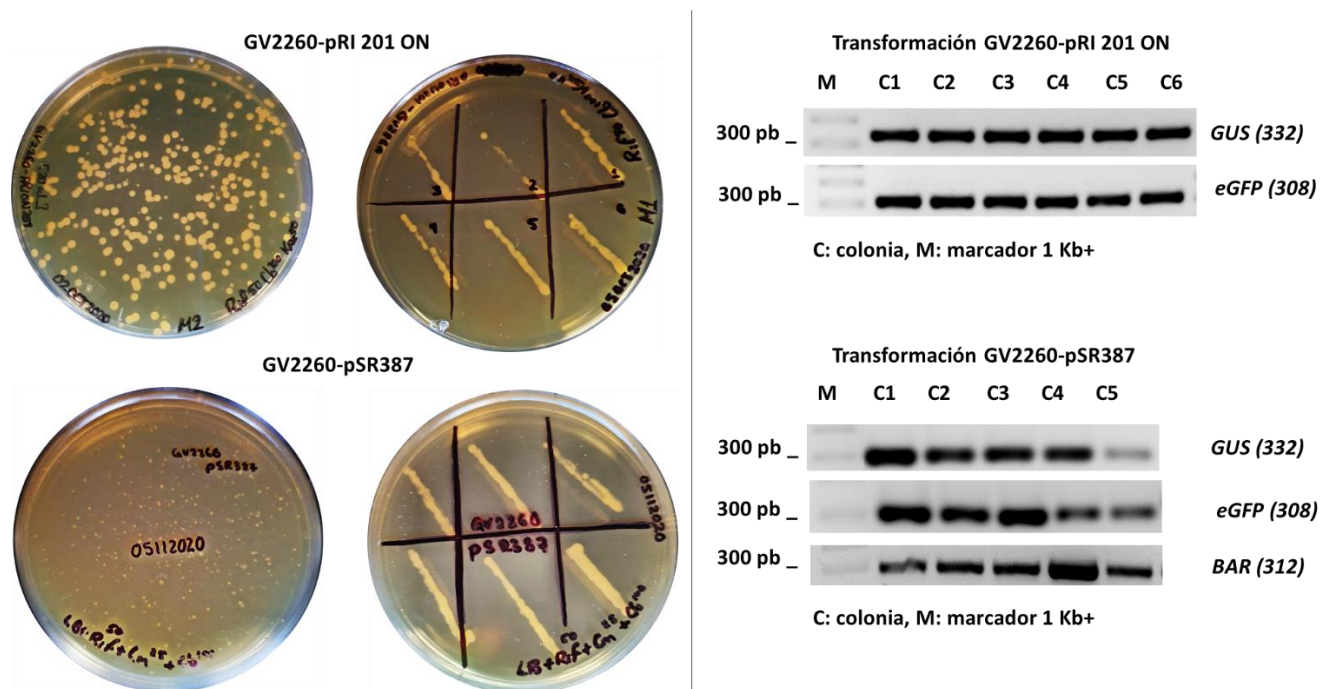
Se obtuvieron colonias en las dos cepas de *A. tumefaciens* elegidas (C58C1 y GV2260) y transformadas con los dos plásmidos deseados (pSR387 y pRI201-ON-eGFP/GUS). El crecimiento de las colonias se dio a las 48 horas, y de ellas se seleccionaron 5 - 6 colonias para su subcultivo durante 24 horas y para su análisis posterior. Los patrones



de crecimiento de todas las colonias y aquellas seleccionadas se muestran en las figuras 33 y 34. Debido a que ambos plásmidos cuentan con los mismos genes reporteros y dada la disponibilidad de nuestros primers, los amplicones obtenidos por PCR punto final corresponden a fragmentos de los genes reporteros *gfp* y *gus*; solamente para las transformaciones de ambas cepas con el vector pSR387 se amplificó un fragmento del gen de resistencia o selección *bar*. Las pruebas de PCR punto final indicaron que en todos los casos las colonias seleccionadas resultaron positivas a la transformación realizada (figuras 38 y 39).



**Figura 38.** Transformaciones con cepa C58C1 de *Agrobacterium tumefaciens* y sus respectivas amplificaciones por PCR de fragmentos correspondientes a genes reporteros y de selección



**Figura 39.** Transformaciones con cepa GV2260 de *Agrobacterium tumefaciens* y sus respectivas amplificaciones por PCR de fragmentos correspondientes a genes reporteros y de selección

#### 6. 4. Objetivo 3: Establecimiento de un protocolo de transformación genética

Cualquier protocolo de transformación genética de plantas requiere de un sistema robusto para la selección de transformantes. En este trabajo el sistema de selección fue positivo, y dado los vectores de expresión empleados, estuvo basado en el uso de compuestos con acción herbicida (gen *bar*, glufosinato de amonio) o antibióticos (gen *ntplI*, kanamicina). El primer paso en establecimiento del protocolo de transformación genética de *Sansevieria trifasciata* mediado por *Agrobacterium tumefaciens* fue determinar los umbrales de susceptibilidad de los cultivares Lorentii y Hahnii a los dos agentes de selección, en diferentes estadios del proceso de regeneración por organogénesis indirecta anteriormente descrito.

##### 6. 4.1. Ensayos de susceptibilidad a glufosinato de amonio

Glufosinato de amonio es un agente de acción herbicida no selectivo de amplio espectro que se encuentra entre los más utilizados del mundo. Este compuesto actúa inhibiendo la actividad de la enzima glutamina sintasa, la cual desintoxica el amoniaco y produce el

aminoácido glutamina. En transformación genética ha sido empleado para seleccionar y controlar cultivos transformadas con el gen *bar* y ha fungido como alternativa para controlar malezas resistentes a dosis altas de glifosato (Ferrari et al., 2021; Takano & Dayan, 2020). Debido a que se encuentra disponible en formulaciones de herbicidas comerciales y es distribuido como grado reactivo por empresas biotecnológicas, decidimos emplear una versión comercial (FINALE®) y uno grado reactivo (Sigma-Aldrich®)

#### **6. 4.1.1. Glufosinato de amonio (FINALE®, Bayer)**

Los ensayos de susceptibilidad realizados con esta formulación de glufosinato de amonio destacaron por la alta tasa de mortalidad de segmentos foliares y brotes ante la exposición al herbicida. En todos los tratamientos diseñados para ambos cultivares, las dosis evaluadas fueron letales para los dos tipos de material vegetal, y en ambos los efectos iniciales fueron una pérdida de clorofila notable a los 14 días de tratamiento, y necrosis evidente a los 24 días (figuras 40 y 41). Las dosis de FINALE® evaluadas en segmentos foliares fueron más bajas que las empleadas en brotes, esto debido a que son de un menor tamaño y a que todo el segmento de hoja estuvo en contacto directo con el medio de cultivo suplementado con el herbicida.

En segmentos foliares FINALE® provocó necrosis en la mayoría de los explantes evaluados aún bajo la dosis de  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  en ambos cultivares (figura 40). En brotes, una mayor concentración del herbicida desencadenó una clorosis más obvia aún en las dosis más bajas ( $20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), especialmente en el cultivar Hahnii (figura 41). Al comparar el comportamiento de las dos variedades ante el herbicida, es evidente una mayor susceptibilidad del cultivar Hahnii que el cultivar Lorentii, en cualquiera de las dosis probadas y material vegetativo evaluado.

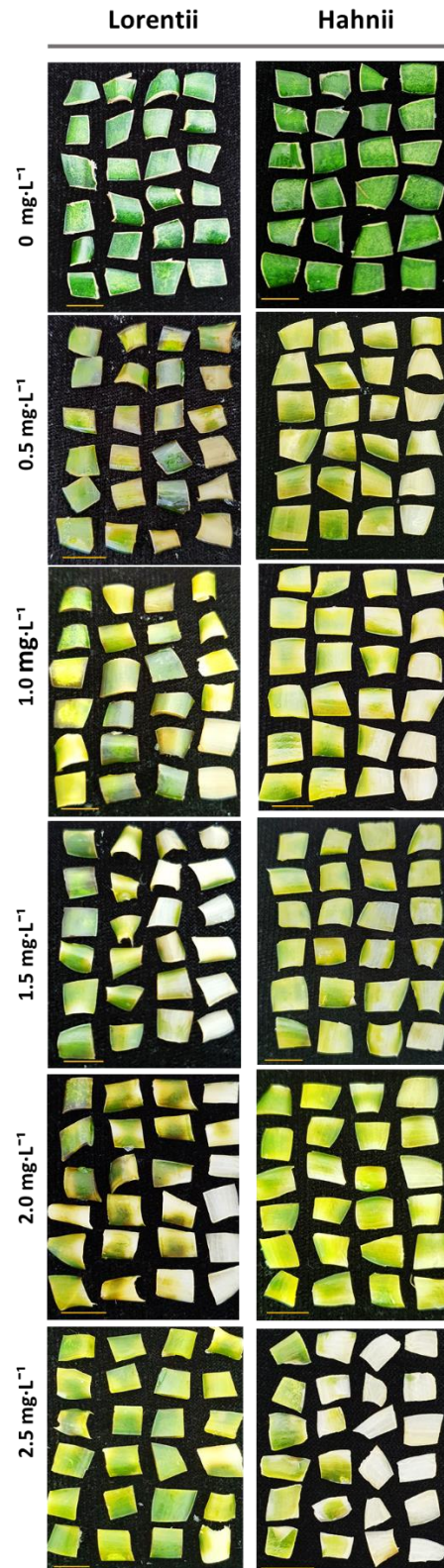
#### **6. 4.1.2. Glufosinato de amonio (grado reactivo, Sigma-Aldrich®):**

Los experimentos realizados con glufosinato de amonio grado reactivo arrojaron resultados más claros sobre una respuesta dosis-dependiente de *Sansevieria trifasciata* al agente de selección. En brotes, una clara pérdida de clorofila, inhibición de rizogénesis y necrosis mostraron un gradiente en función de la dosis utilizada. A  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  e incluso a  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , las dosis más bajas, los efectos negativos observados fueron mínimos en

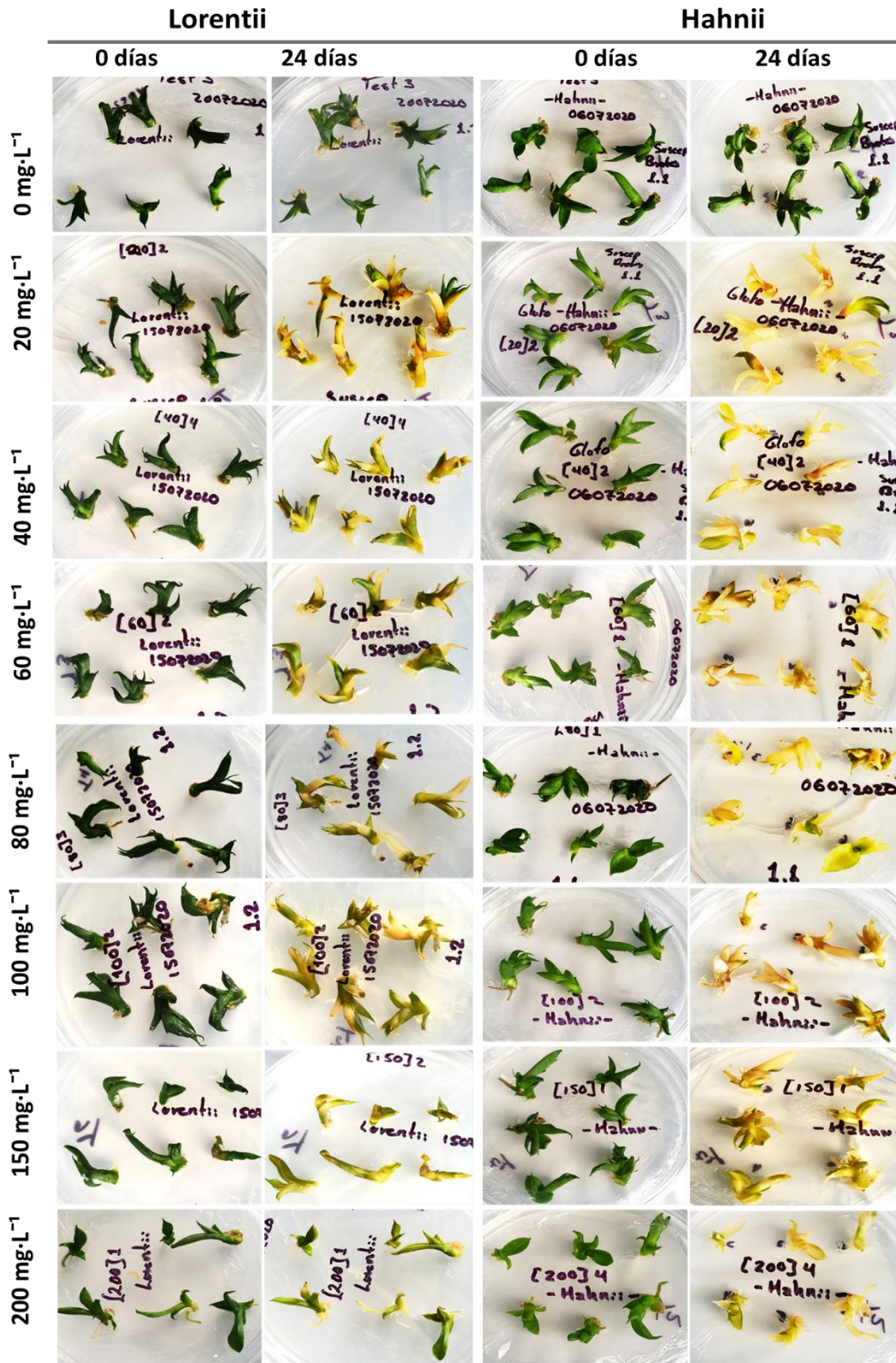
ambos cultivares, mientras que, a la dosis más alta ( $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), los efectos fueron más significativos (figura 42). Nuevamente el cultivar Hahnii demostró mayor susceptibilidad que Lorentii a glufosinato de amonio.

#### **6. 4.1.3. Glufosinato de amonio (grado reactivo, Sigma-Aldrich®) en explantes potenciales para transformación por co-cultivo:**

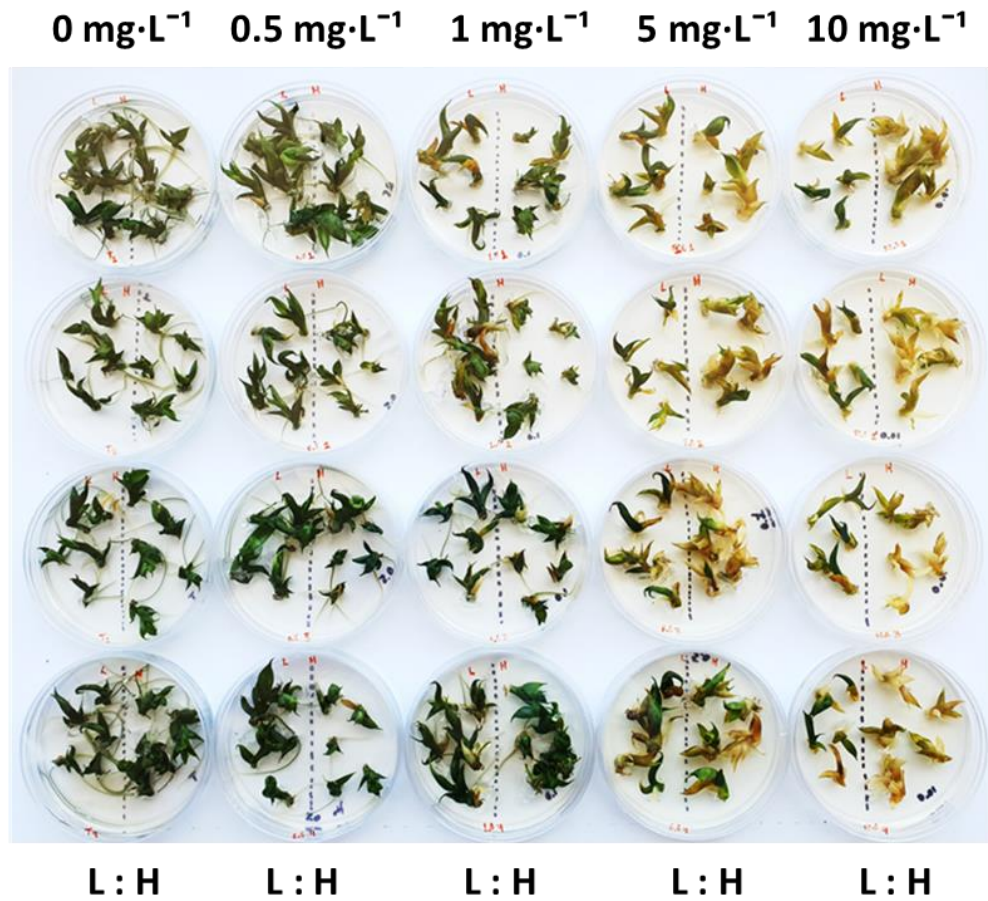
Los callos primarios (6 semanas de edad) ideales para los ensayos de transformación genética, también demostraron ser altamente susceptibles a glufosinato de amonio grado reactivo (Sigma-Aldrich®), ya que todas las concentraciones utilizadas inhibieron la síntesis de clorofila. Únicamente los callos cultivados en el tratamiento testigo pasaron a ser organogénicos después de 8 semanas en medio MS (figura 43). Los callos organogénicos mostraron igualmente alta susceptibilidad ante el agente de selección. A partir de los 14 días la pérdida de clorofila fue drástica, en la figura 44 se ilustran los efectos en estos tejidos a los 21 días posteriores al establecimiento del cultivo.



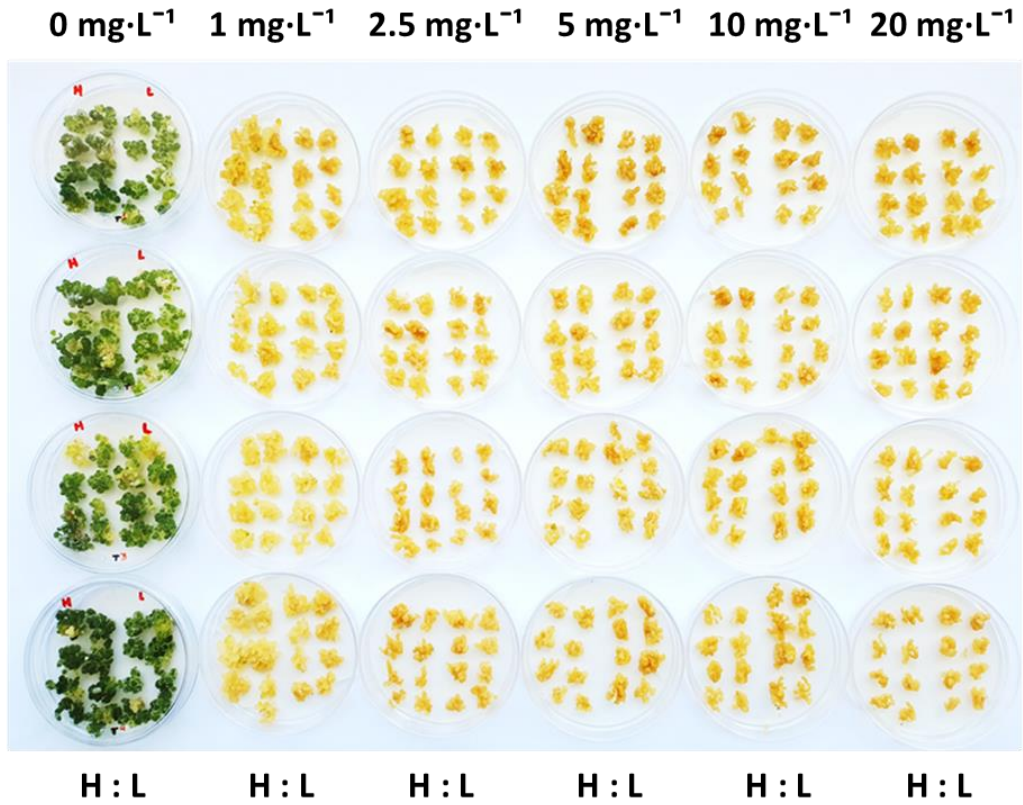
**Figura 40.** Susceptibilidad de segmentos foliares de *Sansevieria trifasciata* a glufosinato de amonio (FINALE®) 21 días después de cultivo



**Figura 41.** Susceptibilidad de brotes de *Sansevieria trifasciata* a diferentes dosis de glufosinato de amonio (FINALE®)

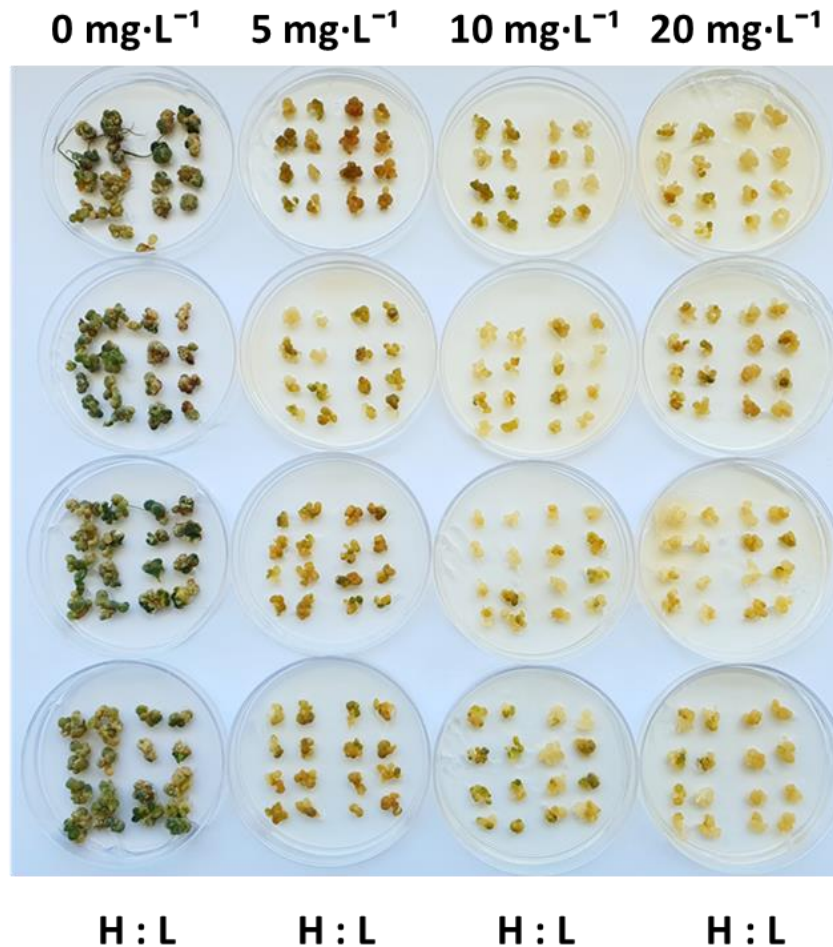


**Figura 42.** Efectos de glufofosinato de amonio (Sigma-Aldrich®) en brotes de *Sansevieria trifasciata* cv. Lorentii (izquierda) y cv. Hahnii (derecha) en la misma placa de Petri, 21 días después de cultivo.



**Figura 43.** Efectos de glufosinato de amonio (Sigma-Aldrich®) en callos primarios de *Sansevieria trifasciata* cv. Hahnii (izquierda) y cv. Lorentii (derecha) en la misma placa de Petri, 21 días después de cultivo



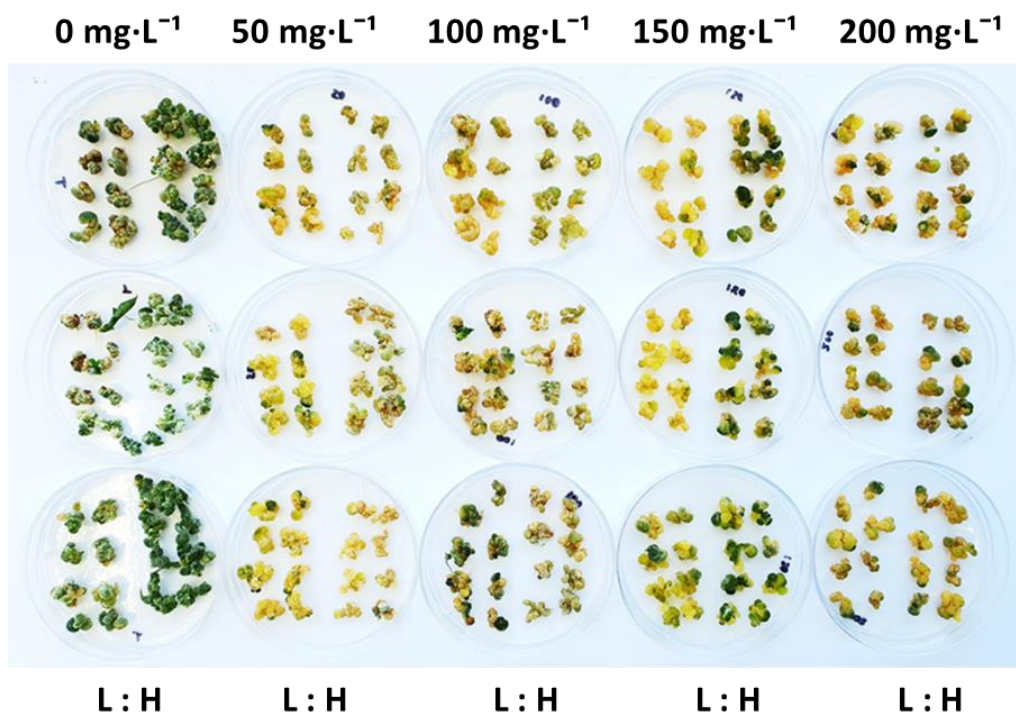


**Figura 44.** Efectos de glufosinato de amonio (Sigma-Aldrich) en callos organogénicos de *Sansevieria trifasciata* cv. Hahnii (izquierda) y cv. Lorentii (derecha) en la misma placa de Petri, 21 días después de cultivo

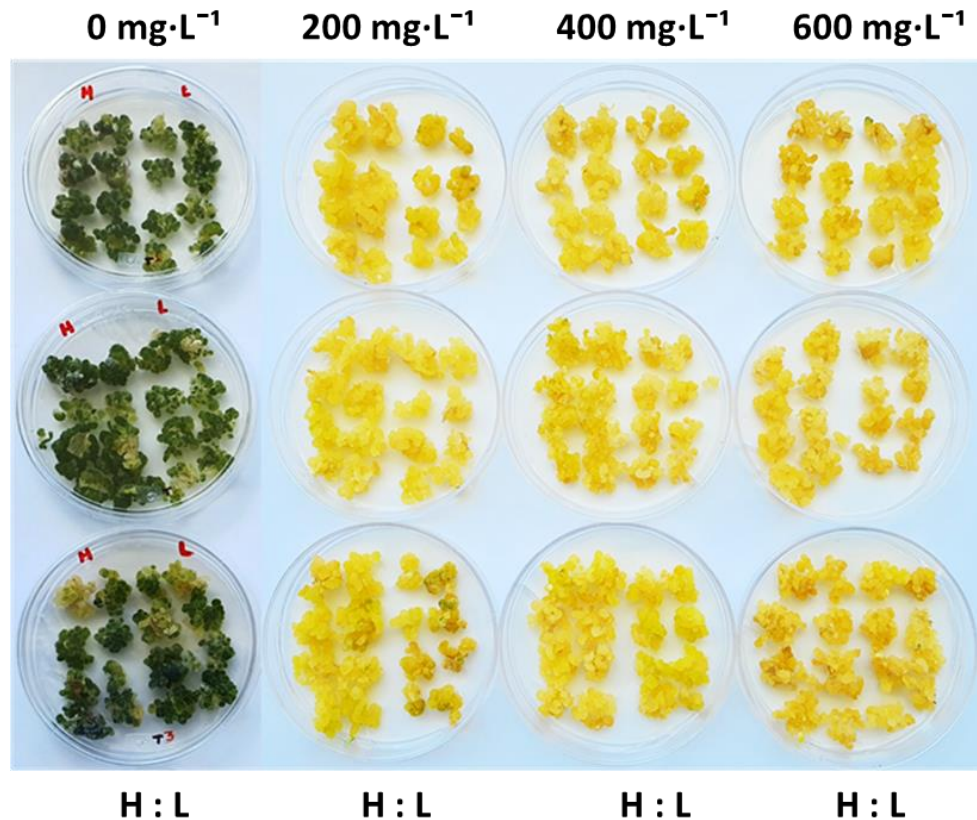
#### 6. 4.1.4. Ensayos de susceptibilidad de *Sansevieria trifasciata* a kanamicina

Los callos primarios (6 semanas de edad) de *S. trifasciata* son susceptibles al antibiótico kanamicina a diferencia del comportamiento con glufosinato de amonio, los callos requirieron de un plazo mucho más largo para observar los efectos negativos del antibiótico. Se necesitaron de al menos 42 días para visualizar un efecto negativo contundente contra el tratamiento testigo. Las dosis comprendidas entre 50 mg·L<sup>-1</sup> y 200 mg·L<sup>-1</sup> ocasionaron una lenta capacidad de conversión a callos organogénicos, ya que a pesar de que no produjeron brotes o raíces como se observó en los tratamientos testigos, fueron perceptibles en ellos pequeñas zonas verdes que señalaron la presencia

de clorofila después de 56 días de cultivo. Dosis mayores a  $200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  promovieron la incapacidad de los callos primarios para adquirir mínimas cantidades de este pigmento fotosintético. En las figuras 45 y 46 se observan los resultados obtenidos a los 56 días de cultivo en dos tamaños de callos primarios iniciales. En ambos experimentos se observa claramente un mayor crecimiento del callo organogénico del cultivar Hahnii con respecto a Lorentii en tratamientos testigos, lo que es coincidente con los resultados obtenidos en la fase de inducción de callos organogénicos durante el protocolo de micropropagación.



**Figura 45.** Efecto de kanamicina (Phytotechnology laboratories®) en callos primarios de *Sansevieria trifasciata* de cv. Lorentii (izquierda) cv. Hahnii (derecha) en la misma placa de Petri, 56 días después de cultivo, experimento 1. Empleándose callos de alrededor de  $0.5 \text{ cm}^2$ . L= Lorentii, H= Hahnii.



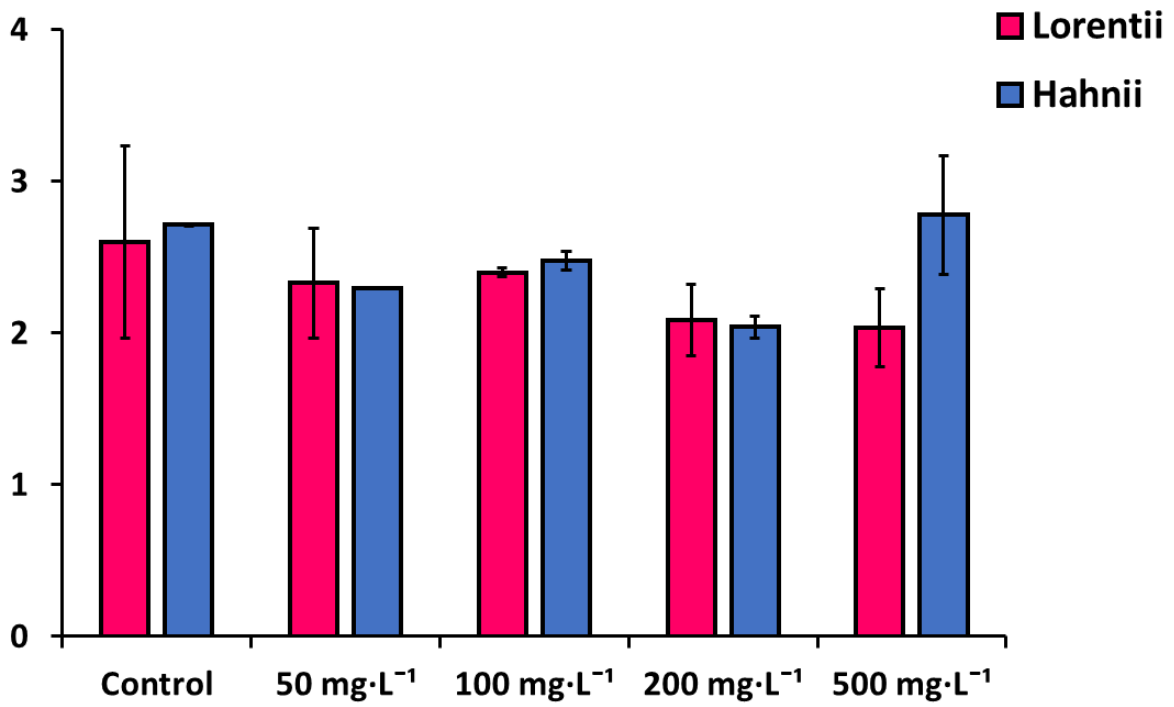
**Figura 46.** Efecto de Kanamicina (Phytotechnology laboratories®) en callos primarios de *Sansevieria trifasciata* cv. Hahnii (izquierda) y cv. Lorentii (derecha) en la misma placa de Petri, 56 días después de cultivo, experimento 2. Empleándose callos de 1 cm<sup>2</sup>. H= Hahnii, L= Lorentii

#### 6. 4.1.5. Efectos de glufosinato de amonio y kanamicina en la ganancia de biomasa fresca y en el contenido de clorofila de callos primarios de *Sansevieria trifasciata*

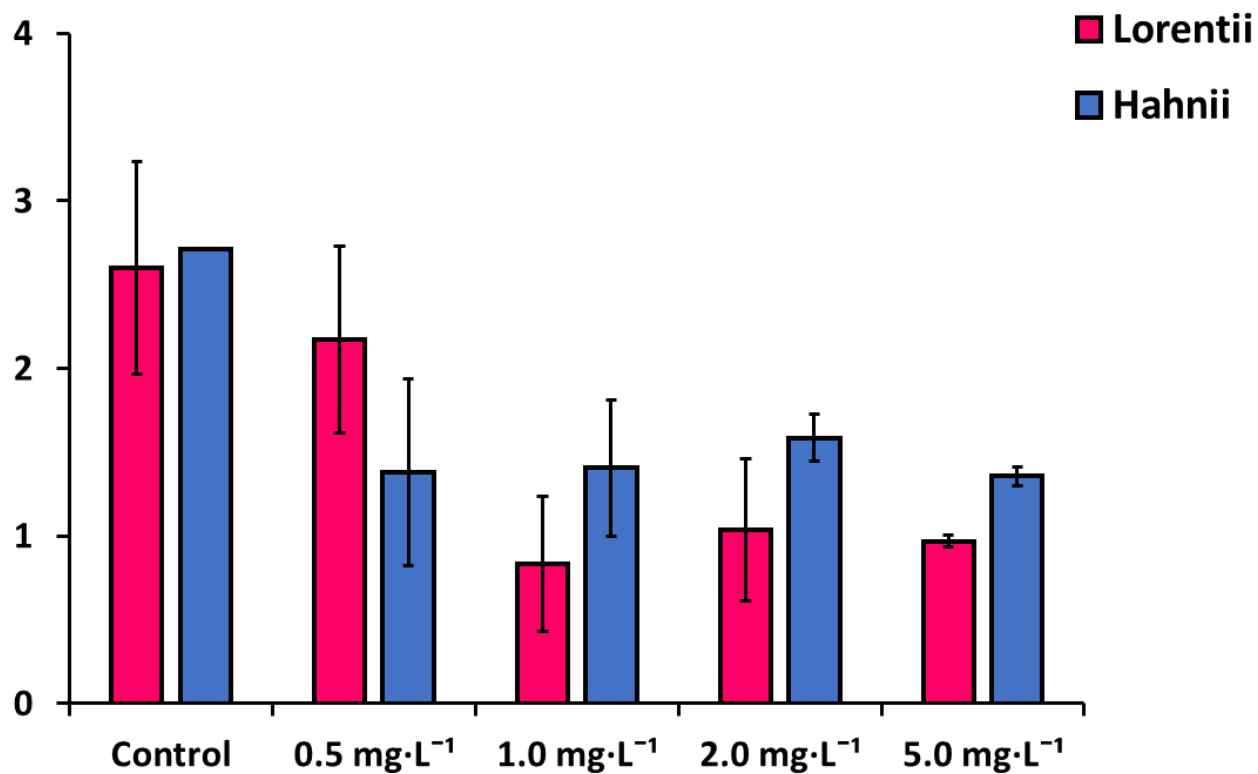
El último experimento llevado a cabo con callos primarios (6 semanas de edad) de *S. trifasciata* evidenció la letalidad de glufosinato de amonio y la alta resistencia natural al antibiótico kanamicina (Phytotechnology laboratories®). Glufosinato de amonio propició una baja tasa de multiplicación celular en los callos primarios y evitó la adquisición de pigmentos fotosintéticos, resultando así en una baja ganancia de biomasa al final del experimento. Por otro lado, kanamicina no inhibió el crecimiento del callo, todos los tratamientos al igual que el testigo prácticamente triplicaron su biomasa al final del experimento (figura 47). Este acontecimiento fue más contrastante en glufosinato de amonio, donde el desarrollo de los callos colocados en dosis de 1.0 – 5.0 mg·L<sup>-1</sup> fue

mínimo. Lorentii logró un promedio de 2.59 gramos de biomasa final/gramo inicial, mientras que Hahnii un promedio de 2.71 gramos; triplicando de esta manera su peso fresco. El tratamiento correspondiente a  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  tuvo un comportamiento similar solamente en el cultivar Lorentii, pues su rendimiento fue de 2.17 gramos de biomasa final/gramo inicial, pero en Hahnii fue solamente de 1.38 gramos. El rendimiento en los tratamientos restantes fue prácticamente nulo para ambos cultivares, ya que ninguno logró duplicar su biomasa al final del tratamiento (figura 48).

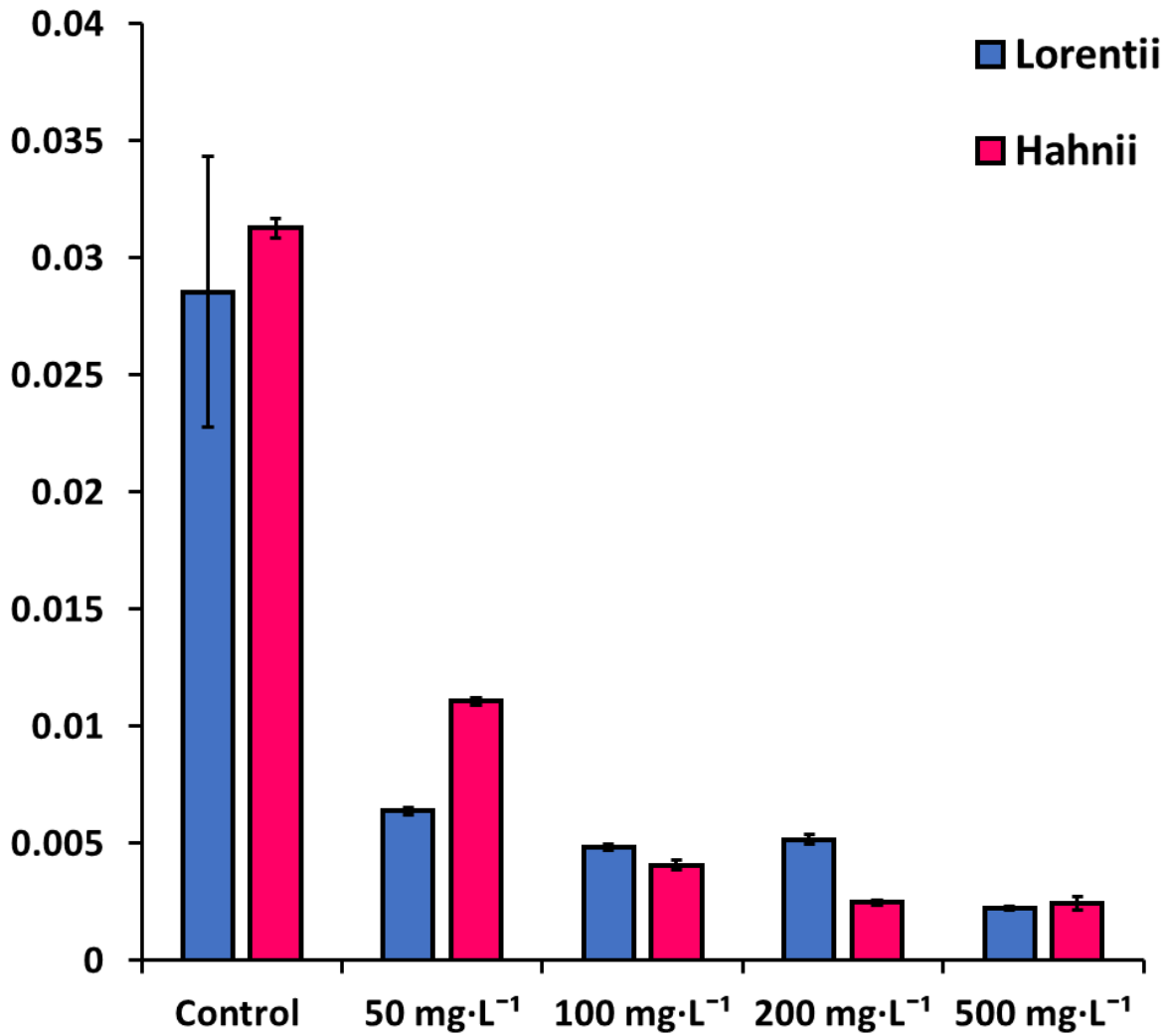
Los efectos en el contenido de clorofila en ambos cultivares expuestos a los dos agentes de selección fueron más contrastantes, el índice es alto exclusivamente en los tratamientos testigos ya que a partir de la dosis más baja de kanamicina ( $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) este descende exponencialmente hasta casi 10 veces en la dosis más alta ( $500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) (figura 49). De forma más drástica se presentó el mismo resultado en los callos sometidos a glufosinato de amonio, donde a partir de la dosis más baja ( $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) el contenido se redujo a tal grado de obtenerse resultados bajo cero en las dosis más altas y particularmente en el cultivar Hahnii (figura 50).



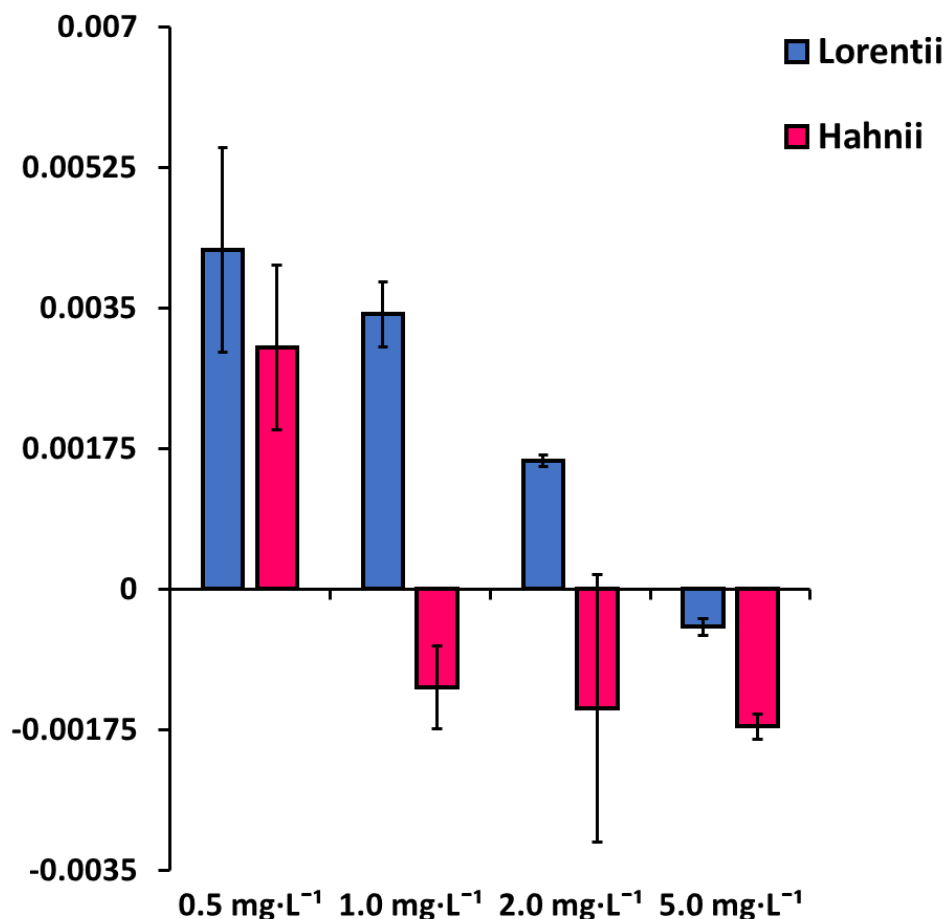
**Figura 47.** Rendimiento de biomasa de callos de *Sansevieria trifasciata* sometidos a diferentes dosis de kanamicina. Barras de error= D.E.



**Figura 48.** Rendimiento de biomasa de callos de *Sansevieria trifasciata* sometidos a diferentes dosis de glutosinato de amonio. Barras de error = D.E.



**Figura 49.** Contenido de clorofila total (µg·mg) en callos de *Sansevieria trifasciata* expuestos a diferentes dosis de kanamicina. Barras de error = D.E.



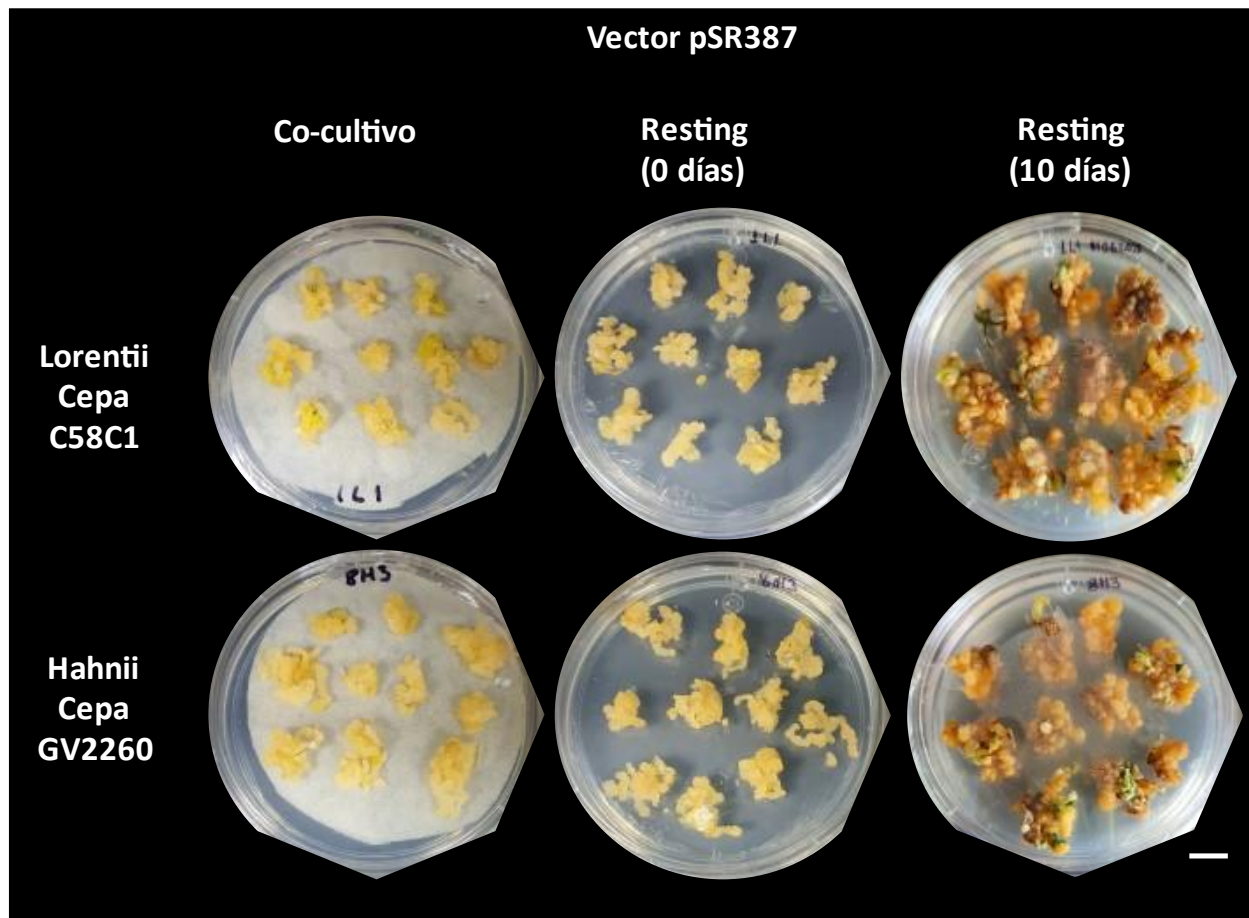
**Figura 50.** Contenido de clorofila total ( $\mu\text{g}\cdot\text{mg}$ ) en callos de *Sansevieria trifasciata* expuestos a glutosinato de amonio. Barras de error = D.E.

### 6. 5. Ensayos de transformación genética de *Sansevieria trifasciata* mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

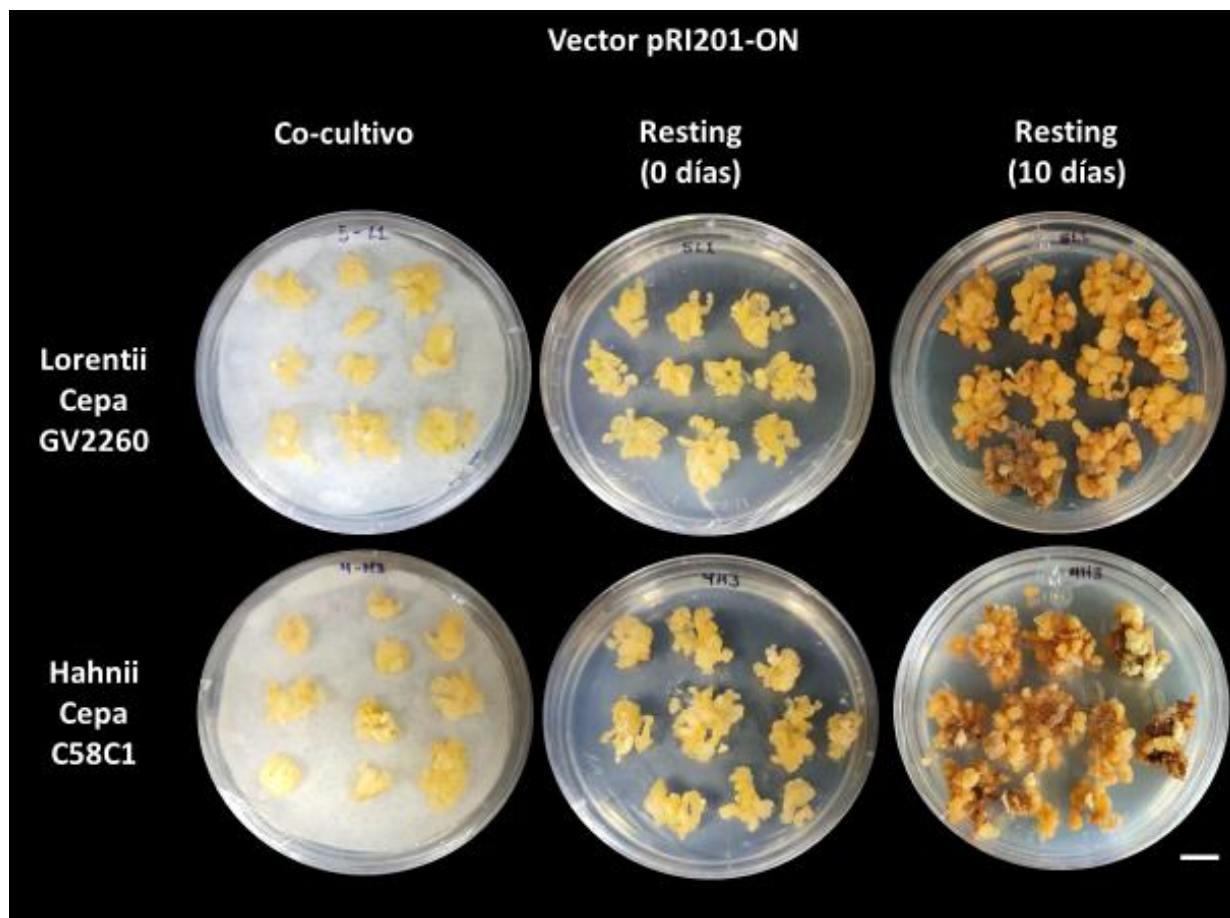
Durante los tiempos de co-cultivo realizados (72 y 144 horas) con los callos de *S. trifasciata* no se percibió crecimiento de ninguna cepa, la formación de colonias bacterianas se dio a partir de los 10 días (cepa C58C1) y 14 días (cepa GV2260) después de la infección, durante la fase de “resting” (figura 51 y 52). Los lavados para evitar este crecimiento se llevaron a cabo cada cuatro días durante las primeras dos semanas posteriores al co-cultivo, y cada siete días a partir de la semana número tres. A pesar de los lavados constantes con  $250 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de Cefotaxima y  $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de Carbenicilina no se pudo controlar el exceso de bacteria, lo que llevó a la muerte de la mayoría de los explantes de *S. trifasciata* cv. Hahnii y cv. Lorentii (figura 53). Para tratar de solventar



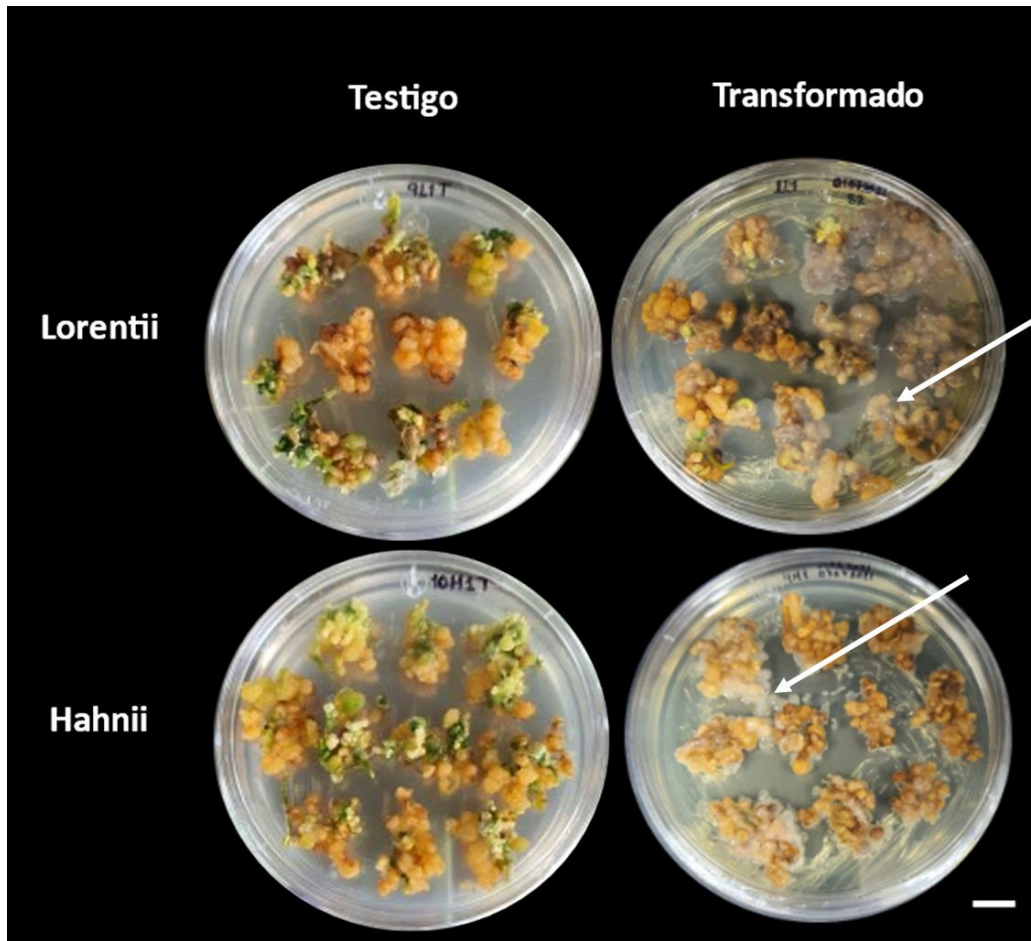
este problema, se llevó a cabo una nueva estrategia de desinfección en el segundo ensayo de transformación, la cual consistió en duplicar las dosis de los antibióticos y el uso de Tween 20 al 1.0%. Los lavados con 500 mg·L<sup>-1</sup> de Cefotaxima y 200 mg·L<sup>-1</sup> de Carbenicilina y Tween 20 al 1.0% lograron controlar en gran porcentaje el crecimiento de *A. tumefaciens*, sobre todo de la cepa GV2260. Los lavados de los callos infectados en ambos ensayos se realizaron por triplicado durante 5 minutos, seguidos de un enjuague con agua estéril durante 3 minutos para posteriormente secarse en papel filtro y finalmente sembrarse en medio selectivo. Las concentraciones utilizadas para los medios de selección fueron progresivas, las primeras dos semanas se utilizaron medios suplementados con 50 mg·L<sup>-1</sup> de kanamicina o 1.0 mg·L<sup>-1</sup> de glufosinato de amonio, a partir de la tercera semana en fase de selección se emplearon 100 mg·L<sup>-1</sup> de kanamicina o 2.0 mg·L<sup>-1</sup> de glufosinato de amonio. En su mayoría, los explantes infectados presentaron necrosis, se fue perdiendo un alto porcentaje de éstos después de varias semanas de cambio de medio y en espera de su regeneración. Una pequeña cantidad de los callos primarios lograron inducirse a callos organogénicos, algunos mostraron pequeñas protuberancias iniciales correspondientes a brotes después de 8 semanas de cambios. Aunque las observaciones no fueron satisfactorias debido a que la regeneración *in vitro* fue prácticamente nula después de las diferentes resiembras, una muestra al azar de los callos fue analizada bajo microscopía de epifluorescencia. Los resultados no sugieren una transformación exitosa, pues no existieron diferencias contrastantes entre los tratamientos testigo y los tratamientos correspondientes a las cepas con los plásmidos movilizados (figura 54). Sin embargo, la prevalencia de una cantidad considerable de callos en su medio de cultivo selectivo después de 8 semanas de resiembra, genera la posibilidad de que algunos de ellos hayan sido transformados. Estos explantes seguirán bajo observación y serán analizados posteriormente, al igual que se diseñarán e iniciarán nuevos protocolos de transformación partiendo de estos dos ensayos iniciales.



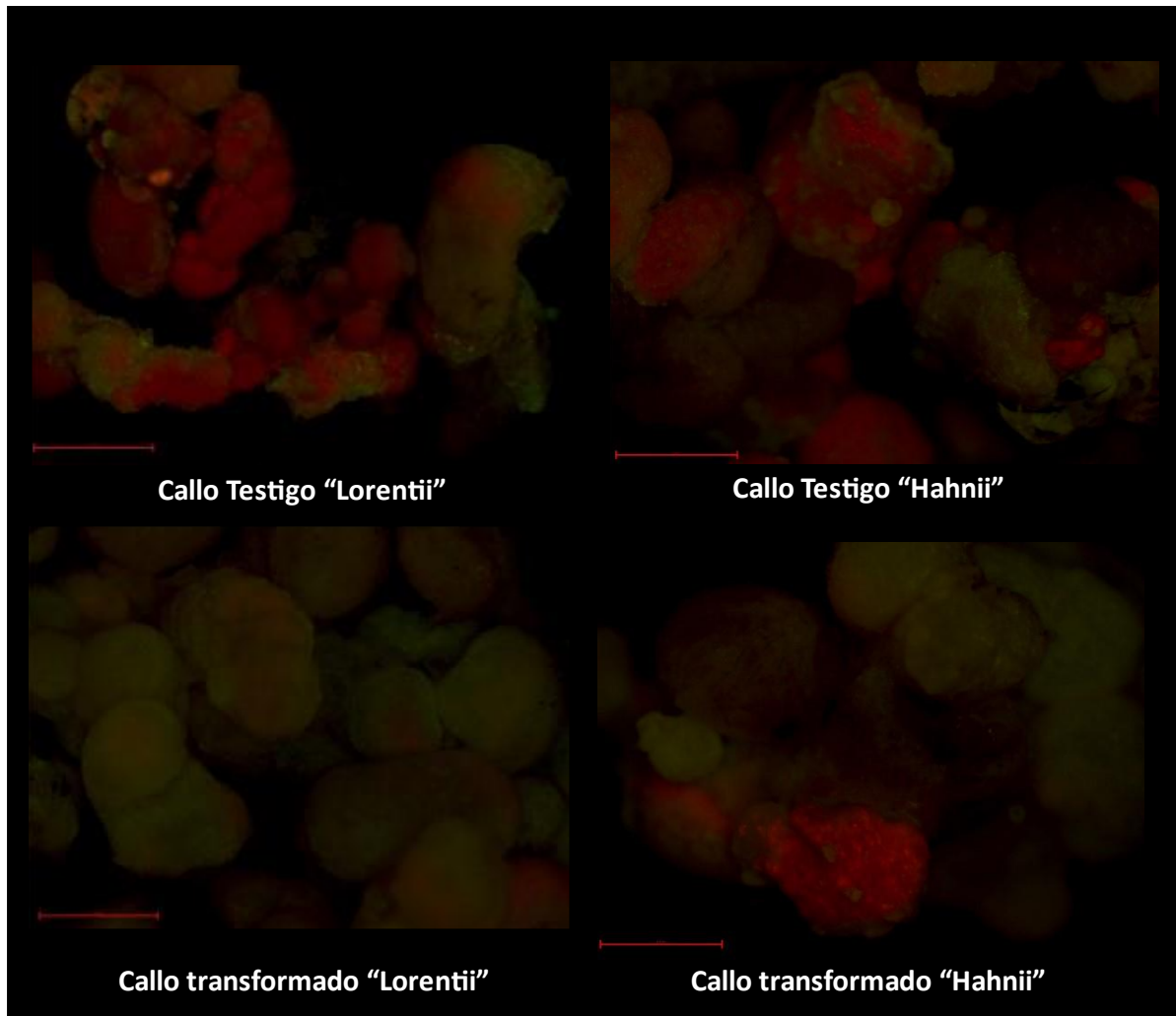
**Figura 51.** Fases iniciales de protocolo de transformación genética de *Sansevieria trifasciata* empleando cepas de *Agrobacterium tumefaciens* con vector pSR387. Barra= 1 cm



**Figura 52.** Fases iniciales de protocolo de transformación genética de *Sansevieria trifasciata* empleando cepas de *Agrobacterium tumefaciens* con vector pRI201-ON-eGFP/GUS. Barra= 1 cm.



**Figura 53.** Problemas de persistencia de *Agrobacterium tumefaciens* en etapas de selección. Flecha blanca= colonias bacterianas. Barra= 1 cm.



**Figura 54.** Callos de *Sansevieria trifasciata* observados bajo microscopía de epifluorescencia. Barra = 0.5 cm

## 6. 6. Discusiones finales

*Sansevieria trifasciata* Prain es una especie monocotiledónea de metabolismo CAM, suculenta, rica en fibras duras, de rápido crecimiento, con amplia disponibilidad de germoplasma, y que destaca por su versatilidad para adaptarse a diferentes climas-regiones de zonas tropicales y subtropicales de todo el mundo (Hematharshini & Serán, 2017; Lu & Morden, 2014). Esta especie cuenta con al menos 20 cultivares, de los cuales, dos de los más atractivos son Lorentii y Hahnii, entre ellos existen diferencias morfológicas-anatómicas bastante evidentes, por lo que algunos coleccionistas los han considerado como dos especies, tal distinción ha sido errónea ya que gracias a enfoques moleculares se ha demostrado recientemente nula variación intraespecífica entre ambos (Rembet et al., 2016; Tallei et al., 2016).

Lorentii es el cultivar más común por lo que es utilizado como representante visual de la especie, un ejemplar adulto de éste cuenta con hojas de tonos verdes oscuros-claros y con márgenes de tono amarillo, a comparación de otros cultivares cuenta con una cantidad reducida de hojas, pero bastante elongadas (Butler, 1997; Takawira & Nordal, 2001; Thu *et al.*, 2021). Hahnii en cambio es un cultivar derivado de Lorentii, el cual, en base a nuestros resultados, en su etapa adulta puede contener un promedio de 10.96 hojas (casi 3 veces más que Lorentii), a diferencia del otro cultivar, sus hojas son más pequeñas con tonos exclusivamente verdes oscuros, en cuanto a distribución, estas le atribuyen forma de roseta (Carlquist & Schneider, 2007; Rembet et al., 2016; Marcotrigiano & Morgan, 1998; Rêgo et al., 2020).

Si bien la disponibilidad de fibras en *S. trifasciata* cv. Lorentii la han impulsado como materia prima para la elaboración de artesanías y textiles en nuestro país (Arroyo-Irigoyen & Teran-Contreras, 2010; de Stefano et al., 2016; Neulinger et al., 2013), algunos órganos como hojas y raíces, también figuran por su empleo en medicina tradicional asiática para el tratamiento de diferentes enfermedades, desde sencillas como una diarrea, hasta complicadas como el asma y hemorroides; inclusive hay quienes afirman su utilidad ante mordeduras de serpiente (Kredy et al., 2010; Berame et al., 2017). Estas propiedades medicinales y manufactureras, han sido foco de interés para

algunos investigadores relacionados con el uso de fibras naturales como posibles refuerzos en los denominados materiales compuestos (Sreenivasan et al., 2011).

Nuestro interés por estudiar ambos cultivares ampliamente contrastantes de *S. trifasciata* fue conducido por las ventajas biológicas que representa el cultivar Hahnii (más pequeño, mayor cantidad de hojas, fibras más finas), características que no habían sido abordadas lo suficiente en trabajos previos de micropropagación o caracterización de fibras (Abdullah et al., 2020; Adeniyi et al., 2020; Hematharshini & Seran, 2017; Kaur, 2021; Kozłowski et al., 2020; Widyasanti et al., 2020; Yusnita et al., 2011). Nuestra decisión tuvo incidencia destacable en nuestros resultados obtenidos tanto en el análisis de fibras como en micropropagación. Los cortes histológicos permitieron determinar el patrón del arreglo de las fibras, destacando a Hahnii como el cultivar con fibras más delgadas. Este hallazgo probablemente fue factor importante durante la optimización del protocolo de regeneración *in vitro*, donde los índices cuantificados revelaron un mejor desempeño en esta variedad de *S. trifasciata*, lo cual fue contradictorio a lo reportado por Yusnita et al., (2011), quienes señalaron una mejor respuesta en el cultivar Lorentii. Estos resultados contrastantes seguramente difieren por la estrategia de recopilación de datos, debido a que nosotros hicimos un análisis más detallado durante todas las fases de micropropagación. Los análisis de distribución de patrones llevados a cabo en este trabajo, pueden ser útil para futuras investigaciones con especies de *Sansevieria*.

Nuestros ensayos de transformación genética fueron severamente complicados por la persistencia de *A. tumefaciens* durante los subcultivos. Sin embargo, el protocolo detallado puede ser optimizado en próximos intentos mediante este sistema de transformación. Teniendo en cuenta los avances en la secuenciación del genoma, la amplia variación genética y fenotípica, y los protocolos desarrollados para un cultivo *in vitro* fácil y rápido, y estos intentos de transformación genética, visualizamos que *S. trifasciata* puede establecerse como un modelo emergente para la genómica funcional de las fibras vegetales y el metabolismo CAM.

## VII. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 7. 1. Conclusiones

- Lorentii y Hahnii son dos cultivares que se distinguen fácilmente a nivel macroscópico por el color, tamaño y disposición de sus hojas. Las variables morfológicas cuantificadas aquí, arrojaron que una planta adulta del cultivar Lorentii tiene en promedio 4.18 hojas que alcanzan fácilmente los 72.55 cm de longitud, son verdes con márgenes bien marcados de tono amarillo claro; mientras que una planta adulta del cultivar Hahnii tiene en promedio 10.96 hojas hasta 4.5 veces más pequeñas comparadas con Lorentii, todas ellas distribuidas en forma de roseta y de tonos verdes más oscuros. Ambos cultivares debido a su metabolismo CAM cuentan con un alto contenido de agua (>92%).
- La disposición de fibras encontradas en ambos cultivares fue diferenciada, a pesar de que ambas mostraron arreglos uniformes de fibras estructurales y de cinta como previamente se ha reportado en otras monocotiledóneas, Lorentii cuenta con fibras mucho más gruesas que Hahnii, en ambos con una distribución en un patrón de vascularización bidimensional característico de especies suculentas.
- El protocolo de micropropagación establecido en este estudio demostró ser eficiente y reproducible para ambos cultivares. Los índices calculados durante las fases del protocolo de organogénesis indirecta a partir de tejido foliar, permitieron cuantificar detalladamente y por primera vez el rendimiento *in vitro* de dos cultivares sumamente contrastantes de *S. trifasciata*, comparado con los índices descritos por otros autores en diferentes especies. Nuestros resultados mostraron una respuesta morfogénica rápida de cultivo *in vitro* y representan ventajas estratégicas en contraste a trabajos previos desarrollados con los mismos cultivares, lo que nos permite optimizar recursos durante su implementación.



- En la fase de inducción de callos ambos cultivares de *S. trifasciata* tuvieron un rendimiento bastante similar después de seis semanas de tratamiento. Nuestro índice de ganancia de peso permite calcular la acumulación de biomasa de callo que producirá cada gramo de tejido foliar. Aquí, nuestros análisis histológicos demostraron que la dediferenciación celular ocurre de forma muy temprana comparado a lo que puede apreciarse a simple vista, este análisis permite evidenciar la ontogenia de los primeros eventos de dediferenciación celular, que consistente con lo reportado previamente en café, se desencadenaron preferentemente en las células que rodean las fibras y los haces vasculares.
- Para la inducción de callos organogénicos y posterior producción de brotes de novo, se usó exclusivamente una fitohormona (BAP) a una dosis mayor a lo previamente reportado. Bajo esta citoquinina *S. trifasciata* fue capaz inclusive de generar enraizamiento y, por ende, plántulas bien desarrolladas en breve tiempo.
- En este estudio establecimos un sistema de regeneración *in vitro* con una especie que puede ser útil para la propagación masiva u otros fines biotecnológicos como la producción de metabolitos secundarios.
- Los primeros análisis de susceptibilidad bajo diversas dosis de dos agentes de selección ampliamente utilizados en protocolos de transformación genética evidenciaron la alta resistencia de *S. trifasciata* a kanamicina, y la alta susceptibilidad a glufosinato de amonio, sobre todo por parte del cultivar Hahnii.
- Los ensayos de transformación genética no fueron exitosos, la dosis empleada de acetosiringona y la estrategia empleada durante la infección, propiciaron un control tedioso y tardado de ambas cepas empleadas, sobre todo de la cepa GV2260 quien destaca por su alta virulencia. Sin embargo, estos primeros intentos de transformación llevados a cabo con callos primarios sientan las bases para futuros intentos empleando el sistema co-cultivo mediado por *Agrobacterium* spp. o mediante otras estrategias como bombardeo de partículas.

## 7. 2. Perspectivas y Recomendaciones

- La metodología analítica llevada a cabo en este trabajo durante el protocolo de micropropagación, podría ser empleado en otras especies monocotiledóneas y de metabolismo CAM, fungiendo como referente para determinar índices que permitan cuantificar su rendimiento en las diferentes fases de cultivo *in vitro*.
- Con la finalidad de sustentar nuestras observaciones relacionadas con la capacidad de enraizamiento y desarrollo contrastante entre plántulas por parte de ambos cultivares de *S. trifasciata*, es necesario obtener índices durante periodos más prolongados del protocolo de micropropagación aquí optimizado.
- Es recomendable continuar realizando ensayos de transformación genética con los explantes determinados en este estudio, variando los tiempos de co-cultivo, y de infección, con la finalidad de evitar un sobrecrecimiento del agente patógeno durante las etapas de resting y selección.
- Considerar la estrategia de bombardeo de partículas como una alternativa de transformación genética, con los mismos vectores de expresión e inclusive con alguno que estratégicamente permita seleccionar posibles eventos de transformación con el agente al que *S. trifasciata* demostró mayor susceptibilidad (glufosinato de amonio).

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

Abiri, R., Atabaki, N., Abdul-Hamid, H., Sanusi, R., Ab Shukor, N. A., Shaharuddin, N. A., ... & Malik, S. (2020). The prospect of physiological events associated with the micropropagation of Eucalyptus sp. *Forests*, 11(11), 1211.

AGARED. (2017). Panorama del aprovechamiento de los agaves en México. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C. Guadalajara, Jalisco, México.

Akram, N. A., Shafiq, F., Ashraf, M., Iqbal, M., & Ahmad, P. (2021). Advances in Salt Tolerance of Some Major Fiber Crops Through Classical and Advanced Biotechnological Tools: A Review. *Journal of Plant Growth Regulation*, 40, 891-905.

Alok, A., Sharma, S., Kumar, J., Verma, S., & Sood, H. (2017). Engineering in plant genome using agrobacterium: progress and future. In *Metabolic engineering for bioactive compounds* (pp. 91-111). Springer, Singapore.

Altpeter, F., Springer, N. M., Bartley, L. E., Blechl, A. E., Brutnell, T. P., Citovsky, V., & Lemaux, P. G. (2016). Advancing crop transformation in the era of genome editing. *The Plant Cell*, 28(7), 1510-1520.

Ali, M., Alabdulkarem, A., Nuhait, A., Al-Salem, K., Almuzaiqer, R., Bayaquob, O., ... & Algfri, Z. (2021). Thermal analyses of loose agave, wheat straw fibers and agave/wheat straw as new hybrid thermal insulating materials for buildings. *Journal of Natural Fibers*, 18(12), 2173-2188.

Anand, A., Bass, S. H., Wu, E., Wang, N., McBride, K. E., Annaluru, N., ... & Jones, T. J. (2018). An improved ternary vector system for Agrobacterium-mediated rapid maize transformation. *Plant molecular biology*, 97(1), 187-200.

Anjanappa, R. B., & Gruissem, W. (2021). Current progress and challenges in crop genetic transformation. *Journal of plant physiology*, 153411.

Arroyo, L. E. & Terán, S. (2010). Cap. 7. Uso de la Flora y Fauna Silvestre: Artesanías y recursos naturales. Biodiversidad y Desarrollo Humano en Yucatán. CICY, PPD-FMAM, CONABIO, SEDUMA. 365-367.

Aycan, M., Oguz, M. C., Ozgen, Y., Onol, B., & Yildiz, M. (2021). Gamma Radiation Effect on Agrobacterium tumefaciens-Mediated Gene Transfer in Potato (*Solanum tuberosum* L.).

Baloglu, M. C., Battal, A., Aydin, G., Eroglu, A., Oz, M. T., Kavas, M.,... & Yucel, M. (2013). Vector Construction Strategies for Transformation of Wheat Plant. *J Anim Plant Sci*, 23(3), 906-912.

- Baldwin, A., & Webb, R. (2016). The Genus *Sansevieria*: An introduction to molecular (DNA) analysis and preliminary insights to intrageneric relationships. *Sansevieria*, 34, 14-26.
- Bhat, V. (2021). Plant regeneration via somatic embryogenesis and direct shoot organogenesis of a C4 bioenergy crop *Pennisetum pedicellatum* Trin. *South African Journal of Botany*, 146, 286-292.
- Bourmaud, A., Beaugrand, J., Shah, D. U., Placet, V., & Baley, C. (2018). Towards the design of high-performance plant fibre composites. *Progress in Materials Science*, 97, 347–408. doi:10.1016/j.pmatsci.2018.05.005
- Buell, C. R., & Voytas, D. (2017). Technology turbocharges functional genomics. *The Plant Cell*, Vol. 29: 1179–1180
- Buffenstein, R., Ruby, J.G. (2021). Opportunities for new insight into aging from the naked mole-rat and other non-traditional models. *Nat Aging* 1, 3–4 <https://doi.org/10.1038/s43587-020-00012-4>
- Butler, A. (1997). *Sansevierias*-a guide part one. *British Cactus & Succulent Journal*, 15(4), 170-174.
- Carlquist, S., & Schneider, E. L. (2007). Origins and nature of vessels in monocotyledons. 9. *Sansevieria*. *South African Journal of Botany*, 73(2), 196-203.
- Carpenter, E. J., Matasci, N., Ayyampalayam, S., Wu, S., Sun, J., Yu, J., ... & Li, L. (2019). Access to RNA-sequencing data from 1,173 plant species: The 1000 Plant transcriptomes initiative (1KP). *GigaScience*, 8(10), giz126.
- Cebrián, J., Martínez, V., Hernández, P., Krimer, D. B., Fernández-Nestosa, M. J., & Schvartzman, J. B. (2021). Two-Dimensional Gel Electrophoresis to Study the Activity of Type IIA Topoisomerases on Plasmid Replication Intermediates. *Biology*, 10(11), 1195.
- Chakraborty N., Chakraborty P., Sen M., Bandopadhyay R. (2020) Choice of Explant for Plant Genetic Transformation. In: Rustgi S., Luo H. (eds) *Biolistic DNA Delivery in Plants*. *Methods in Molecular Biology*, vol 2124. Humana, New York, NY. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0356-7\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0356-7_5).
- Chalifa-Caspi V. (2021) RNA-Seq in Nonmodel Organisms. In: Shomron N. (eds) *Deep Sequencing Data Analysis*. *Methods in Molecular Biology*, vol 2243. Humana, New York, NY. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1103-6\\_8](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1103-6_8)
- Chase, M. W., Christenhusz, M. J. M., Fay, M. F., Byng, J. W., Judd, W. S., Soltis, D. E., ... & Stevens, P. F. (2016). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 181(1), 1-20

Chávez-Ortiz, L. I., Morales-Domínguez, J. F., Rodríguez-Sahagún, A., & Pérez-Molphe-Balch, E. (2021). In Vitro Propagation of *Agave guineola* Gentry Using Semisolid Medium and Temporary Immersion Bioreactors. *Phyton*, 90(3), 1003.

Chege, P., Palágyi, A., Lantos, C., Kiss, E., & Pauk, J. (2020). Improved culture media for embryogenic callus generation in sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. *Phyton*, 89(1), 111.

Chen, S., Kim, D. K., Chase, M. W., & Kim, J. H. (2013). Networks in a large-scale phylogenetic analysis: reconstructing evolutionary history of Asparagales (Lilianaes) based on four plastid genes. *PLoS one*, 8(3), e59472.

Cui, Y., Deng, Y., Zheng, K., Hu, X., Zhu, M., Deng, X., & Xi, R. (2019). An efficient micropropagation protocol for an endangered ornamental tree species (*Magnolia sirindhorniae* Noot. & Chalermglin) and assessment of genetic uniformity through DNA markers. *Scientific reports*, 9(1), 1-10.

de Saeger, J., Park, J., Chung, H. S., Hernalsteens, J. P., Van Lijsebettens, M., Inzé, D., ... & Depuydt, S. (2020). Agrobacterium strains and strain improvement: Present and outlook. *Biotechnology advances*, 107677.

de Stefano, R. D., Cetzal-Ix, W., & Basu, S. K. (2016). *Sansevieria zeylanica* (L.) Willd and Its Potential as a New Natural Source Fiber: A Case Study from the Yucatan Peninsula, Mexico. In *Fiber Plants* (pp. 53-63). Springer, Cham.

Deblaere, R., Bytebier, B., De Greve, H., Deboeck, F., Schell, J., Van Montagu, M., & Leemans, J. (1985). Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for Agrobacterium-mediated gene transfer to plants. *Nucleic acids research*, 13(13), 4777-4788.

Delporte F, Pretova A, Jardin Pd, Watillon B. (2014). Morpho-histology and genotype dependence of in vitro morphogenesis in mature embryo cultures of wheat. *Protoplasma* 251:1455–1470

Dhakal, H. N., Ismail, S. O., Zhang, Z., Barber, A., Welsh, E., Maigret, J. E., & Beaugrand, J. (2018). Development of sustainable biodegradable lignocellulosic hemp fiber/polycaprolactone biocomposites for light weight applications. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*, 113, 350-358.

Dharman, A.K., Anilkumar, M. (2021). Micropropagation through indirect organogenesis in *Solanum capsicoides* All., and assessment of clonal fidelity using ISSR markers. *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant* 57, 481–492. <https://doi.org/10.1007/s11627-020-10145-1>

Dönmez, B. A., Dangol, S. D., & Bakhsh, A. (2019). Transformation efficiency of five Agrobacterium strains in diploid and tetraploid potatoes. *Sarhad Journal of Agriculture*, 35(4), 1344-1350.

Eguiarte, L. E., Jiménez Barrón, O. A., Aguirre-Planter, E., Scheinvar, E., Gámez, N., Gasca-Pineda, J., ... & Souza, V. (2021). Evolutionary ecology of Agave: distribution patterns, phylogeny, and coevolution (an homage to Howard S. Gentry). *American Journal of Botany*, 108(2), 216-235.

Elansary, O.H., Ashfaq, M., Ali, H. M., & Yessoufou, K. (2017). The first initiative of DNA barcoding of ornamental plants from Egypt and potential applications in horticulture industry. *PloS one*, 12(2), e0172170

Fehér, A. (2019). Callus, dedifferentiation, totipotency, somatic embryogenesis: what these terms mean in the era of molecular plant biology?. *Frontiers in plant science*, 10, 536.

Ferrari, S., Serodio Mettifogo, O., Luís Oliveira Cunha, M., dos Santos Cordeiro, L. F., Cidreira Bastos, S. A., Delovo Carara, L. G., & Alves de Oliveira, L. C. (2021). Does the glufosinate-ammonium herbicide have the potential to induce the hormesis effect in upland rice?. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 1-8.

Fraley, R. T., Rogers, S. G., Horsch, R. B., Sanders, P. R., Flick, J. S., Adams, S. P., ... & Woo, S. C. (1983). Expression of bacterial genes in plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 80(15), 4803-4807.

Gao, J., Yang, F., Zhang, S., Li, J., Chen, H., Liu, Q., ... & Yi, K. (2014). Expression of a hevein-like gene in transgenic Agave hybrid No. 11648 enhances tolerance against zebra stripe disease. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 119(3), 579-585.

Gheisari, M. O. N. A., & Miri, S. M. (2017). In vitro callus induction and bulblet regeneration of hyacinth (*Hyacinthus orientalis* L.). *Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology*, 18(3-4), 145-155.

Ghosh, A., Igamberdiev, A. U., & Debnath, S. C. (2021). Tissue culture-induced DNA methylation in crop plants: a review. *Molecular Biology Reports*, 1-19.

Gilman, E. F. (1999). *Sansevieria trifasciata* Hahnii. *Cooperative Extension Service*, 1.

Givnish, T. J., Ames, M., McNeal, J. R., McKain, M. R., Steele, P. R., Depamphilis, C. W., ... & Leebens-Mack, J. H. (2010). Assembling the tree of the monocotyledons: plastome sequence phylogeny and evolution of Poales1. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 97(4), 584-616.

Glantz, S. T., Carpenter, E. J., Melkonian, M., Gardner, K. H., Boyden, E. S., Wong, G. K. S., & Chow, B. Y. (2016). Functional and topological diversity of LOV domain photoreceptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(11), E1442-E1451.

Goldstein, B. & King, N. (2016). The Future of Cell Biology: Emerging model organisms. *Trends Cell Biol.* 26:818-824

Gorshkov, O., Chernova, T., Mokshina, N., Gogoleva, N., Suslov, D., Tkachenko, A., Gorshkova, T., 2019. Intrusive growth of phloem fibers in flax stem: integrated analysis of miRNA and mRNA expression profiles. *Plants* 8 (2). <https://doi.org/10.3390/plants8020047>.

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.

Gueye, B., Morcillo, F., Collin, M., Gargani, D., Overvoorde, P., Aberlenc-Bertossi, F. & Verdeil, J. L (2009). Acquisition of callogenic capacity in date palm leaf tissues in response to 2, 4-D treatment. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. 99(1), 35-45.

Guiglielmoni, N., Houtain, A., Derzelle, A., Van Doninck, K., & Flot, J. F. (2021). Overcoming uncollapsed haplotypes in long-read assemblies of non-model organisms. *BMC bioinformatics*, 22(1), 1-23.

Gutiérrez Aguilar, P., & Gil-Vega, K. J. S. (2016). Desarrollo de metodología para la transformación genética de especies de *Agave* mediada por *Agrobacterium tumefaciens* y basado en el proceso de organogénesis. *Investig Desarro Cienc Tecnol Aliment*, 1, 297-302.

Heck, M., & Neely, B. A. (2020). *Proteomics in non-model organisms: a new analytical frontier*. *Journal of Proteome Research*. doi:10.1021/acs.jproteome.0c00448

Hematharshini, A., & Seran, T. H (2017). In vitro shoot organogenesis of snake plant (*Sansevieria trifasciata* L.) As influenced by sucrose concentration. *International Journal of Advanced Research and Review*. JARR, 2 (12).

Hematharshini, A., & Seran, T. H. (2019). Effect of Leaf Segments and Potting Media on Plant Performance of *Sansevieria trifasciata* Hort. ex Prain Grown under Ex vitro Conditions. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 7(11), 1743-1747.

Herrera-Cool, G. J., Loureiro, J., Rodríguez-Buenfil, I. M., Uc-Vázquez, A., Iglesias-Andreu, L. G. & López-Puc, G. (2019). INDIRECT ORGANOGENESIS AND ESTIMATION OF NUCLEAR DNA CONTENT IN REGENERATED CLONES OF A NON-TOXIC VARIETY OF *Jatropha curcas*. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 22, 451-463.

Herrera-Estrella L, Depicker A, Van Montagu M, Schell J (1983) Expression of chimaeric genes transferred into plant cells using a Ti-plasmid-derived vector. *Nature* 303:209–213

Holme, I. B., Wendt, T., & Holm, P. B. (2013). Intrageneration and cisgenesis as alternatives to transgenic crop development. *Plant Biotechnology Journal*, 11(4), 395-407.

Humara, J. M., Lopez, M., & Ordas, R. J. (1999). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Pinus pinea* L. cotyledons: an assessment of factors influencing the efficiency of uidA gene transfer. *Plant Cell Reports*, 19(1), 51-58.

Hwang, H. H., Yu, M., & Lai, E. M. (2017). *Agrobacterium*-mediated plant transformation: biology and applications. *The Arabidopsis Book*, 15.

Imani, J., & Kogel, K. H. (2020). Plant transformation techniques: *Agrobacterium*-and microparticle-mediated gene transfer in cereal plants. In *Biolistic DNA Delivery in Plants* (pp. 281-294). Humana, New York, NY.

Ishida, Y., Hiei, Y., & Komari, T. (2007). *Agrobacterium*-mediated transformation of maize. *Nature protocols*, 2(7), 1614-1621.

Kamo, K., Joung, Y.H., Green, H. (2009). Gus expression in *Gladiolus* plants controlled by two *Gladiolus* ubiquitin promoters. *Floriculture and Ornamental Biotechnology*, 3 (2009), pp. 10-14

Kaur, J., & MUDGAL, G. (2021). An Efficient And Quick Protocol For In Vitro Multiplication Of Snake Plant, *Sansevieria Trifasciata* Var. *Laurentii* [Prain].

Kausch, A. P., Nelson-Vasilchik, K., Hague, J., Mookkan, M., Quemada, H., Dellaporta, S., ... & Zhang, Z. J. (2019). Edit at will: Genotype independent plant transformation in the era of advanced genomics and genome editing. *Plant Science*, 281, 186-205.

Keshavareddy, G., Kumar, A. R. V., & Ramu, V. S. (2018). Methods of plant transformation-a review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 7(7), 2656-2668.

Kim, J. H., Kim, D. K., Forest, F., Fay, M. F., & Chase, M. W. (2010). Molecular phylogenetics of *Ruscaceae* sensu lato and related families (*Asparagales*) based on plastid and nuclear DNA sequences. *Annals of Botany*, 106(5), 775-790.

Klümper, W., & Qaim, M. (2014). A meta-analysis of the impacts of genetically modified crops. *PLoS one*, 9(11), e111629.

Koetle, M. J., Finnie, J. F., Balázs, E., & Van Staden, J. (2015). A review on factors affecting the *Agrobacterium*-mediated genetic transformation in ornamental monocotyledonous geophytes. *South African Journal of Botany*, 98, 37-44.



- Kong J, Martin-Ortigosa S, Finer J, Orchard N, Gunadi A, Batts LA, Thakare D, Rush B, Schmitz O, Stuiiver M, Olhoft P and Pacheco-Villalobos D. (2020). Overexpression of the Transcription Factor *GROWTH-REGULATING FACTOR5* Improves Transformation of Dicot and Monocot Species. *Front. Plant Sci.* 11:572319. doi: 10.3389/fpls.2020.572319
- Kozłowski, R. M., Mackiewicz-Talarczyk, M., & Barriga-Bedoya, J. (2020). *New emerging natural fibres and relevant sources of information. Handbook of Natural Fibres, 747–787.* doi:10.1016/b978-0-12-818398-4.00022-0
- Kumar, K., Gambhir, G., Dass, A., Tripathi, A. K., Singh, A., Jha, A. K., ... & Rakshit, S. (2020). Genetically modified crops: current status and future prospects. *Planta*, 251(4), 1-27.
- Levitus, G., Echenique, V., Rubinstein, C., Hopp, E., & Mroginski, L. (2010). Biotechnology and Plant Breeding II. *Biotechnology and Plant Breeding II.*
- Li, S., Bashline, L., Lei, L., & Gu, Y. (2014). Cellulose synthesis and its regulation. *The Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologists*, 12.
- Lin, H. S., Van Der Toorn, C., Raemakers, K. J. J. M., Visser, R. G. F., De Jeu, M. J., & Jacobsen, E. (2000). Development of a plant regeneration system based on friable embryogenic callus in the ornamental *Alstroemeria*. *Plant Cell Reports*, 19(5), 529-534.
- Lin, C. Y., Ku, H. M., Tan, C. W., Yeh, C. D., & Ja, F. J. (2011). Construction of the binary vector with bi-selectable markers for generating marker-free transgenic plants. *Botanical Studies*, 52, 239–248
- Liu Y., Hua ZC., Leng F. (2018) DNA Supercoiling Measurement in Bacteria. In: Drolet M. (eds) DNA Topoisomerases. Methods in Molecular Biology, vol 1703. Humana Press, New York, NY. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7459-7\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7459-7_4)
- Loera-Quezada, M., García-Hernández, E. (2019). Establecimiento *in vitro* e inducción de embriogénesis somática de *S. trifasciata* cv. Hahnii y cv. Lorentii (datos sin publicar).
- Lu, P.L., & Morden, C.W. (2014). Phylogenetic relationships among Dracaenoid genera (Asparagaceae: Nolinoideae) inferred from chloroplast DNA loci. *Systematic Botany*, 39(1), 90-104.
- 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.

- Mancino, A., Marannano, G., & Zuccarello, B. (2018). Implementation of eco-sustainable biocomposite materials reinforced by optimized agave fibers. *Procedia Structural Integrity*, 8, 526-538.
- Manian, A.P., Cordin, M. & Pham, T. (2021). Extraction of cellulose fibers from flax and hemp: a review. *Cellulose* **28**, 8275–8294 <https://doi.org/10.1007/s10570-021-04051-x>
- Marcotrigiano, M., & Morgan, P. A. (1988). Chlorophyll-deficient cell lines which are genetically uncharacterized can be inappropriate for use as phenotypic markers in developmental studies. *American journal of botany*, 75(7), 985-989.
- Martin, C. E., Herppich, W. B., Roscher, Y., & Burkart, M. (2019). Relationships between leaf succulence and Crassulacean acid metabolism in the genus *Sansevieria* (Asparagaceae). *Flora*, 261, 151489.
- Maulida, D., Erfa, L., Sesanti, R.N., Hidayat, H. (2020). Induction of kopyor coconut embryogenic callus using 2.4-D and TDZ. IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science 411, 012013. doi:10.1088/1755-1315/411/1/012013
- Maulidiya, A.U.K., Sugiharto, B., Dewanti, P. *et al.* Expression of somatic embryogenesis-related genes in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). *J. Crop Sci. Biotechnol.* **23**, 207–214 (2020). <https://doi.org/10.1007/s12892-020-00024-x>
- Mikami M, Toki S, Endo M (2015) Comparison of CRISPR/Cas9 expression constructs for efficient targeted mutagenesis in rice. *Plant Mol Biol* 88:561–572
- Mohnen, D. (2008). Pectin structure and biosynthesis. *Current opinion in plant biology*, 11(3), 266-277.
- Mokshina, N., Gorshkov, O., Galinousky, D., & Gorshkova, T. (2020). Genes with bast fiber-specific expression in flax plants-Molecular keys for targeted fiber crop improvement. *Industrial Crops and Products*, 152, 112549.
- Monja-Mio, K.M., Herrera-Alamillo, M.A., Sánchez-Teyer, L.F. & Robert, M.L. (2019). Breeding Strategies to Improve Production of Agave (*Agave* spp.). *Advances in Plant Breeding Strategies: Industrial and Food Crops*, 6, 319.
- Moyo, M., Bairu, M.W., Amoo, S.O., van Staden, J. (2011). Plant biotechnology in South Africa: micropropagation research endeavours, prospects and challenges *South African Journal of Botany*, 77 (2011), pp. 996-1011
- Murthy, M., & Ram, J. L. (2015). Invertebrates as model organisms for research on aging biology. *Invertebrate Reproduction & Development*. Vol. 59, No. S1, 1–4

Nalouisi, A. M., Hatamzadeh, A., Azadi, P., Mohsenpour, M., & Lahiji, H. S. (2019). A procedure for indirect shoot organogenesis of *Polianthes tuberosa* L. and analysis of genetic stability using ISSR markers in regenerated plants. *Scientia horticultrae*, 244, 315-321.

Neulinger, K., Vogl, C. R., & Alayón-Gamboa, J. A. (2013). Plant Species and Their Uses In Homegardens of Migrant Maya and *Mestizo* Smallholder Farmers In Calakmul, Campeche, Mexico. *Journal of Ethnobiology* 33(1), 105-124. <https://doi.org/10.2993/0278-0771-33.1.105>

Nonaka, S., Someya, T., Kadota, Y., Nakamura, K., & Ezura, H. (2019). Super-Agrobacterium ver. 4: improving the transformation frequencies and genetic engineering possibilities for crop plants. *Frontiers in plant science*, 10, 1204.

Ntui, V. O., Azadi, P., Supaporn, H., & Mii, M. (2010). Plant regeneration from stem segment-derived friable callus of “Fonio”( *Digitaria exilis* (L.) Stapf.). *Scientia horticultrae*, 125(3), 494-499.

Omer, R. A., Suliman, S., & Beshir, M. M. (2021). Regeneration of Sorghum through Tissue Culture Techniques. *International Journal of Genetic Engineering*, 9(1): 16-20 DOI: 10.5923/j.ijge.20210901.03

Pantano, A., & Zuccarello, B. (2018). Numerical model for the characterization of biocomposites reinforced by sisal fibres. *Procedia Structural Integrity*, 8, 517-525.

Pathirana, C., Attanayake, U., Dissanayake, U., Gamlath, L., Ketipearachchi, K., Madhujith, T., & Eeswara, J. (2020). Establishment of a Micropropagation Protocol for Elite Accessions of Bael (*Aegle marmelos* (L.) Corr.), a Tropical Hardwood Species. *Advances in Agriculture*, 2020.

Pérez-León, G., Chavarría-Pérez, L., Araya-Quesada, J., & Gómez-Alpízar, L. (2013). Identification of the agent causing anthracnose on *Sansevieria* spp., in Costa Rica. *Agronomía Costarricense*, 37(1), 39-50.

Qadir, J., Singh, S. y Kaloo, ZA (2017). Una revisión sobre la propagación in vitro de algunas especies de plantas medicinales importantes de la familia Asparagaceae. *Revista Internacional de Biociencias y Tecnología* , 10 (1).

Ramkumar T.R., Lenka S.K., Arya S.S., Bansal K.C. (2020) A Short History and Perspectives on Plant Genetic Transformation. In: Rustgi S., Luo H. (eds) *Biostic DNA Delivery in Plants*. *Methods in Molecular Biology*, vol 2124. Humana, New York, NY. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0356-7\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0356-7_3)

Ravanfar, S. A., Orbovic, V., Moradpour, M., Abdul Aziz, M., Karan, R., Wallace, S., & Parajuli, S. (2017). Improvement of tissue culture, genetic transformation, and

applications of biotechnology to Brassica. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 33(1), 1-25.

Ramírez-Mosqueda, M. A., & Iglesias-Andreu, L. G. (2015). Indirect organogenesis and assessment of somaclonal variation in plantlets of *Vanilla planifolia* Jacks. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 123(3), 657-664.

Raya, F. T., Marone, M. P., Carvalho, L. M., Rabelo, S. C., de Paula, M. S., Campanari, M. F. Z., ... & Pereira, G. A. G. (2021). Extreme physiology: Biomass and transcriptional profiling of three abandoned *Agave* cultivars. *Industrial Crops and Products*, 172, 114043.

Rêgo, M. D. C. A., LOPES, A. C. D. A., BARROS, R. F. M. D., Lamas, A. M., Costa, M. F., & Ferreira-Gomes, R. L. (2020). MORPHOLOGICAL CHARACTERIZATION AND GENETIC DIVERSITY IN ORNAMENTAL SPECIMENS OF THE GENUS *SANSEVIERIA*. *Revista Caatinga*, 33, 985-992.

Rembet, R. (2016). ANALISIS SEKUENS Gen matK *Sansevieria trifasciata* var. *Laurentii* DAN var. *Hahnii*. *PHARMACON*, 5(2)

Rodríguez-Alonso, G. & Shishkova, S. (2019). Estudio del transcriptoma mediante RNA-seq con énfasis en las especies vegetales no modelo. *Revista de Educación Bioquímica*, 37 (3), 75-88.

Rwawiire, S., & Tomkova, B. (2015). Morphological, thermal, and mechanical characterization of *Sansevieria trifasciata* fibers. *Journal of Natural Fibers*, 12(3), 201-210.

Sanchez, M. L., Patiño, W., & Cardenas, J. (2020). Physical-mechanical properties of bamboo fibers-reinforced biocomposites: Influence of surface treatment of fibers. *Journal of Building Engineering*, 28, 101058.

Sandhu, A. P. S., Randhawa, G. S., & Dhugga, K. S. (2009). Plant cell wall matrix polysaccharide biosynthesis. *Molecular Plant*, 2(5), 840-850.

Sarmast, M. K., Salehi, M., & Salehi, H. (2009). The potential of different parts of *Sansevieria trifasciata* L. leaf for meristemoids production. *Aust J Basic Appl Sci*, 3, 2506-2509.

Scheller, H. V., & Ulvskov, P. (2010). Hemicelluloses. *Annual review of plant biology*, 61, 263-289.

Scotton, D. C., Benedito, V. A., de Molfetta, J. B., Rodrigues, B. I. F., Tulmann-Neto, A., & Figueira, A. (2013). Response of root explants to in vitro cultivation of marketable garlic cultivars. *Horticultura Brasileira*, 31(1), 80-85.

Sharry, S. E., Adema, M., & Abedini, W. (2015). *Plantas de probeta*. Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP).

Shuja, M. (2021). Kanamycin in Cereal Biotechnology: A Screening or a Selectable Marker?. *BioScientific Review*, 3(1), 01-05.

Singh, P. R., & Singh, L. J. (2021). In vitro propagation for improvement of medicinal plants: A review. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 10(1), 1484-1489.

Smrek, J., Garamella, J., Robertson-Anderson, R., & Michieletto, D. (2021). Topological tuning of DNA mobility in entangled solutions of supercoiled plasmids. *Science Advances*, 7(20), eabf9260.

Soumare A, Diédhiou AG, Arora NK, Al-Ani LKT, Ngom M, Fall S, Hafidi M, Ouhdouch Y, Kouisni L and Sy MO. (2021). Potential Role and Utilization of Plant Growth Promoting Microbes in Plant Tissue Culture. *Front. Microbiol.* 12:649878. doi: 10.3389/fmicb.2021.649878

Steele, P. R., Hertweck, K. L., Mayfield, D., McKain, M. R., Leebens-Mack, J., & Pires, J. C. (2012). Quality and quantity of data recovered from massively parallel sequencing: examples in Asparagales and Poaceae. *American Journal of Botany*, 99(2), 330-348.

Stewart, J. R. 2015. *Agave* as a model CAM crop system for a warming and drying world. *Frontiers in Plant Science* 6: 684.

Takano, H. K., & Dayan, F. E. (2020). Glufosinate-ammonium: a review of the current state of knowledge. *Pest Management Science*, 76(12), 3911-3925.

Takawira-Nyanya, R., Mucina, L., Cardinal-McTeague, W. M., & Thiele, K. R. (2018). Sansevieria (Asparagaceae, Nolinoideae) is a herbaceous clade within Dracaena: inference from non-coding plastid and nuclear DNA sequence data. *Phytotaxa*, 376(6), 254-276.

Takawira, R., & Nordal, I. (2001). The genus Sansevieria (family Dracaenaceae) in Zimbabwe. In *XX International Eucarpia Symposium, Section Ornamentals, Strategies for New Ornamentals-Part II* 572 (pp. 189-198).

Tallei, T. E., Rembet, R. E., Pelealu, J. J., & Kolondam, B. J. (2016). Sequence variation and phylogenetic analysis of Sansevieria trifasciata (Asparagaceae). *Bioscience Research*, 13(1), 01-07.

Thu, Z. M., Oo, S. M., Nwe, T. M., Aung, H. T., Armijos, C., Hussain, F. H., & Vidari, G. (2021). Structures and Bioactivities of Steroidal Saponins Isolated from the Genera Dracaena and Sansevieria. *Molecules*, 26(7), 1916.

- Traore, S. M., & Zhao, B. (2011). A novel Gateway®-compatible binary vector allows direct selection of recombinant clones in *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant methods*, 7(1), 42.
- van Kleinwee, I., Larridon, I., Shah, T., Bauters, K., Asselman, P., Goetghebeur, P., ... & Veltjen, E. (2021). Plastid phylogenomics of the *Sansevieria* clade (Dracaena; Asparagaceae) resolves a rapid evolutionary radiation. *bioRxiv*.
- Vincent, L., & Anushma, P. L. (2018). Micropropagation in banana using inflorescence: A review.
- Wahyuningsih, T., Sulistiana, P., & Hapsoro, D. (2013). In Vitro Propagation of *Sansevieria trifasciata* 'Lorentii': Shoot Regeneration, Rooting, and Plantlet Acclimatization. *J. Agron. Indonesia* 41, 70(1).
- Wen, S. S., Chen, L., & Tian, R. N. (2020). Micropropagation of tree peony (*Paeonia* sect. *Moutan*): A review. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 141(1), 1-14.
- Widyasanti, A., Napitupulu, L. O. B., & Thoriq, A. (2020, March). Physical and mechanical properties of natural fiber from *Sansevieria trifasciata* and *Agave sisalana*. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 462, No. 1, p. 012032). IOP Publishing.
- Wolela, A. D. (2019). Extraction and Characterization of Natural Cellulose Fibers from *Sansevieria Trifasciata* Plant. *Advancem. Bioequ. Bioavailab*, 5, 630-634.
- Wu, G., Wei, X., Wang, X. *et al.* Changes in biochemistry and histochemical characteristics during somatic embryogenesis in *Ormosia henryi* Prain. *Plant Cell Tiss Organ Cult* **144**, 505–517 (2021). <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01973-5>
- Yang, Z., Qanmber, G., Wang, Z., Yang, Z., & Li, F. (2020). *Gossypium* genomics: trends, scope, and utilization for cotton improvement. *Trends in plant science*, 25(5), 488-500.
- Yu-Zhong (2011). Estudio sobre tecnología para el cultivo de tejidos y la propagación rápida de *Sansevieria trifasciata* L.
- Yue, JJ., Hong, CY., Wei, P. *et al.* How to start your monocot CRISPR/Cas project: plasmid design, efficiency detection, and offspring analysis. *Rice* **13**, 9 (2020). <https://doi.org/10.1186/s12284-019-0354-2>
- Yusnita, Y., Pungkastiani, W. y Hapsoro, D. (2011). Organogénesis in vitro de dos cultivares de *Sansevieria trifasciata* en diferentes concentraciones de benciladenina (BA). *AGRIVITA, Journal of Agricultural Science*, 33 (2), 147-153.

Zhang, X., Tang, Q., Wang, X., & Wang, Z. (2016). Structure of exogenous gene integration and event-specific detection in the glyphosate-tolerant transgenic cotton line BG2-7. *PloS one*, 11(7).

Zhang, N., Deyholos, M.K. (2016). RNA-Seq analysis of the shoot apex of flax (*Linum usitatissimum*) to identify phloem fiber specification genes. *Front. Plant Sci.* 7, 950. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00950>