

Tipo de manuscrito: artículo científico

## INDUCCIÓN DE POLIPLOIDÍA EN PLANTAS DE *Agave marmorata* Roezl MEDIANTE EL USO DE COLCHICINA, COMO ESTRATEGIA DE MEJORAMIENTO GENÉTICO

Juneé Alejandra Osorio-German, Amaury Martín Arzate-Fernández \*

Universidad Autónoma del Estado de México, Facultad de Ciencias Agrícolas, Km 11.5 Carretera Toluca-Ixtlahuaca, SN, Cerrillo Piedras Blancas, 25777 hab, Toluca, Estado de México, México, C.P. 50200.

\*Autor para correspondencia: amaury1963@yahoo.com.mx

### RESUMEN

En México, los agaves son de importancia económica y cultural, se han utilizado como materia prima. Actualmente la demanda principal en la producción de agave se ha centrado en la elaboración de bebidas alcohólicas, siendo las de mayor importancia el tequila y el mezcal. Entre las especies utilizadas para la elaboración del mezcal, está el “Agave Tepeztate” (*Agave marmorata* Roezl), desafortunadamente su uso no está regulado lo que la hace susceptible a la extinción.

En consecuencia, se han buscado distintos métodos de mejoramiento genético y de propagación que resulten eficientes. Por ejemplo, los fitomejoradores han empleado la inducción artificial de poliploides como método de mejoramiento genético, debido a que permite una mayor comodidad en el manejo de material vegetal, obtención de resultados en menor período de tiempo, y con ello aumentar la disponibilidad del germoplasma.

Martínez-Velasco et al. (2020) desarrollaron un protocolo de propagación como método de conservación de *A. marmorata* Roezl, el cual sirvió de base para la obtención de las plántulas utilizadas en el presente trabajo de investigación, estas fueron sometidas a tratamientos con distintas concentraciones (0.05 %, 0.10 % y 0.15 %) de colchicina Sigma- Aldrich, con el objetivo de evaluar su efecto como agente mitostático y promover variación en la ploidía, posteriormente se realizó un conteo cromosómico a través de microscopía para determinar si el número de cromosomas se vio afectado. Como resultado de la investigación se observó que la poliploidización de esta especie fue posible al aplicar una concentración de 0.15 % de colchicina, con un tiempo de inmersión de 24 h. Con base en los resultados obtenidos se puede concluir que el tiempo de exposición al agente y la concentración del mismo es un factor fundamental para la poliploidización. En todos los tratamientos a 48 h de exposición se observó necrosis en los tejidos de los explantes cultivados *in vitro*.

**Palabras clave:** *Agave marmorata*, métodos de propagación, mejoramiento genético, técnicas biotecnológicas, inducción artificial de poliploides, colchicina.

### INTRODUCCIÓN

Los *Agaves* son especies de América siendo México su centro de origen, son plantas de ambientes semiáridos pertenecientes al género de la familia *Agavaceae* (García-Mendoza, 2002). En México, los agaves son de importancia económica y cultural para numerosos pueblos indígenas que los han aprovechado durante siglos como materia prima para la elaboración de alimentos, bebidas, fibras, etc.

Actualmente la demanda principal en torno a la explotación de agave se ha centrado en la elaboración de bebidas alcohólicas, siendo las especies mezcaleras y tequileras las de mayor importancia económica para el país (Rivera, 2017).

1 Entre las especies utilizadas para la elaboración del mezcal está el “Agave Tepeztate” (*Agave marmorata* Roehl) la cuál es  
2 una especie silvestre endémica, que se propaga a través de semillas e hijuelos, sin embargo, la reproducción de este  
3 agave se ve limitada debido a diferentes factores como la falta de polinizadores, el bajo porcentaje de viabilidad en la  
4 semilla, entre otros (Illsey, 2005). La demanda de materia prima ha provocado la disminución de poblaciones de ésta  
5 especie (SEMARNAT, 2010), lo cual pone su existencia en peligro de extinción.

6 En consecuencia, se han buscado distintos métodos de mejoramiento genético y propagación que resulten eficientes, a  
7 pesar de ello es poca la información reportada en el mejoramiento genético del *Agave*. En África Oriental (Amaní,  
8 Tanzania) desde el año 1931 se estableció un programa para el desarrollo de agaves fuertes y resistentes para la  
9 producción de fibras (Aguirre Rivera, 2017). Por otra parte, de 1993 a 2006 en el Instituto de Investigaciones Hortícolas  
10 Liliana Dimitrova ubicada en La Habana, Cuba se realizaron investigaciones de mejoramiento para producción de fibras  
11 (Vincent-Serrano y Fajardo-Gutiérrez, 2009).

12 Hoy en día los últimos trabajos reportados están relacionados con el empleo de técnicas biotecnológicas tales como, la  
13 transformación genética de *A. salmiana* mediante el uso de: *Agrobacterium tumefaciens* y bombardeo de partículas. La  
14 transformación fue detectada positivamente por medio de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Gutierrez Aguilar  
15 *et al.* 2007). Ruvalcaba *et al.* (2011) reportaron la producción de plantas trisómicas ( $2n+1$ ) de *A. tequilana* mediante la  
16 adición de diversas concentraciones de para-fluorofenilalanina al medio de cultivo, obteniendo resultados al utilizar de  
17 8 a 12 mg L<sup>-1</sup> PFP. Huijara *et al.* (2015) realizaron un trabajo de investigación para la inducción de poliploidía en  
18 *A. angustifolia* y *A. tequilana* haciendo uso de la orizalina como agente mitostático, reportando anomalías en la  
19 morfología de los explantes, y en los brotes. A partir de la década de 1940, los fitomejoradores han empleado la inducción  
20 artificial de poliploides como método de mejoramiento genético (Escandón, 2005). El empleo de agentes mitostáticos  
21 para inducir poliploidía, permite una mayor comodidad en el manejo de material vegetal, la obtención de resultados en  
22 menor período de tiempo, y con ello aumentar la disponibilidad del germoplasma.

23 La poliploidía es un fenómeno natural que ocurre con frecuencia en las plantas, se le considera un mecanismo funda-  
24 mental en la evolución de las especies; este fenómeno ha contribuido a la aparición de novedades evolutivas tanto mor-  
25 fológicas, genéticas y fisiológicas, lo que ha permitido aumentar la capacidad competitiva, el éxito reproductivo y/o la  
26 tolerancia ecológica respecto a sus progenitores (Molero-Paredes 2018).

27 La poliploidía también puede ser inducida de manera artificial, es un procedimiento que le brinda al fitomejorador la  
28 oportunidad de modificar una planta alterando el número de cromosomas y, en consecuencia, la proporción de genes  
29 alélicos que contribuyen al apareamiento de caracteres particulares. Sin embargo, los efectos de este tratamiento son  
30 diversos e impredecibles, no siempre obteniendo resultados favorables, lo que requiere un trabajo arduo y minucioso  
31 para estudiar la consecuencia de la duplicación cromosómica en cada especie (Cubero, 2003). Dicho fenómeno puede  
32 inducirse a través de distintos agentes mitostáticos tales como, orizalina y trifluralina que son herbicidas de la clase  
33 dinitroanilinos que se caracterizan por producir fuertes anomalías en las plantas, ya que ambos inhiben de forma  
34 específica el ensamblaje de la tubulina de las células vegetales. Estudios ultraestructurales mostraron que  
35 concentraciones nanomolares de dinitroanilinos, causan la parcial o completa desaparición de los microtúbulos en todos  
36 los sistemas subcelulares (Ashton y Crafts, 1981).

37 Otro agente es Amiprofos metil (APM) pertenece a la clase de herbicidas amida fosfóricos considerados como drogas  
38 antimicrotubulares, debido a que provocan la desaparición de los microtúbulos después de su aplicación, dando como

1 resultado la interrupción de la mitosis. Sree Ramulu *et al.* (1988) observaron en suspensiones celulares de *Nicotiana*  
2 *plumbaginifolia* tratadas con diferentes concentraciones de APM, que los cromosomas de estas células perdían su regular  
3 organización sobre el huso, además también se observó que varias de éstas células mostraban cromosomas dispersos  
4 por todo el citoplasma a lo que se le denominó “metafasas explotadas”.

5 Uno más de los herbicidas que actúan de manera similar es la pronamida, sin embargo éste a diferencia de los anteriores  
6 no produce una pérdida completa de los microtúbulos, sino que provoca un acortamiento de los mismos.

7 La colchicina ha resultado ser un agente más efectivo para la duplicación cromosomal. Es un fármaco antimitótico que  
8 detiene la división celular en metafase o anafase, este es un compuesto que evita la distribución de las cromátidas de un  
9 cromosoma durante la mitosis, provocando la poliploidía en la célula filial, ya que no existe una división celular, pero si  
10 una duplicación previa del material genético (Urwin, 2014). En consecuencia, el número cromosómico aumenta de  
11 diploide a tetraploide, aún cuando todos los cromosomas permanecen dentro de una salud individual (Poehlman, 1965).

12 Martínez-Velasco *et al.* (2020) propusieron un protocolo de propagación como método de conservación de *A. marmorata*,  
13 protocolo empleado para la obtención de las plántulas utilizadas en el presente trabajo de investigación, dichas plántulas  
14 fueron sometidas a tratamientos con distintas concentraciones de colchicina, con el objetivo de evaluar su efecto como  
15 agente mitostático y promover variación en la ploidía de las plántulas, posteriormente se realizó un conteo cromosómico  
16 a través de microscopía, para determinar si el número de cromosomas se vio afectado.

17 Cabe mencionar que previo al experimento se llevó a cabo un conteo cromosómico preliminar en al menos 200 cofias  
18 radiculares, esto para corroborar la ploidía base de esta especie, obteniendo como resultado  $2n=60$ .

## 19 MATERIALES Y MÉTODOS

### 20 Material vegetativo

21 Se emplearon 120 semillas de *A. marmorata*, donadas por el Centro Regional Universitario Sur Oaxaca, Programa  
22 Maguey-Mezcal, de la Universidad Autónoma de Chapingo (UACH). Las cuales fueron germinadas *in vitro*, una vez que  
23 se obtuvieron plántulas se realizó una disección de las hojas para obtener únicamente la zona meristemática (ZM) se  
24 seleccionaron 10 para cada tratamiento, las cuales fueron expuestas a distintas concentraciones de colchicina y distintos  
25 tiempos de exposición (Cuadro 1).

26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33 **Cuadro 1. Tratamientos empleados con colchicina para evaluar su efecto mitostático en ZM de *Agave marmorata***  
34 **Roezl.**

Tratamiento	Concentración de colchicina (%p/v=concentración)	de	Tiempo de exposición (h)	de
CONTROL	0		NA	
T 1	0.05		16	
			24	
			48	
T2	0.10		16	
			24	
			48	
T3	0.15		16	
			24	
			48	

### Desinfección de la semilla

Las semillas fueron colocadas en un saco de malla tul (10 semillas por saco) para ser sumergidas en una solución jabonosa, adicionando tres gotas de tween 20 y se enjuagaron a chorro de agua corriente por 15 minutos para eliminar polvo y grasas, fueron trasladadas a una campana de flujo laminar (CFL) para trabajar en condiciones asépticas, donde las semillas se colocaron en tubos Falcon y se sumergieron en etanol al 70 % durante un minuto, posteriormente se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio al 1 % por 15 minutos en constante agitación, y finalmente se enjuagaron tres veces con agua destilada esterilizada y se dejaron reposar por 24 h a 6 °C.

Las semillas una vez desinfectadas fueron cultivadas 45 días *in vitro* en recipientes de polipropileno de 8.5 x 7.5 cm de diámetro con un volumen de 500 ml, los cuales contenían de 75 ml de medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) al 50 %, con 30 g de sacarosa y 0.5 g de carbón activado. Todos los cultivos se incubaron a 25± con luz led blanca.

Una vez obtenidas las plántulas de *A. marmorata* Roetzl, 20 de ellas fueron utilizadas para el conteo cromosómico preliminar haciendo uso de un microscopio de contraste de fases marca Leica modelo Olympus BX43, esto con el objetivo de corroborar la ploidía de esta especie según lo reportado por Flores- Maya *et al.*, 2015. El tejido meristemático radical fue utilizado para llevar a cabo esta etapa.

1 Al resto de las plantas obtenidas una vez que tenían dos o más hojas, y alcanzaron una altura de 5 cm, se les eliminaron  
2 las hojas y raíces para obtener únicamente la zona meristemática (ZM), las cuales fueron tratadas en cuatro  
3 concentraciones de colchicina Sigma-Aldrich (Testigo, 0.05, 0.10 y 0.15  $g^{-1}$  100 ml), en tres tiempos de inmersión (16,  
4 24 y 48 h), colocando 10 explantes (ZM) en cada uno de los tratamientos. Con el fin de evitar la oxidación o la necrosis  
5 en los tejidos vegetales, se consideró pertinente que las soluciones de colchicina permanecieran en constante agitación a  
6 una velocidad de 120 rpm. Posteriormente todas las ZM fueron sometidas a un proceso de organogénesis directa (OD)  
7 de acuerdo a la metodología propuesta por Martínez-Velazco (2020).

8 Para la OD, las ZM fueron cultivadas en medio MS al 50 %, adicionándole 5m g/L de BA, y 30 g/L Sacarosa, manteniendo  
9 los cultivos en condiciones  $33\mu mol.m^2.s^{-1}$  de luz y fotoperiodo de (16/8 h), incubados a una temperatura de  $25\pm 2$  °C,  
10 transcurridos 60 días se contabilizó en número de brotes de cada explante.

11 Los brotes regenerados fueron separados de la ZM y enraizados en un medio MS al 50 %, 30 g de sacarosa, 0.5 g/L de  
12 carbón activado. Pasados 30 días, las plántulas fueron extraídas del medio de cultivo, se realizó un lavado con agua para  
13 eliminar los restos de agar y para realizar el conteo cromosómico se utilizó la región meristemática de la raíz, cabe  
14 mencionar que se realizaron cerca de 10 observaciones por muestra.

15 Aclimatación. De cada tratamiento se seleccionaron las plántulas de mayor vigor, para posteriormente colocarlas en  
16 charolas, las cuales previamente fueron sumergidas en una solución de fertilizante soluble Hydro-Solution al 25 % y  
17 adicionando enraizador Phyto Raizon Plus (1 g/L), para favorecer la formación de raíces.

### 18 Preparación de cromosomas mitótico

19 Pretratamiento de ápices radicales (detención mitótica). Se recolectaron ápices radiculares jóvenes (entre 2 y 5 cm) en un  
20 horario de 9 a 10 am, los cuales se trataron directamente con el agente mitostático  $\alpha$ -Bromonaftaleno 0.1 %, durante 24  
21 h.

### 22 Fijación

23 Se desechó la solución de detención mitótica y se fijaron las raíces en la solución Farmer (Alcohol: Ácido acético 3:1) por  
24 24 h a temperatura ambiente.

### 25 Hidrólisis

26 Se lavaron los ápices radiculares con agua destilada y se hidrolizaron en una solución de HCl 1 N a 60 °C, durante 8 min.

### 27 Aplastamiento celular

28 El meristemo radicular se transfirió a un portaobjetos limpio, diseccionando el tejido meristemático con la ayuda de un  
29 bisturí.

30 Se removió el exceso de agua con un papel filtro e inmediatamente se agregó una gota aceto-orceína 1 % o de ácido  
31 acético al 45 %. Se colocó un cubreobjetos en la suspensión y se dispersó el tejido golpeando ligeramente con el lado  
32 posterior de una aguja montada. Posteriormente se colocaron algunas capas de papel de filtro sobre el portaobjetos y el  
33 cubreobjetos, presionando hacia abajo, evitando cualquier movimiento horizontal dejando las células en un solo plano.  
34 Las preparaciones fueron observadas bajo los objetivos 10x, 40x y 100x en un microscopio de marca Leica modelo  
35 Olympus BX43 de contraste de fases.

1 Al finalizar la observación de las laminillas e identificar células en metafase se congeló el portaobjetos en N<sub>2</sub> líquido,  
2 retirando el cubreobjetos con una hoja de afeitar posteriormente se enjuagó durante 5 min en etanol al 100 % dejando  
3 secar la muestra (García-Velázquez, 1990).

## 4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5 El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo generar cambios en el número cromosómico en plantas de *A.*  
6 *marmorata* (Cuadro 2). Diferentes autores han reportado, que tanto la dosis de colchicina como el tiempo de exposición  
7 a este agente mitostático son factores imprescindibles para la inducción de poliploides, algunos ejemplos son *Aloe Vera*  
8 (Molero-Paredes, T., 2008) donde se logró observar que a una concentración de 0.15 % por 48 h las plantas tratadas  
9 mostraron tejido quimérico con un alto predominio de células poliploides, en *Gerbera jamesonii* Bolus cv. A Sciella a una  
10 concentración de colchicina al 0.1 % durante 8 h, el 64 % de las plántulas recuperadas resultaron ser tetraploides (Gantait  
11 *et al.*, 2011), para *Gymnostachyum Zeylanicum* el tratamiento con una concentración de 0.08 % fue la que produjo mejores  
12 resultados con base en el tamaño de los órganos (Khaing *et al.*, 2007), en el caso de *Orchid Dendrobium nobile* se reveló que  
13 la colchicina al 0.10 % durante 4 días es la adecuada para generar cambios en la ploidía de esta especie (Vichiato *et al.*,  
14 2014), en *Nicotiana alata* se realizó una comparación entre plantas diploides y tetraploides donde se determinó que el  
15 tratamiento con colchicina produjo más floración con diferencias significativas en el tamaño del estigma en el tabaco,  
16 aumentó el número de pétalos y aumentó el diámetro de la flor (El-Morsy *et al.*, 2009), para el cultivo de *Saintpaulia*  
17 *ionantha* se reportó que una concentración de colchicina al 0.06 % y un tiempo de inmersión de 22.5 h, la variedad produjo  
18 flores blancas con márgenes morados (5 % de 45 plantas), 7 días después de la floración, todos los pétalos de las flores  
19 cambiaron gradualmente a color púrpura. Por lo tanto, se produjo un patrón de color de flor dinámico desde pétalos  
20 blancos con margen morado hasta pétalos morados completos, esto se observó durante seis generaciones (Seneviratne  
21 and Wijesundra, 2007). Por otra parte, el efecto de la colchicina con mayor porcentaje de inducción tetraploide (35.6 %)  
22 sobre el crecimiento de los explantes de *Dioscorea zingiberensis* ocurrió en el tratamiento de 36 h con colchicina al 0.2 %  
23 (Chen *et al.*, 2010). Con base en los resultados obtenidos en esta investigación pudimos rectificar que en efecto la relación  
24 entre la concentración de colchicina y el tiempo de inmersión es un factor fundamental para lograr la poliploidía ya que  
25 a medida que el porcentaje de concentración de colchicina aumentó del 0.05 % al 0.15 %, fue posible observar que el  
26 tamaño de los organos vegetales aumentaron considerablemente su tamaño en comparación con las plántulas testigo,  
27 pero a medida que el tiempo de exposición al reactivo incrementaba la supervivencia de los explantes disminuía.  
28 Respecto a lo observado en el presente trabajo, el mejor tratamiento para obtener plantas tetraploides de *A. marmorata*  
29 fue el de 0.15 % a 24 h de exposición, debido a que con esta concentración y tiempo de inmersión se obtuvo el mayor  
30 porcentaje de sobrevivencia (60 %) y también se observó una mayor respuesta con respecto al número de brotes  
31 regenerados que superó a todos los demás tratamientos.

32

33

34

35

36

37

1 **Cuadro 2. Tratamientos de colchicina aplicados a plántulas de *A. marmorata* Roehl.**

Tratamiento	Tiempo de exposición (h)	Germinación (%)	Plántulas (%)	Explantes que respondieron (%)	No. de brotes por explante	No. de brotes regenerados después del tratamiento
T0	-----	100 %	100 %	100 %	1	4
T1 (0.05 %)	16	100 %	50 %	100 %	1	1
	24	100 %	30 %	100 %	1	2
	48	100 %	0 %	0 %	0	0
T2 (0.10 %)	16	100 %	40 %	100 %	1	2
	24	100 %	30 %	100 %	1	2
	48	100 %	0	0 %	0	0
T3 (0.15 %)	16	100 %	20 %	100 %	2	2
	24	100 %	60 %	100 %	2	6
	48	100 %	0 %	0 %	0	0

2

**Efecto mitostático de la colchicina**

3

4

5

6

7

8

9

Como se observa en el Cuadro 2, el T3 a 24 h (0.15 % de colchicina) fue el tratamiento con los mejores parámetros de brotación por explante (2), además de que hubo mayor porcentaje de sobrevivencia en los mismos (6). El T3 a 16 h de exposición resultó ser el de menor eficiencia ya que tanto el porcentaje de supervivencia después del tratamiento, el No. de brotes por explante, y el No. de brotes sobrevivientes fueron los de menor respuesta en comparación a los otros tratamientos, sin embargo también se puede observar que en ninguno de los tratamientos que estuvieron expuestos a 48 h se lograron obtener resultados, esto podría deberse a que el tiempo de exposición fue demasiado extenso lo que resulta nocivo para las plantas de *A. marmorata* ya que se observó necrosis en el tejido meristemático.

10

**Análisis cromosómico**

11

12

13

14

15

Al realizar el conteo cromosómico preliminar  $2n=60$  (Figura 1) y en comparación al conteo cromosómico final ( $2n=4x=120$ ) se logró observar que la colchicina afectó el número de cromosomas presentes en las células (Figura 2).

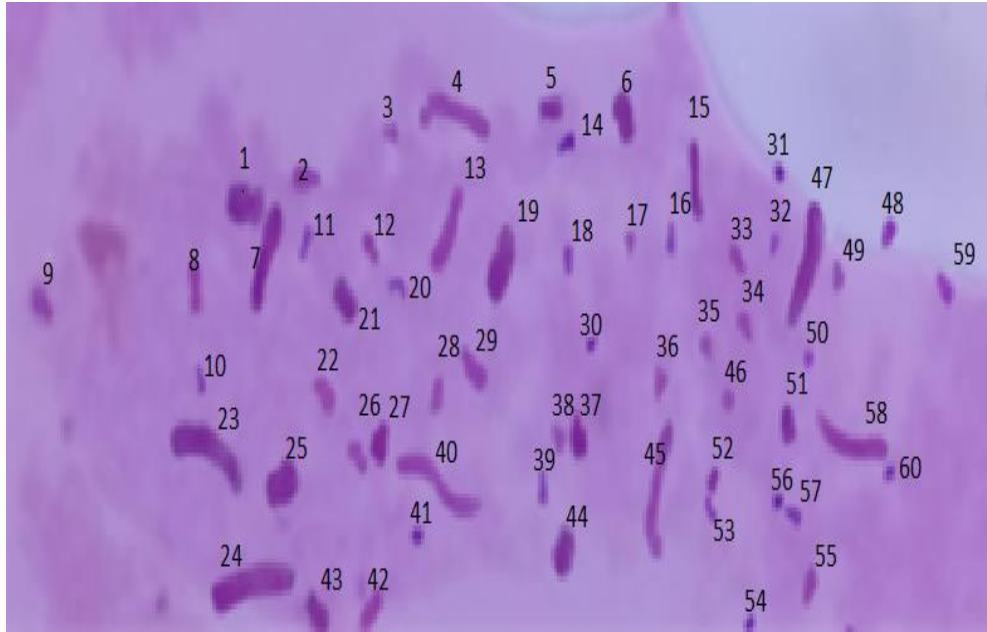


Figura 1. Número de cromosomas observado en *A. marmorata*, individuo diploide  $2n=60$ , por medio de un microscopio de contraste de fases, utilizando el objetivo 100X.

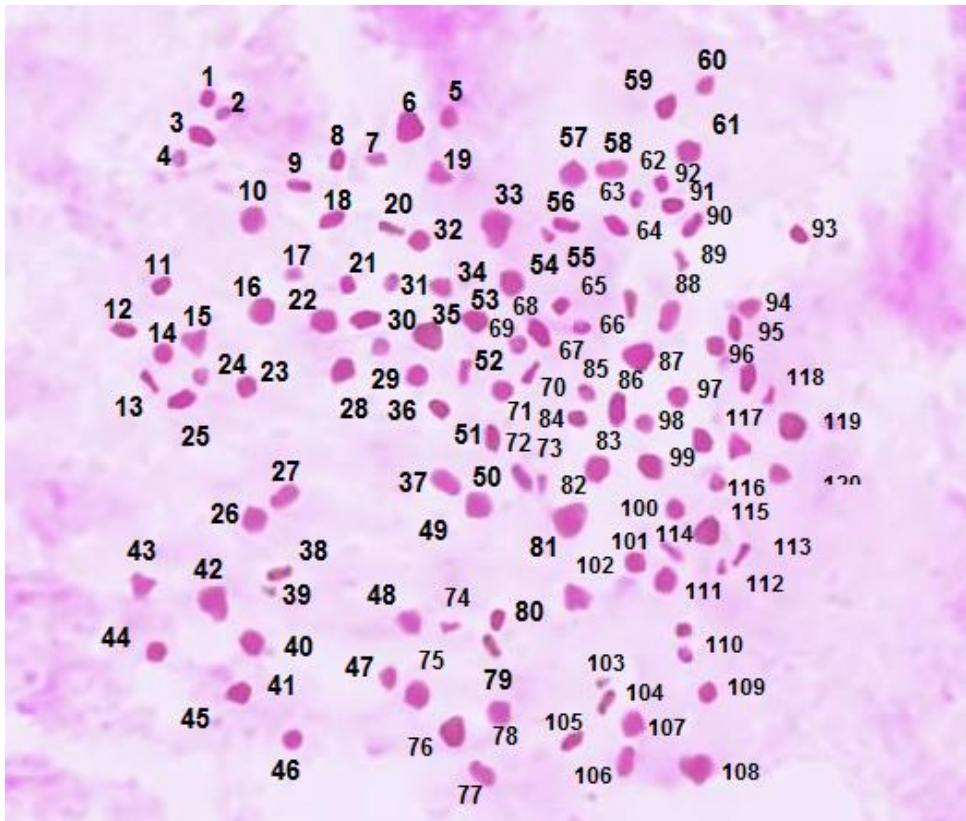


Figura 2. Número de cromosomas ( $2n=120$ ) observados con el objetivo 100X en plantas de *A. marmorata* Roezl previamente tratadas con colchicina (0.15 % y 24 h)

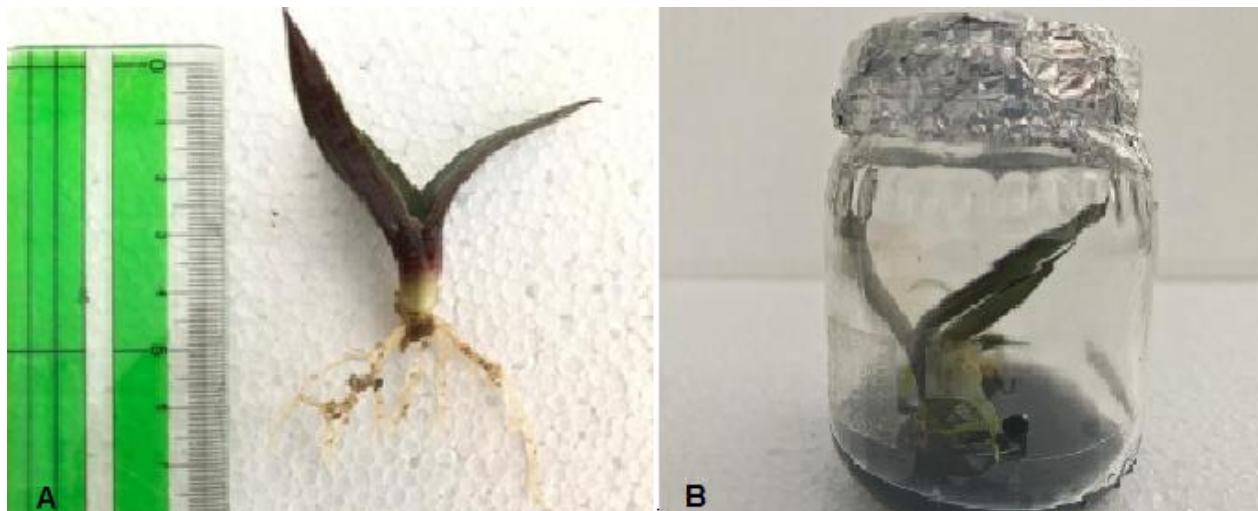
12  
13  
14

31  
32  
33  
34  
35



### 1 **Análisis morfológico de plántulas regeneradas de *Agave marmorata* Roezl**

2 Como resultado de la observación a los 45 días de adaptación en invernadero, se logró hacer la comparación de  
3 características morfológicas entre plantas diploides (Figura 3. A y B) y tetraploides (Figura 4. C y D).



4  
5 **Figura 3.** A: Plántula diploide regenerada y adaptada en invernadero a los 45 días, B: Plántula  
6 diploide regenerada y cultivada *in vitro* a los 45 días.



7  
8 **Figura 4.** C: Plántula tetraploide regenerada y adaptada en invernadero a los 45 días, D: Plántula  
9 tetraploide regenerada y cultivada *in vitro* a los 45 días.

10  
11 Las plántulas tetraploides presentaron mayor cantidad de hojas (5) en comparación con las diploides (3), además las  
12 hojas de las plántulas tetraploides se observan con mayor vigor en comparación con las plántulas testigo.

1 Las plantas tratadas en colchicina (T3 a 24 h) presentaron un desarrollo radicular mayor al de las plantas testigo como  
2 se puede observar en las figuras A y C.

### 3 CONCLUSIONES

4 Con base en los resultados obtenidos se puede concluir que el efecto de la colchicina como agente mitostático para el  
5 cultivo de *A. marmorata* resultó ser efectivo, sin embargo consideramos importante seguir realizando investigaciones que  
6 puedan ayudarnos a determinar si la poliploidía generada en estas plántulas es capaz de permanecer en las siguientes  
7 generaciones. También es interesante analizar que todos los tratamientos expuestos a 48 h resultaron ser nocivos para  
8 las plántulas ya que se observó necrosis en el tejido obteniendo el 0 % de supervivencia para todos los tratamientos  
9 expuestos a las 48 h, lo que corrobora los efectos de este agente con base en la literatura citada.

### 10 REFERENCIAS

11 Aguirre Rivera, J. R. (2017, 15 agosto). Panorama Del Aprovechamiento De Los Agaves En México- ID:5d1bbf233caa9.  
12 <https://Baixardoc.Com/Documents/Panorama-Del-Aprovechamiento-de-Los-Agaves-En--5d1bbf233caa9>.

13 Recuperado 22 de noviembre de 2020 de [https://baixardoc.com/documents/panorama-del-aprovechamiento-de-los-](https://baixardoc.com/documents/panorama-del-aprovechamiento-de-los-agaves-en--5d1bbf233caa9)  
14 [agaves-en--5d1bbf233caa9](https://baixardoc.com/documents/panorama-del-aprovechamiento-de-los-agaves-en--5d1bbf233caa9)

15 Ashton, F. M. y Crafts, A. S. (1981). Dinitroanilines. pp: 180-223. En: Ashton, F. M. y Crafts, A. S. (Eds.). *Mode of Action of*  
16 *Herbicides*. New York.

17 Chen, L. L., Wei, K. H., & Huang, H. P. (2010). *In vitro* tetraploid induction and generation of tetraploids from mixoploids  
18 in *Dioscorea zingiberensis*. *Pharmacognosy Magazine*, 6(21), 51. <https://doi.org/10.4103/0973-1296.59966>.

19 Cubero, J., I. (2003). Introducción a la Mejora Genética Vegetal (2.ª ed.). Mundi-Prensa. Madrid, España. ISBN: 978-84-  
20 8476-655-1 . [https://catoute.unileon.es/discovery/fulldisplay/alma991002071889705772/34BUC\\_ULE:VU1](https://catoute.unileon.es/discovery/fulldisplay/alma991002071889705772/34BUC_ULE:VU1)

21 El-Morsy, Sh. I. et al. (2009). Comparative studies on diploid and tetraploid levels of *Nicotiana glauca*. *Academic Journal*  
22 *of Plant Sciences*, v. 02, n. 03, p.182-188. [https://www.idosi.org/ajps/2\(3\)09/11.pdf](https://www.idosi.org/ajps/2(3)09/11.pdf)

23 Escandon, A. S., Hagiwara, J. C., & Alderete, L. M. (2006). A new variety of *Bacopa monnieri* obtained by *in vitro*  
24 polyploidization. *Electronic Journal of Biotechnology*, 9(3), 0. <https://doi.org/10.2225/vol9-issue3-fulltext-8>

25 Flores-Maya, S., Vargas-Jurado, M. N., Suárez-Mota, M. E. & Barrera-Escorcia, H. (2015, 1 julio). Análisis cariotípico de  
26 *Agave marmorata* y *A. peacockii* (Agavaceae) ubicados en las terrazas aluviales del río Zapotitlán, Puebla, México.  
27 *Polibotánica*, 0(40). <https://doi.org/10.18387/polibotanica.40.7>

28 Gantait, S., Mandal, N., Bhattacharyya, S., & Das, P. K. (2011, 10 abril). Induction and identification of tetraploids using  
29 *in vitro* colchicine treatment of *Gerbera jamesonii* Bolus cv. Sciella. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 106(3),  
30 485-493. <https://doi.org/10.1007/s11240-011-9947-1>

31 García-Mendoza, A. (2002). "Distribution of the genus *Agave* (Agavaceae) and its endemic species in Mexico", en *Cactus*  
32 *and Succulent Journal* (us), núm. 74, pp. 177-187.

33 Gutiérrez Aguilar, P. et al. (2016). DESARROLLO DE METODOLOGÍA PARA LA TRANSFORMACIÓN GENÉTICA  
34 DE ESPECIES DE AGAVE MEDIADA POR *Agrobacterium tumefaciens* Y BASADO EN EL PROCESO DE

- 1 ORGANOGÉNESIS. Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos, 1(1), 297–302.  
2 <http://www.fcb.uanl.mx/IDCyTA/files/volume1/1/2/50.pdf>
- 3 Huijara Vasconcelos, J. J. (2015, 1 julio). Estudio del proceso de poliploidización *in vitro* en *Agave*. CYCY REPOSITORIO.  
4 Recuperado 20 de noviembre de 2020, de <https://cicy.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1003/560>
- 5 Khaing, T. T. (2007). Improvement of *Gymnostachyum* species by induced mutation. *Tropical Agricultural Research*, 19.  
6 [http://www.pgia.ac.lk/files/Annual\\_congress/journal/v19/28\\_Improvement\\_of\\_Gymnostachyum.pdf](http://www.pgia.ac.lk/files/Annual_congress/journal/v19/28_Improvement_of_Gymnostachyum.pdf)
- 7 Illsey, C., Gómez, T., *et al.* (2005). Conservación in situ y manejo campesino de magueyes. Grupo de Estudios Ambientales  
8 AC. Informe final SNIB-CONABIO proyecto No. V028. México D. F.
- 9 Martínez Velasco, I. *et al.* (2020). Respuesta morfo genética y variación soma clonal en dos especies de *Agave* regeneradas  
10 *in vitro*. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 23(2),  
11 [https://www.researchgate.net/publication/342535024\\_RESPUESTA\\_MORFOGENETICA\\_DE\\_DOS\\_ESPECIES\\_DE\\_AGAVE\\_REGENERADAS\\_IN\\_VITRO\\_MORPHOGENETIC\\_RESPONSE\\_OF\\_TWO\\_AGAVE\\_SPECIES\\_REGENERATED\\_IN\\_VITRO](https://www.researchgate.net/publication/342535024_RESPUESTA_MORFOGENETICA_DE_DOS_ESPECIES_DE_AGAVE_REGENERADAS_IN_VITRO_MORPHOGENETIC_RESPONSE_OF_TWO_AGAVE_SPECIES_REGENERATED_IN_VITRO).
- 12  
13
- 14 Molero Paredes, T. A. (2008). Efectos de la inducción artificial de la poliploidia en plantas de Aloe vera (L.). *Boletín del*  
15 *Centro de Investigaciones Biológicas, Universidad del Zulia*, 42(1), 111-133. [https://www.researchgate.net/profile/Tamara-Molero-2/publication/315694405\\_EFECTOS\\_DE\\_LA\\_INDUCCION\\_ARTIFICIAL\\_DE\\_LA\\_POLIPLOIDIA\\_EN\\_PLANTAS\\_DE\\_ALOE\\_VERAL/links/5c61c84c299bf1d14cbf7253/EFECTOS-DE-LA-INDUCCION-ARTIFICIAL-DE-LA-POLIPLOIDIA-EN-PLANTAS-DE-ALOE-VERAL.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Tamara-Molero-2/publication/315694405_EFECTOS_DE_LA_INDUCCION_ARTIFICIAL_DE_LA_POLIPLOIDIA_EN_PLANTAS_DE_ALOE_VERAL/links/5c61c84c299bf1d14cbf7253/EFECTOS-DE-LA-INDUCCION-ARTIFICIAL-DE-LA-POLIPLOIDIA-EN-PLANTAS-DE-ALOE-VERAL.pdf)
- 16  
17  
18  
19
- 20 Murashige, T., & Skoog, F. (1962, julio). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue  
21 Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- 22 Poehlman, J. M. (1992). *Mejoramiento genético de las cosechas*. México, Limusa. ISBN: 968-18-0312-4.  
23 [https://repository.agrosavia.co/bitstream/handle/20.500.12324/13349/20994\\_312.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repository.agrosavia.co/bitstream/handle/20.500.12324/13349/20994_312.pdf?sequence=1&isAllowed=y)  
24 Recuperado: Junio, 2021
- 25 Ruvalcaba-Ruíz, D., Palomino, G., Martínez, J., Méndez, I., & Rodríguez-Garay, B. (2011). *In vitro* induction of a trisomic  
26 of *Agave tequilana* Weber var. Azul (Agavaceae) by para-fluorophenylalanine treatment. *In Vitro Cellular & Developmental*  
27 *Biology - Plant*, 48(1), 144–152. <https://doi.org/10.1007/s11627-011-9405-0>
- 28 SEMARNAT, Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. (2010). Norma Oficial Mexicana NOM-059-  
29 SEMARNAT-2010. Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres Categorías de riesgo y  
30 especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio. Lista de especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación,  
31 Segunda Sección. 30 de diciembre de 2010. México, D.F. 78 p.
- 32 Seneviratn, K., & Wijesundar, D. (2007, 15 junio). First African Violets (*Saintpaulia ionantha*, H. Wendl.) With a Changing  
33 Colour Pattern Induced by Mutation. *American Journal of Plant Physiology*, 2(3), 233-236.  
34 <https://doi.org/10.3923/ajpp.2007.233.236>

- 1 Sree Ramulu, K.; Verhoeven, H. A.; Dijkhuis, P. y Gilissen, L. J. W.(1988). Chromosome behaviour and formation of  
2 micronuclei after treatment of cell suspension cultures with amiprofos-methyl in various plant species. *Plant Science.*,  
3 56(3): 227-237. [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(88\)90102-1](https://doi.org/10.1016/0168-9452(88)90102-1)
- 4 Urwin, N. A. R. (2014, 31 enero). Generation and characterisation of colchicine-induced polyploid  
5 *Lavandula × intermedia*. *Euphytica*, 197(3), 331-339. <https://doi.org/10.1007/s10681-014-1069-5>
- 6 Vichiato, M. R. D. M., Vichiato, M., Pasqual, M., Rodrigues, F. A., & Castro, D. M. D. (2014, octubre). Morphological  
7 effects of induced polyploidy in *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae). *Crop Breeding and Applied Biotechnology*,  
8 14(3), 154-159. <https://doi.org/10.1590/1984-70332014v14n3a23>
- 9 Vinent Serrano, E., & Fajardo Gutiérrez, O. (2009). Estrategia para el mejoramiento genético de Agaves en Cuba. Instituto  
10 de Investigaciones Hortícolas “Liliana Dimitrova” (IIHLD), 37-43.  
11 [https://www.utm.mx/edi\\_anteriores/temas037/N3.pdf](https://www.utm.mx/edi_anteriores/temas037/N3.pdf)

12

13

14

15

16

17

18