



DIFFERENTIAL EXPRESSION OF *CesA* GENES AND THE RELATIONSHIP WITH FIBER CONTENT IN HENEQUEN †

[EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE GENES *CesA* Y LA RELACIÓN CON EL CONTENIDO DE FIBRA EN HENEQUÉN]

María J. García-Castillo, Luis C. Rodríguez-Zapata
and Lorenzo F. Sánchez-Teyer *

Unidad de Biotecnología. Centro de Investigación Científica de Yucatán, Calle 43 x
32 y 34 No. 130, Colonia Chuburná de Hidalgo, CP. 97200, Mérida, Yucatán,

México. *Email: santey@cicy.mx

*Corresponding author

SUMMARY

Background: Cellulose synthase is a superfamily where genes involved in the synthesis of the primary and secondary cell wall and their relationship with plant fibers have been reported. In recent years, vegetable fiber has been the subject of considerable interest, due to its quality and the ability to be biodegradable, and it has been reported that the cellulose content is related to the quality of the fiber. **Objective:** To determine the relationship of *CesA* genes with fiber content in *Agave fourcroydes* Lem. **Methodology:** The relative expression of the *CesA3*, *CesA4* and *CesA5* genes involved in the primary and secondary cell wall will be prolonged and their relationship with fiber content will be evaluated in plants of different heights in a henequen plantation. The content of the fiber components was evaluated using the TAPPI methods and an analysis of variance (ANOVA) was performed, the means were compared using the Tukey test ($p \leq 0.05$). **Results:** Plants with greater height, have longer leaves, with higher cellulose content (48%) and low content of hemicellulose (3%) and lignin (8%), these characteristics are related to high levels of relative expression of the *CesA3* and *CesA4* genes and low relative expression level of the *CesA5* gene. **Implications:** A direct connection of higher expression of *CesA3* and *CesA4* genes with the length of the leaves, the height of the plant and the cellulose content is presented. **Conclusions:** In this research, the exploration between the expression and the length of the leaves serves as a basis for future research focused on the early selection of individuals with high cellulose content, which through plant tissue culture represents an option for genetic improvement for the benefit of crop producers.

Key words: *Agave fourcroydes*; differential expression *CesA*; fiber; TAPPI methods; cellulose.

RESUMEN

Antecedentes: Celulosa sintasa es una superfamilia donde se han reportado genes que intervienen en la síntesis de la pared celular primaria y secundaria, y la relación que estos tienen con las fibras vegetales. En los últimos años la fibra vegetal ha sido objeto de considerable interés, debido a su calidad y la capacidad de ser biodegradable, además se ha reportado que el contenido de celulosa está relacionado con la calidad de la fibra. **Objetivo:** Determinar la relación de genes *CesA* con el contenido de fibra en *Agave fourcroydes* Lem. **Metodología:** Se determinó la expresión relativa de los genes *CesA3*, *CesA4* y *CesA5* involucrados en la pared celular primaria y secundaria, y se evaluó su relación con el contenido de fibra en plantas de diferentes alturas en una plantación de henequén. Se evaluó el contenido de los componentes de la fibra por medio de los métodos TAPPI y se realizó un análisis de varianza (ANOVA), las medias se compararon mediante la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). **Resultados:** Las plantas con mayor altura, presentan hojas más largas, con mayor contenido de celulosa (48%) y bajo contenido de hemicelulosa (3%) y lignina (8%), estas características se relacionan con elevados niveles de expresión relativa de los genes *CesA3* y *CesA4* y bajo nivel de expresión relativa del gen *CesA5*. **Implicaciones:** Se presenta una correlación directa de mayor expresión de genes *CesA3* y *CesA4* con la longitud de las hojas, la altura de la planta y el contenido de celulosa. **Conclusiones:** En esta investigación la correlación entre la expresión y la longitud de las hojas sirve de base para investigación futura enfocada en la selección temprana de individuos con alto contenido de celulosa, que a través del cultivo de tejidos vegetales representa una opción para el mejoramiento genético en beneficio de los productores del cultivo.

Palabras clave: *Agave fourcroydes*; expresión diferencial genes *CesA*; fibra; métodos TAPPI; celulosa.

† Submitted April 14, 2022 – Accepted June 27, 2022. <http://doi.org/10.56369/tsaes.4328>



Copyright © the authors. Work licensed under a CC-BY 4.0 License. <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

ISSN: 1870-0462.

ORCID = LCRZ: 0000-0002-4872-8231; LFST: 0000-0002-1714-0240; MJGC: 0000-0001-7595-7809

INTRODUCCIÓN

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

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

Existen 10 genes *CesA* conocidos en *Arabidopsis* (*AtCesA1*, *AtCesA3*, *AtCesA6* y *AtCesA10*) que están involucrados en la síntesis de pared primaria, mientras que los genes *AtCesA4*, *AtCesA7* y *AtCesA8* coordinan la formación de la pared secundaria (Taylor *et al.*, 2003) y los genes *AtCesA2*, *AtCesA5* y *AtCesA9* tienen una función parcialmente redundante en la deposición de celulosa en células en expansión (Desprez *et al.*, 2007). En *Oryza sativa* se han reportado 11 genes *CesA1-CesA11* (Wang *et al.*, 2010), en *Hordeum vulgare*, 7 genes *CesA HvCesA1*, *HvCesA2*, *HvCesA3*, *HvCesA4*, *HvCesA6*, *HvCesA7* y *HvCesA8* (Burton *et al.*, 2004) y en *Populus trichocarpa* se han reportado 18 genes *CesA CesA1*, *CesA2-1*, *CesA2-2*, *CesA3-1*, *CesA3-2*, *CesA4-1*, *CesA4-2*, *CesA5-1*, *CesA5-2*, *CesA6-1*, *CesA6-2*, *CesA7-1*, *CesA7-2*, *CesA8-1*, *CesA8-2* *CesA8-3*, *CesA9-1*, *CesA9-2* (Djerbi *et al.*, 2005).

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

Derivado de propiedades como la resistencia (Sydenstricker *et al.*, 2003), la flexibilidad (Manikandan, *et al.*, 1996), su bajo costo de producción y la capacidad de ser biodegradables (Manikandan, *et al.*, 1996; Toriz *et al.*, 2002) el interés industrial por las fibras naturales ha ido en aumento. En contraste con ello, la industria de la fibra de henequén ha disminuido en los últimos cincuenta años y su comercio para la fabricación de cuerdas, sogas, tapetes, artesanías y papel (Negrete *et al.*, 2010) también se ha visto afectado, sin embargo, existen esfuerzos por parte de los países productores por retomar esta actividad, incursionando en nuevos productos y modernizando los procesos (Nava-Cruz *et al.*, 2015).

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

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

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

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

tamaño de planta se colectaron muestras por triplicado, en total se seleccionaron 81 plantas.

Cuantificación de caracteres morfométricos

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

Cuantificación de fibra

La cuantificación de celulosa se realizó de acuerdo con la norma TAPPI para la medición de componentes químicos de materiales fibrosos celulósicos, donde se lleva a cabo una hidrólisis ácida (H_2SO_4 al 2%), posteriormente una extracción alcalina (NaOH al 20%) y un blanqueo (Na^+ al 0.5%). Las hojas de henequén se secaron en un horno de convección (Thermo Scientific OGH180, Alemania) a $100^\circ C$, hasta obtener un peso constante; posteriormente se molieron en un molino de cuchillas (Brabender GmbH & Co. KG, Alemania) y luego se tamizaron en seco, en diferentes fracciones (mallas de 100 mm, 80 mm, 60 mm y 40 mm). La fracción de las mallas 40 y 60 mm fue retenida y utilizada para su posterior caracterización. Para determinar el contenido de humedad se aplicó el método ASTM D4442-92 (reaprobado 1997). Los análisis con disolventes orgánicos se realizaron con los métodos TAPPI T-204 cm-0: para la determinación de extractos acuosos se empleó el método T-207 cm-99 de la norma TAPPI. El contenido de lignina se determinó según el método Klason (lignina insoluble T-222 de TAPPI), mientras que la celulosa y la hemicelulosa se cuantificaron de acuerdo con el procedimiento descrito por Kumar *et al.* (2009).

PCR en tiempo real (expresión relativa)

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

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

Para la estandarización de la expresión del gen ribosomal 18S, inicialmente se evaluó la especificidad de los cebadores. Se realizó una qPCR usando ADNc de cada muestra. La mezcla de reacción consistió en 50 μM $MgCl_2$, 10 μM DNTP's, 1 U de taq polimerasa, 10 pmol de cada cebador y 200 ng de ADNc, en un volumen final de 20 μl . Las condiciones de amplificación fueron de $94^\circ C$ por 10 min, 35 ciclos de $94^\circ C$ por 1 min, $64^\circ C$ por 1 min y $72^\circ C$ por 1 min y una extensión final a $72^\circ C$ por 7 min. Se realizó una curva de fusión bajo las siguientes condiciones; $95^\circ C$ 15 s, $60^\circ C$ 1 min y $95^\circ C$ 15 s, para descartar la formación de dímeros.

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

Análisis estadísticos

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

RESULTADOS

Caracteres morfométricos y contenido de celulosa

Los resultados sobre los caracteres morfométricos y la composición de fibras (con base al peso seco) en celulosa, hemicelulosa y lignina se presentan en la tabla 1.

Tabla 1. Plantas seleccionadas en la colecta del material vegetal.

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

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

n: 9 con 3 réplicas para cada tamaño de planta.

La longitud promedio de las hojas de las plantas de diferentes alturas presentó diferencias significativas, observando una diferencia de hasta 1.8 veces superior en A comparado con B (Tabla 1). El peso seco fue 6 veces superior en A y 3 veces superior en M, comparadas con B. El contenido de agua fue significativamente superior en B, mientras que no se observaron diferencias significativas entre M y A. El contenido de celulosa fue 6 veces superior en A, comparado con B y 3.5 veces superior en M, comparado con B. El contenido de hemicelulosa en A y M fue 3 veces superior en comparación con B, mientras que el contenido de lignina 4 veces superior en A, comparado con B y 2 veces superior en A comparado con M, misma tendencia observada en el contenido de lignina en M que fue 2 veces superior en comparación con B (Tabla 1).

Cuantificación relativa de genes *CesA*

Para el análisis de expresión relativa se evaluaron dos genes *CesA3* y *CesA5* involucrados en pared celular primaria y *CesA4* en la pared celular secundaria (Figura 1 A-C).

CesA3 y *CesA5* involucrados en la síntesis de la pared celular primaria, presentaron un patrón de expresión diferencial, *CesA3* fue dos veces mayor para A, comparado con M y B, donde no se presentan diferencias significativas en la expresión, *CesA5* presentó una expresión 3 veces mayor en B, comparadas con las hojas M y A, las cuales presentaron un nivel de expresión similar.

CesA4 involucrado en la síntesis de pared celular secundaria, presentó una alta expresión relativa en A, observando una expresión 50 veces superior en comparación con B y 8 veces superior en comparación con M: por su parte M presentó una expresión 5 veces superior comparada con B (Figura 1C).

DISCUSIÓN

Relación entre el contenido de celulosa y la longitud de las hojas en henequén

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

La hemicelulosa representa entre el 25 y el 35 % de la biomasa lignocelulósica en plantas (Kumar *et al.*, 2008) en diferentes especies de *Agave*, los valores de hemicelulosa reportados varían desde el 3 hasta el 28 %, (Vieira *et al.*, 2002; Cordeiro *et al.*, 2012). Sin embargo, los resultados en este trabajo variaron de 0.5 a 3%, se ha reportado que la hemicelulosa está involucrada en el crecimiento de las plantas (Pauly *et al.*, 2013), por ende, se atribuye que las plantas de menor longitud (B), se observa un menor crecimiento, el cual repercute en el contenido de hemicelulosa, valores similares se han observado en *A. lechuguilla* y *A. fourcroydes* (Vieira *et al.*, 2002), asimismo consideramos que la composición varía de acuerdo a la especie, donde los reportes con el menor contenido de hemicelulosa ha sido en *A. fourcroydes*.

En especies de *Agave* se han reportado valores de 4 a 15% de lignina (Vieira *et al.*, 2002; Myslami y Ragedra, 2011; Liñán-Montes *et al.*, 2014), en comparación con los valores observados de henequén en este trabajo, variaron de 2 hasta 8%. En otras especies se

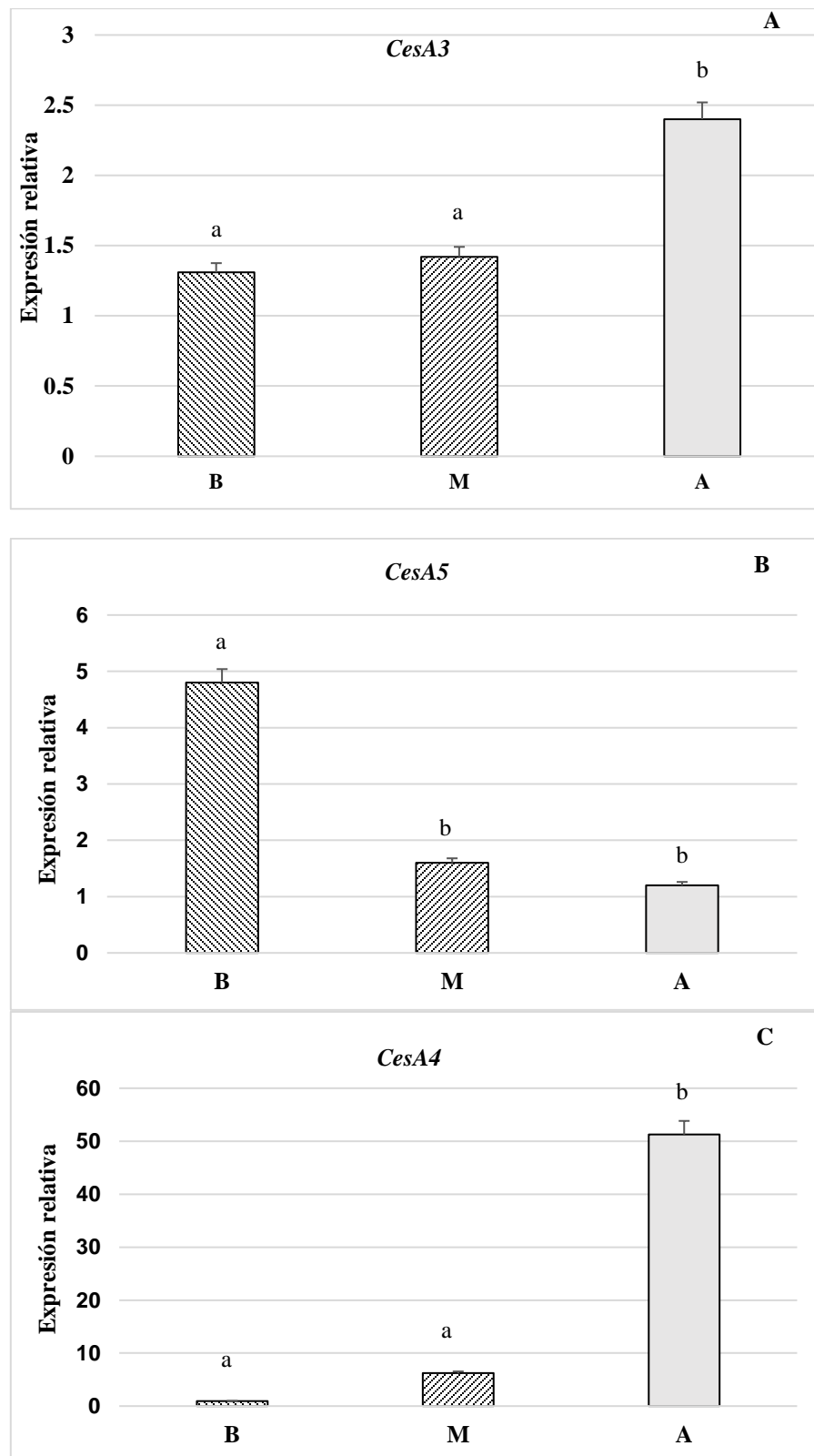


Figura 1. Estudio de la expresión relativa de genes de pared primaria en los incisos A y B (*Cesa3* y *Cesa5*) y pared secundaria en el inciso C (*Cesa4*), en plantas de diferente longitud de hoja de henequén, las letras en mayúsculas representan: B: baja, M: media, A: alta, las letras a, b y c, representan valores significativamente diferentes (prueba t de Student; $p \leq 0.05$).

han obtenido valores de lignina entre 25 al 30%, debido al tipo de extracción empleado por medio de métodos enzimáticos (Chávez-Sifontes y Domine, 2013). Los valores bajos obtenidos en el presente estudio se atribuyen al método de extracción.

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

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

Expresión de genes *CesA* involucrados en la biosíntesis de pared primaria y secundaria en henequén.

En diferentes especies como *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa* (Taylor *et al.*, 2004; Heidari *et al.*, 2019), *Zea Mays* (Appenzeller *et al.*, 2004), *Sorghum bicolor*, *Populus trichocarpa* (Djerbi *et al.*, 2005), *Boehmeria nivea* (Liu *et al.*, 2013), *Gossypium hirsutum* (Li *et al.*, 2013), *Linum ussitasium* (Galinousky *et al.*, 2014), *Eucalyptus grandis* (Ranik y Maybourg, 2006), *Agave* Híbrido 11648 (Huang *et al.*, 2019), se han descrito genes involucrados en la biosíntesis de pared celular primaria y secundaria.

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

formación de homodímeros (Timmers *et al.*, 2009). Por ende sugieren que *CesA4* está involucrado uniendo los diferentes complejos en la estructura de la roseta para la síntesis de celulosa (Atanassov *et al.*, 2009).

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

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

Por otra parte, el análisis de expresión del gen *CesA5*, el cual está involucrado en la síntesis de la pared celular primaria, presentó una correlación inversa, debido que se observó una mayor expresión en las plantas de menor longitud (B), este gen (*CesA5*) se ha caracterizado en *Arabidopsis* como un gen redundante, presentando mayor expresión en plántulas jóvenes, por lo que se asocia con la producción de biomasa durante el crecimiento (Hu *et al.*, 2018). En el estudio reportado por (Huang *et al.*, 2019), *CesA3* y *CesA5* presentaron una mayor expresión en *A. tequilana* y *CesA4* presentó mayor expresión en el híbrido 11648, el cual se utiliza para la producción de fibra.

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

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

CONCLUSIÓN

Las plantas de henequén con mayor altura presentan hojas más largas, con mayor contenido de celulosa y bajo contenido de hemicelulosa y lignina. *CesA4* involucrado en la biosíntesis de pared celular secundaria, presenta una correlación directa entre el nivel de expresión más alto con plantas de mayor altura y mayor contenido de celulosa, un patrón similar, pero con menor expresión fue *CesA3*, involucrado en la biosíntesis de pared celular primaria. Por el contrario, la expresión en el gen *CesA5* fue inversa, ya que se presentó una mayor expresión en las plantas de menor longitud, derivado de ello se propone que la expresión de estos tres genes en conjunto puede servir como marcadores de selección en henequén. Aunque faltarían más estudios involucrados con la expresión de estos genes en las diferentes etapas del desarrollo de la fibra de henequén, su relación con la edad biológica y la aplicación para selección temprana a nivel de invernadero o vivero.

Agradecimientos

Los autores agradecen al CONACyT por la beca de doctorado otorgada GCMJ (591024).

Funding. The present research did not receive or was supported by any funding or grant.

Conflict of interest. The authors declare that there is no conflict of interest in the presented research and data.

Compliance with ethical standards. The investigation no included studies in humans therefore no revisions were required for verification of its fulfillment.

Data availability. Data are available with Felipe Sanchez-Teyer (santey@cicy.mx) upon reasonable request.

Author contribution statement CRediT

M.J. Garcia-Castillo – Formal Analysis, Investigation, Writing., **L.C. Rodriguez-Zapata** – Supervision, Validation., **L.F. Sánchez-Teyer** – Conceptualization, Validation, Supervision, Writing-Review & editing, Funding acquisition.

REFERENCIAS

- Abraham, P.E., Yin, H.; Borland, A.M., Weighill, D., Lim, S.D.; De Paoli, H.C., Engle, N., Jones, P.C., Agh, R. and Weston, D.J., 2016. Transcript, protein and metabolite temporal dynamics in the CAM plant Agave. *Nature Plants*, 2, pp.16178. <https://doi.org/10.1038/nplants.2016.178>
- Appenzeller, L., Doblin, M., Barreiro, R., Wang, H., Niu, X., Kollipara, K. and Dhugga, K. S., 2004. Cellulose synthesis in maize: isolation and expression analysis of the cellulose synthase (*CesA*) gene family. *Cellulose*, 11(3), pp. 287-299. <https://doi.org/10.1023/B:CELL.0000046417.84715.27>
- Arioli, T., Peng, L., Betzner, A. S., Burn, J., Wittke, W., Herth, W. and Cork, A., 1998. Molecular analysis of cellulose biosynthesis in *Arabidopsis*. *Science*, 279(5351), pp. 717-720. <https://doi.org/10.1126/science.279.5351.717>
- ASTM (American Society for Testing and Materials), 2000. Standard test methods for direct moisture content measurement of Wood and Wood-base materials. Designation: D4442-92 (reapproved 1997)-Primary methods. U.S.A. 6 p.
- Atanassov, I.I., Pittman, J.K. and Turner, S.R., 2009. Elucidating the mechanisms of assembly and subunit-interaction of the cellulose synthase complex of *Arabidopsis* secondary cell walls. *Journal Biological Chemistry*, 284, pp. 3833-3841. <https://doi.org/10.1074/jbc.M807456200>
- Bacic, A., Harris, P. and Stone, B., 1988. Structure and function of plant cell walls. In *The Biochemistry of Plants*, J. Priess, ed (New York/London/San Francisco: Academic Press), pp. 297-371.
- Brown, D. M., Zeef, L. A. H., Ellis, J., Goodacre, R. and Turner, S. R., 2005. Identification of novel genes in *Arabidopsis* involved in secondary cell wall formation using expression profiling and reverse genetics.

- Plant Cell* 17, pp. 2281–2295. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.031542>
- Burton, R. A., Shirley, N. J., King, B. J., Harvey, A. J. and Fincher, G. B. 2004. The CesA gene family of barley. Quantitative analysis of transcripts reveals two groups of co-expressed genes. *Plant Physiology*, 134(1), pp. 224–236. <https://doi.org/10.1104/pp.103.032904>
- Carpita, N.C. and Gibeaut, D.M., 1993. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *The Plant Journal*, 3: pp. 1–30. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.1993.tb00007.x>
- Chávez-Sifontes, M. and Domine, M. E., 2013. Lignina, estructura y aplicaciones: métodos de despolimerización para la obtención de derivados aromáticos de interés industrial. *Avances en Ciencias e Ingeniería*, 4(4), pp. 15–46.
- Cordeiro LG, El-Aouar AA. and de Araujo BCV., 2012. Energetic characterization of malt bagasse by calorimetry and thermal analysis. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. <https://doi.org/10.1007/s109730122630x>
- Cosgrove D.J., 2005. Growth of plant cell wall. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 6: pp. 850–861. <https://doi.org/10.1038/nrm1746>
- Desprez, T., Juraniec, M., Crowell, E. F., Jouy, H., Pochylova, Z., Parcy, F. and Vernhettes, S., 2007. Organization of cellulose synthase complexes involved in primary cell wall synthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(39), pp. 15572–15577. <https://doi.org/10.1073/pnas.0706569104>
- Djerbi, S., Lindskog, M., Arvestad, L., Sterky, F., and Teeri, T. T., 2005. The genome sequence of black cottonwood (*Populus trichocarpa*) reveals 18 conserved cellulose synthase (*CesA*) genes. *Planta*, 221(5), pp. 739–746. <https://doi.org/10.1007/s00425-005-1498-4>
- Espino, E., Cakir, M., Domenek, S., Román-Gutiérrez, A. D., Belgacem, N., and Bras, J., 2014. Isolation and characterization of cellulose nanocrystals from industrial by-products of *Agave tequilana* and barley. *Industrial Crops and Products*, 62, pp. 552–559. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.09.017>
- Galinousky, D. V., Anisimova, N. V., Raiski, A. P., Leontiev, V. N., Titok, V. V. and Khotyleva, L. V., 2014. Cellulose synthase genes that control the fiber formation of flax (*Linum usitatissimum* L.). *Russian Journal of Genetics*, 50(1), pp. 20–27. <https://doi.org/10.1134/S1022795414010050>
- García, F. P., Méndez, J. P., Muñóz, E. J., Sandoval, O. A. A. and Laguna, R. R., 2022. Taxonomic, physical and morphological characterization of four species of agave with potential for the production of cellulose fibers from the leaves. *South Florida Journal of Development*, 3(1), pp. 1277–1301. <https://doi.org/10.46932/sfjdv3n1-099>
- Gross, S.M., Martin, J.A.; Simpson, J., Abraham-Juarez, M.J., Wang, Z., Visel, A., 2013. *De novo* transcriptome assembly of drought tolerant CAM plants, *Agave deserti* and *Agave tequilana*. *BMC Genomics*. 14, pp. 1–14. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-563>
- Hazen, S. P., Scott-Craig, J. S. and Walton, J. D., 2002. Cellulose synthase-like genes of rice. *Plant Physiology*, 128(2), pp. 336–340. <https://doi.org/10.1104/pp.010875>
- Heidari, P., Ahmadzadeh, M., Izanlo, F. and Nussbaumer, T., 2019. In silico study of the CESA and CSL gene family in *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa*: Focus on post-translation modifications. *Plant Gene*, 19, pp. 100189. <https://doi.org/10.1016/j.plgene.2019.100189>
- Hu H.Z., Zhang R., Feng S.Q., Wang Y.M., Wang Y.T. and Fan C.F., 2018. Three *AtCesA6*-like members enhance biomass production by distinctively promoting cell growth in *Arabidopsis*. *Plant Biotechnology Journal*, 16, pp. 976–988. <https://doi.org/10.1111/pbi.12842>
- Huang, X., Xiao, M., Xi, J., He, C., Zheng, J., Chen, H. and Yi, K., 2019. *De novo* transcriptome assembly of *Agave H11648* by Illumina sequencing and identification of cellulose synthase genes in *Agave* species. *Genes*, 10(2), pp. 103. <https://doi.org/10.3390/genes10020103>

- Hulle, A., Kadole, P. and Katkar, P., 2015. *Agave Americana* leaf fibers. *Fibers*, 3(1), pp. 64-75. <https://doi.org/10.3390/fib3010064>
- Jiménez-Muñoz, E. J., Prieto-García, F., Prieto-Méndez, J. P., Acevedo-Sandoval, O. A. A. and Rodríguez-Laguna, R. R., 2016. Caracterización fisicoquímica de cuatro especies de agaves con potencialidad en la obtención de pulpa de celulosa para elaboración de papel. *Dyna*, 83(197), pp. 232-242. <https://doi.org/10.15446/dyna.v83n197.52243>
- Joshi, C. P., Thammannagowda, S., Fujino, T., Gou, J. Q., Avci, U., Haigler, C. H. and Peter, G. F., 2011. Perturbation of wood cellulose synthesis causes pleiotropic effects in transgenic aspen. *Molecular Plant*, 4(2), pp. 331-345. <https://doi.org/10.1093/mp/ssq081>
- Kasirajan, L., Hoang, N. V., Furtado, A., Botha, F. C. and Henry, R. J., 2018. Transcriptome analysis highlights key differentially expressed genes involved in cellulose and lignin biosynthesis of sugarcane genotypes varying in fiber content. *Scientific Reports*, 8(1), pp. 1-16. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30033-4>
- Keegstra K., 2010. Plant cell walls. *Plant Physiology*, 154, pp. 483-486. <https://doi.org/10.1104/pp.110.161240>
- Kumar, A., Wang, L., Dzenis, Y. A., Jones, D. D. and Hanna, M. A., 2008. Thermogravimetric characterization of corn stover as gasification and pyrolysis feedstock. *Biomass and Bioenergy*, 32(5), pp. 460-467. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2007.11.004>
- Kumar R, Mago G, Balan V. and Wyman CE., 2009. Physical and chemical characterizations of corn stover and poplar solids resulting from leading pretreatment technologies. *Bioresource Technology* 00, pp. 3948-3962. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.01.075>
- Li, F., Xie, G., Huang, J., Zhang, R., Li, Y. and Zhang, M., 2017. OsCESA9 conserved-site mutation leads to largely enhanced plant lodging resistance and biomass enzymatic saccharification by reducing cellulose DP and crystallinity in rice. *Plant Biotechnology Journal*, 15, pp. 1093-1104. <https://doi.org/10.1111/pbi.12700>
- Li, A., Xia, T., Xu, W., Chen, T., Li, X., Fan, J., and Peng, L., 2013. An integrative analysis of four CESA isoforms specific for fiber cellulose production between *Gossypium hirsutum* and *Gossypium barbadense*. *Planta*, 237(6), pp. 1585-1597. <https://doi.org/10.1007/s00425-013-1868-2>
- Li, M., Bahn, S. C., Guo, L., Musgrave, W., Berg, H., Welti, R., and Wang, X., 2011. Patatin-related phospholipase pPLAIII β -induced changes in lipid metabolism alter cellulose content and cell elongation in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 23(3), pp. 1107-1123. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.081240>
- Liñán-Montes, A., de la Parra-Arciniega, S.M. and Garza-González, M.T., 2014. Characterization and thermal analysis of agave bagasse and malt spent grain. *Journal Thermal Analysis and Calorimetry*, 115, pp. 751-758. <https://doi.org/10.1007/s10973-013-3321-y>
- Liu, T., Zhu, S., Tang, Q., Chen, P., Yu, Y. and Tang, S., 2013. De novo assembly and characterization of transcriptome using Illumina paired-end sequencing and identification of *CesA* gene in ramie (*Boehmeria nivea* L. Gaud). *BMC Genomics*, 14(1), pp. 1-11. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-125>
- Liu Z.Y., Schneider R., Kesten C., Zhang Y. and Somssich M., Fernie A.R., 2016. Cellulose-microtubule uncoupling proteins prevent lateral displacement of microtubules during cellulose synthesis in *Arabidopsis*. *Developmental Cell*, 38, pp. 305-315. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2016.06.032>
- Manikandan, K.C., Diwan, S.M. and Sabu, T., 1996. Tensile properties of short sisal fiber reinforced polystyrene composites. *Journal Applied Polymer Science*, pp. 1483-1497. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4628\(19960531\)60:9<1483::AID-APP23>3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4628(19960531)60:9<1483::AID-APP23>3.0.CO;2-1)
- Maroufi, A., Van Bockstaele, E., and De Loose, M., 2010. Validation of reference genes for gene expression analysis in chicory (*Cichorium intybus*) using quantitative real-time PCR. *BMC Molecular Biology*, 11(1), pp. 1-12. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-11-15>
- McFarlane, H. E., Döring, A., and Persson, S., 2014. The cell biology of cellulose synthesis. *Annual Review of Plant Biology*, 65, pp. 69-94.

- <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050213-040240>
- Mueller S.C. and Brown R.M., 1980. Evidence for an intramembrane component associated with a cellulose microfibril-synthesizing complex in higher plants. *Journal of Cell Biology*. 84, pp. 315–326.
<https://doi.org/10.1083/jcb.84.2.315>
- Myslami, K. and Rajendran, I., 2011. The mechanical properties, deformation and thermomechanical properties of alkali treated and untreated Agave continuous fibre reinforced epoxy composites. *Materials & Design*, 32(5), pp. 3076-3084.
<https://doi.org/10.1016/j.matdes.2010.12.051>
- Nava-Cruz, N. Y., Medina-Morales, M. A., Martinez, J. L., Rodriguez, R. and Aguilar, C. N., 2015. Agave biotechnology: an overview. *Critical Reviews in Biotechnology*, 35(4), pp. 546-559.
<https://doi.org/10.3109/07388551.2014.923813>
- Negrete, L. A. P., 2010. Extracción de fibras de agave para elaborar papel y artesanías. Acta universitaria. Guanajuato 3 de diciembre del 2010. Universidad de Guanajuato. <http://repositorio.ugto.mx/handle/20.500.12059/2055> p.p. 77-83.
- Nicot, N., Hausman, J. F., Hoffmann, L., and Evers, D., 2005. Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. *Journal of Experimental Botany*, 56(421), pp. 2907-2914. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri285>
- Pauly, M., Gille, S. and Liu, L., 2013. Hemicellulose biosynthesis. *Planta*, 238, pp. 627–642.
<https://doi.org/10.1007/s00425-013-1921-1>.
- Persson, S., Wei, H., Milne, J., Page, G. P. and Somerville, C. R., 2005. Identification of genes required for cellulose synthesis by regression analysis of public microarray data sets. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 102(24), pp. 8633–8638.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0503392102>
- Pfaffl, M. W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, 29(9), pp. e45.
<https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>
- Ranik, M. and Myburg, A. A., 2006. Six new cellulose synthase genes from Eucalyptus are associated with primary and secondary cell wall biosynthesis. *Tree Physiology*, 26(5), 545-556.
<https://doi.org/10.1093/treephys/26.5.545>
- Ren, J., Yin, Y., Chen, D., and Wang, Y., 2018. Cloning and analysis of cellulose synthase genes (*CesA*) in *Acacia mangium*. *Tree Genetics & Genomes* 14, pp. 85.
<https://doi.org/10.1007/s11295-018-1299-0>
- Richmond, T. A., and Somerville, C. R., 2000. The cellulose synthase superfamily. *Plant Physiology*, 124(2), pp. 495-498.
<https://doi.org/10.1104/pp.124.2.495>
- Robert, M. L., Herrera, J. L., Contreras, F., and Scorer, K. N., 1987. In vitro propagation of *Agave fourcroydes* Lem. (Henequen). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 8(1), pp. 37-48.
<https://doi.org/10.1007/BF00040731>
- Schuetz M., Smith R. and Ellis B., 2013. Xylem tissue specification, patterning, and differentiation mechanisms. *Journal of Experimental Botany*. 64, pp.11–31.
<https://doi.org/10.1093/jxb/ers287>
- Syafri, E., Sari, N. H., Mahardika, M., Amanda, P. and Ilyas, R. A., 2022. Isolation and characterization of cellulose nanofibers from *Agave gigantea* by chemical-mechanical treatment. *International Journal of Biological Macromolecules*, 200, pp.25-33.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.12.111>
- Stuart, J. M., Segal, E., Koller, D. and Kim, S. K. 2003. A gene-coexpression network for global discovery of conserved genetic modules. *Science*, 302, pp. 249–255.
<https://doi.org/10.1126/science.1087447>
- Schneider R., Hanak T., Persson S. and Voigt C.A., 2016. Cellulose and callose synthesis and organization in focus, what's new? *Current Opinion Plant Biology*. 34, pp. 9–16.
<https://doi.org/10.1016/j.pbi.2016.07.007>
- Shahzad, S., Hussain, M., Arfan, M. and Munir, H., 2022. physiological and biochemical attributes of *Agave sisalana* resilient adaptation to climatic and spatio-temporal conditions. *Pakistan Journal Botany*, 54(1), pp. 169-178.
[http://doi.org/10.30848/PJB2022-1\(15\)](http://doi.org/10.30848/PJB2022-1(15))
- Somerville, C., Bauer, S., Brininstool, G., Facette, M., Hamann, T., Milne, J., Osborne, E., Paredes, A., Persson, S., Raab, T., Vorwerk, S., and Youngs,

- H., 2004. Toward a systems approach to understanding plant cell walls. *Science*, 306, pp. 2206–2211. <https://doi.org/10.1126/science.1102765>
- Sydenstricker, T.H., Mochnaz, S. M. and Amico S.C., 2003. Pull-out and other evaluations in sisal-reinforced polyester biocomposites. *Polymer Testing*, Vol. 22(4), pp.375-380. [https://doi.org/10.1016/S0142-9418\(02\)00116-2](https://doi.org/10.1016/S0142-9418(02)00116-2)
- Richmond, T. A. and Somerville, C. R., 2000. The cellulose synthase superfamily. *Plant Physiology*, 124(2), pp. 495-498. <https://doi.org/10.1104/pp.124.2.495>
- Tamayo-Ordóñez, Y. J., Narvaez-Zapata, J. A. and Sánchez-Teyer, L. F. ,2015. Comparative characterization of ribosomal DNA regions in different *Agave* accessions with economical importance. *Plant Molecular Biology Reporter*, 33(6), pp. 2014-2029. <https://doi.org/10.1007/s11105-015-0895-5>
- Taylor, N. G., Howells, R. M., Huttly, A. K., Vickers, K. and Turner, S. R., 2003. Interactions among three distinct CesA proteins essential for cellulose synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(3), pp. 1450-1455. <https://doi.org/10.1073/pnas.0337628100>
- Taylor, N. G., Gardiner, J. C., Whiteman, R. and Turner, S. R., 2004. Cellulose synthesis in the *Arabidopsis* secondary cell wall. *Cellulose*, 11(3), pp. 329-338. <https://doi.org/10.1023/B:CELL.0000046405.11326.a8>
- Timmers, J., Vernhettes, S., Desprez, T., Vincken, J. P., Visser, R. G. and Trindade, L. M., 2009. Interactions between membrane-bound cellulose synthases involved in the synthesis of the secondary cell wall. *FEBS Letters*, 583(6), pp. 978-982. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.02.035>
- Toriz, G., Denes, F. and Young, R. A., 2002. Lignin-polypropylene composites. Part 1: Composites from unmodified lignin and polypropylene. *Polymer Composites*, 23(5), pp. 806-813. <https://doi.org/10.1002/pc.10478>
- Vieira, M. C., Heinze, T., Antonio-Cruz, R. and Mendoza-Martinez, A. M., 2002. Cellulose derivatives from cellulosic material isolated from *Agave lechuguilla* and *Agave fourcroydes*. *Cellulose*, 9(2), pp. 203-212. <https://doi.org/10.1023/A:1020158128506>
- Wang, L., Guo, K., Li, Y., Tu, Y., Hu, H., Wang, B. and Peng, L., 2010. Expression profiling and integrative analysis of the CESA/CSL superfamily in rice. *BMC Plant Biology*, 10(1), pp. 1-16. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-282>
- Watanabe, Y., Meents, M. J., McDonnell, L. M., Barkwill, S., Sampathkumar, A., Cartwright, H. N. and Mansfield, S. D., 2015. Visualization of cellulose synthases in *Arabidopsis* secondary cell walls. *Science*, 350(6257), pp. 198-203. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2021.03.004>