



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

Propagación *in vitro* de *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck y  
*Agave obscura* Schiede (Agavaceae)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

ROSA MAURICIO SALGADO



DIRECTORA DE TESIS:  
M. en C. LAURA PATRICIA OLGUÍN SANTOS

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX 2019



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## HOJA DE DATOS DEL JURADO

### 1. Datos del alumno

Rosa  
Mauricio  
Salgado  
55 42 21 05 56  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
309293170

### 2. Datos del tutor

M. en C.  
Laura Patricia  
Olguín  
Santos

### 3. Datos del sinodal 1

Dr.  
Abisaí Josué  
García  
Mendoza

### 4. Datos del sinodal 2

Dra.  
Ana Laura  
López  
Escamilla

### 5. Datos del sinodal 3

Dr.  
César Mateo  
Flores  
Ortiz

### 6. Datos del sinodal 4

Dra.  
Margarita  
Collazo  
Ortega

### 7. Datos del trabajo

Propagación *in vitro* de *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck y *Agave obscura* Schiede (Agavaceae).  
# p. 90  
2019

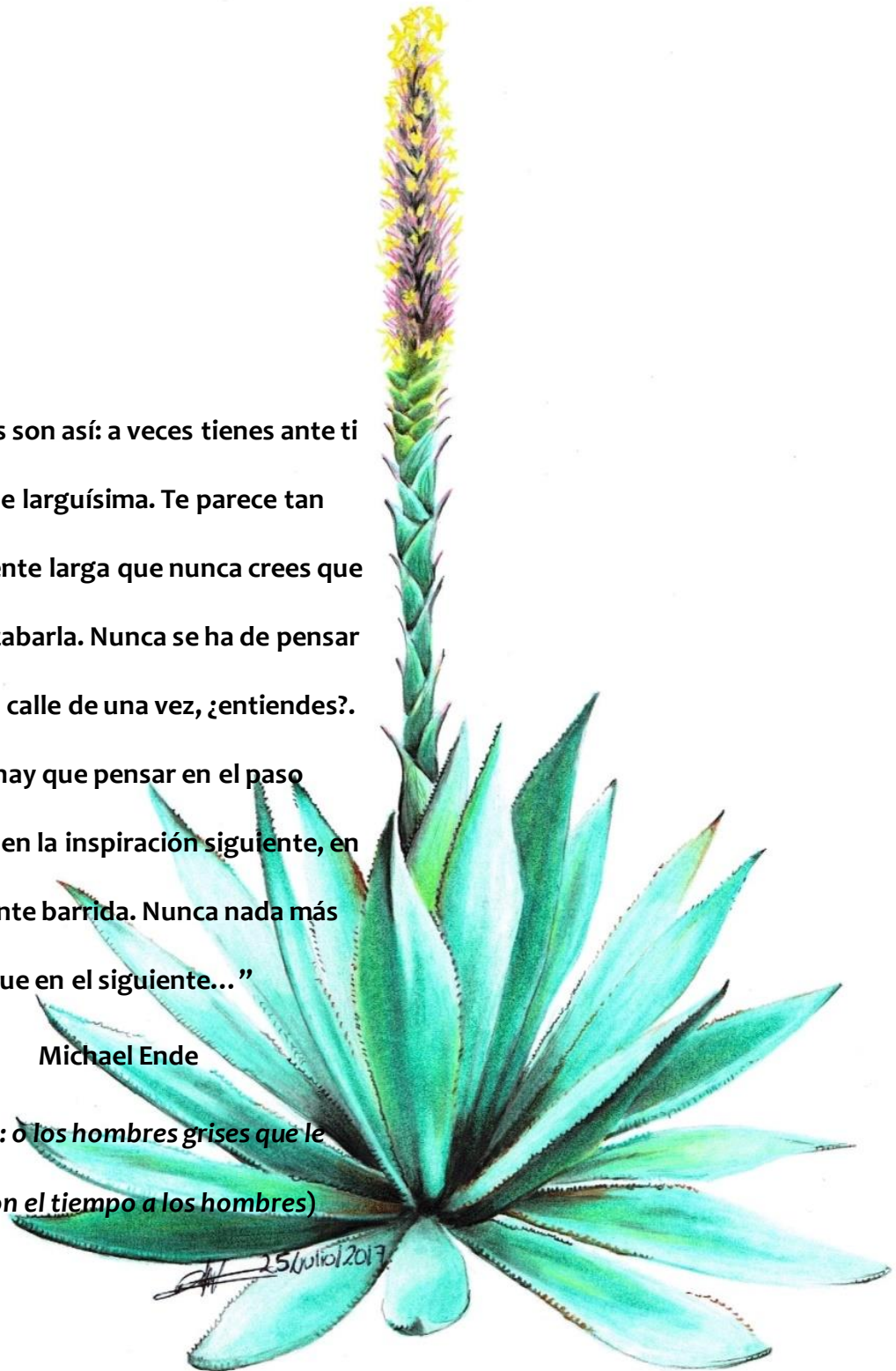
El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Desarrollo en Plantas y en el Invernadero de la Facultad de Ciencias dentro de las actividades del taller *Biología de la reproducción, propagación y fisiología de angiospermas que viven en ambientes contrastantes*, bajo la dirección de la M. en C. Laura Patricia Olguín Santos.

“Las cosas son así: a veces tienes ante ti una calle larguísima. Te parece tan terriblemente larga que nunca crees que podrías acabarla. Nunca se ha de pensar en toda la calle de una vez, ¿entiendes?.

Sólo hay que pensar en el paso siguiente, en la inspiración siguiente, en la siguiente barrida. Nunca nada más que en el siguiente...”

Michael Ende

(Momo: o los hombres grises que le robaron el tiempo a los hombres)



## AGRADECIMIENTOS

### Institucionales

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por abrirme sus puertas desde el CCH, la Facultad de Ciencias y en UNIVERSUM, por todas las enseñanzas académicas y profesionales, además por las experiencias que han marcado mi vida.

A la M. en C. Laura Patricia Olguín Santos del Invernadero de la Facultad de Ciencias, por sus grandes enseñanzas, por compartir sus conocimientos de Cultivo de Tejidos Vegetales, por el apoyo, dedicación y asesoría para lograr concluir este proyecto. Además, por los comentarios y observaciones que enriquecieron toda la investigación.

A la Dra. Ana Laura López Escamilla, académico del Laboratorio Regional de Biodiversidad y Cultivo de Tejidos Vegetales del Instituto de Biología de la UNAM-sede Tlaxcala, por la donación de semillas de *Agave salmiana* y por la asesoría de algunos experimentos del presente trabajo. Asimismo agradezco todas sus enseñanzas del área de Cultivo de Tejidos Vegetales y de fotografía, además de su paciencia y dedicación durante la revisión y las correcciones del manuscrito.

Al Dr. Abisaí Josué García Mendoza del Jardín Botánico del Instituto de Biología de la UNAM, por la donación de las semillas de *Agave obscura* con las que se realizó esta tesis y por sus valiosos comentarios.

Al Dr. César Mateo Flores Ortiz y a la Dra. Margarita Collazo Ortega, por sus observaciones que enriquecieron el desarrollo del manuscrito.

A la Dra. Sonia Vázquez Santana, por la revisión del trabajo escrito durante los cuatro semestres de la investigación realizada en el taller *Biología de la reproducción, propagación y fisiología de angiospermas que viven en ambientes contrastantes*.

Al Dr. Javier Andrés Juárez Díaz, coordinador académico del Invernadero de la Facultad de Ciencias, por facilitar el desarrollo del proyecto en su fase de aclimatización de las plantas propagadas.

Al M. en C. José Gonzalo Ricardo Wong, técnico académico del Laboratorio de Desarrollo en Plantas de la Facultad de Ciencias, por toda la asesoría técnica y paciencia para realizar este proyecto.

A la M. en B. María Eugenia Muñoz Díaz de León, técnico académico responsable del Taller de Plantas I y II de la Facultad de Ciencias, por la asesoría técnica y por facilitar el uso de las instalaciones y equipos para llevar a cabo algunos experimentos de este trabajo.

A la M. en C. Argelia Díaz Rico, técnico académico quien está a cargo de las Cámaras de Ambiente Controlado de la Facultad de Ciencias, por facilitar el mantenimiento de los cultivos *in vitro* en ellas.

A las profesoras del taller *Biología de la reproducción, propagación y fisiología de angiospermas que viven en ambientes contrastantes*: Dra. Judith Márquez Guzmán, Dra. Sonia Vázquez Santana, Dra. Margarita Collazo Ortega, Dra. Karina Jiménez Duran, Dra. Ana Laura López Escamilla y M. en C. Laura Patricia Olguín Santos, por todas sus enseñanzas, y por el buen manejo en la logística del taller, que nos permite aprender el proceso de realización de un proyecto de investigación.

A la M. en C. Ana Patricia García García, por su gran asesoría que me otorgó durante la beca de PRONABES, además por sus enseñanzas y su apoyo, por estar al pendiente de mi progreso durante toda la carrera, gracias.

A los biólogos Pactli Fernando Ortega González y Ara Nadxielli Miguel Peñaloza por el gran apoyo brindado durante la realización del análisis estadístico, así como en la redacción del trabajo.

A la bióloga Karen Noriega Piña, quien me apoyo para realizar la aclimatización de un lote de plantas de *A. obscura*.

A la Pas. de Biol. Karla Miriam Sandoval Lozano por el mantenimiento y cuidados proporcionados a las plantas micropropagadas y mantenidas en el Invernadero de la Facultad de Ciencias, UNAM.

Al biólogo Rodolfo Castillo Rangel por las ilustraciones de los agaves, las cuales ilustran una de las primeras hojas de este trabajo y, la imagen con la cual realice el esquema de productos que se obtienen y usos que se le dan a la planta de agave.

A la bióloga Kenia Valderrama Díaz, curadora educativa de la Sala de Evolución, vida y tiempo en *Universum*, por permitirme desarrollar un poco de divulgación de la ciencia, así como el desarrollo de otras habilidades personales, académicas y profesionales. Gracias por todas las enseñanzas y por la enorme experiencia que adquirí en el museo.

A Verónica Torres Hernández, Gerente de Servicio al Visitante en Papalote Museo del Niño-Chapultepec, por facilitar los permisos correspondientes para la conclusión de los trámites durante el proceso de titulación.

## **Personales**

A mi mamá Rosalía, por ser una persona de gran entereza, porque poco a poco me he dado cuenta que eres una gran mujer, por apoyarme en todo, por tu gran amor incondicional, muchas gracias por confiar en mí y sobretodo muchas gracias por dejarme ser libre en todos los aspectos de mi vida y en mis decisiones, me has dejado creer y crecer con mis errores y con mis aciertos, gracias por todo tu amor, te amo mucho.

A mi papá Santiago, por todo el apoyo y las enseñanzas que me has brindado, así como tu cariño incondicional, te quiero mucho.

A Víctor, Martha, Abigail, Teresa, gracias hermanos, por todo lo que de ustedes he aprendido, por todos los momentos valiosos e inolvidables, muchas gracias por el apoyo que me han brindado durante toda la vida, por consentirme por ser la más chiquita y también gracias por confiar en mí, los amo mucho.

A Uzziel, Isaac y Vania, gracias porque con ustedes he aprendido que siempre hay tiempo para la diversión. Gracias por esa experiencia indescriptible del poder ser tía de los mejores, más locos y divertidos sobrinos del mundo. Los amo mucho mis bellos sobrinos.



A Paty por toda la paciencia, apoyo y enseñanzas que me brindaste en el transcurso de este proyecto. Gracias por ser una de las mejores profesoras y personas que he conocido. Muchas gracias por apoyarme en uno de los momentos más difíciles que me ha tocado vivir. Como ya te lo había dicho, te admiro muchísimo porque tienes una gran entereza personal, a pesar de que siempre tienes mil asuntos profesionales y personales que atender siempre te das el tiempo para dar seguimiento a tus alumnos.

A la Dra. Ana Laura, por todo el apoyo incondicional en la elaboración del proyecto, por transmitirme sus conocimientos, por sus excelentes enseñanzas, en redacción, en estadística y consejos en el minicurso de fotografía. Gracias por su buen humor.

A mis padrinos Aurora y Cruz, a mi tía Leti, tío Josué y mi prima Miriam, por todo el apoyo que me han brindado desde la preparatoria, en verdad muchas gracias.

A mi gran amiga Gaby Tolentino, porque me has brindado tu amistad incondicionalmente desde la prepa, porque contigo he aprendido, me he divertido, he llorado, he sido muy feliz. Tal vez esta vida científica que hemos escogido no nos deje mucho tiempo para vernos o platicar, pero creo que sabemos que siempre podremos contar la una con la otra, gracias amiga, te quiero muchísimo.

A mis amigos Alicia, Angee, Ana Laura, Ara, Samuel, Arely, por todos los bellos momentos que compartimos y los feos también, y todos los que seguiremos viviendo, por su gran y hermosa amistad, gracias por hacerme reír en momentos locos de la carrera, y porque con ustedes he crecido tanto académica como personalmente, los quiero muchísimo.

A mi amigo y compañero de laboratorio, Pactli, gracias feo, porque siempre fuiste un grandísimo apoyo en todo. De verdad muchas gracias por ayudarme con la redacción del escrito, y por revisar el análisis estadístico, e incluso me acompañaste por el sustrato... fuiste un gran empuje para que no desistiera en la elaboración de este proyecto, gracias por el bullying y tu amistad.

A Gaby (Midori), gracias por ser tan linda y amable persona conmigo desde el primer día que nos conocimos y, por compartir tu amistad, risas, enojos, etc., espero que esto dure mucho más. Gracias por ser una persona de gran entereza emocional, y por soportarme, te quiero.

A Selma, te quiero muchísimo y te agradezco todo el apoyo que me has brindado en distintas circunstancias (tú sabes de lo que hablo). De verdad, muchas gracias por tu amistad incondicional, te quiero demasiado.

A Karen, a Matus y a Eve, chicas, nuevamente he sido afortunada por encontrar en mi vida personas tan lindas y valiosas como ustedes, gracias por compartirme su bella amistad, las quiero muchísimo.

A Paoli, muchas gracias por brindarme tu hermosa amistad, de verdad estoy muy agradecida que siempre me escuches y me hagas reír o enojar, no sé qué haría sin ti, te quiero demasiado.

A Vero Torres, gracias por permitir que continúe con el proceso de titulación, y de verdad muchas gracias por la oportunidad que me otorgas al desempeñarme en mi puesto actual en el museo, y por la enorme paciencia que me tienes. Gracias por ser la gran líder que eres.

## CONTENIDO

RESUMEN.....	1
ABREVIATURAS.....	3
INTRODUCCIÓN.....	4
ANTECEDENTES .....	6
Situación taxonómica y generalidades de la familia Agavaceae .....	6
Género <i>Agave</i> .....	7
<i>Agave salmiana</i> Otto ex Salm-Dyck.....	8
<i>Agave obscura</i> Schiede .....	9
Características morfológicas y fisiológicas del género <i>Agave</i> .....	10
Reproducción sexual .....	11
Reproducción vegetativa.....	13
Importancia de los agaves .....	13
Importancia socioeconómica de <i>Agave salmiana</i> .....	17
Problemática de conservación del género <i>Agave</i> .....	18
Cultivo de tejidos vegetales (CTV) .....	21
Morfogénesis <i>in vitro</i> .....	22
Medio de cultivo .....	23
Reguladores de crecimiento vegetal (RCV).....	25
Carbón activado (CA) .....	26
Micropropagación.....	27
Etapas de la micropropagación .....	28
Cultivo <i>in vitro</i> de agaves .....	29
JUSTIFICACIÓN .....	31
OBJETIVOS .....	31
Objetivo general .....	31
Objetivos particulares .....	31
MATERIALES Y MÉTODOS .....	32
Desinfección de semillas .....	32
<i>Agave salmiana</i> .....	32
<i>Agave obscura</i> .....	33
Siembra <i>in vitro</i> de semillas .....	33
Obtención de explantes.....	34

Ensayo preliminar (MS sólido + BA/ANA) .....	35
Medio de inducción MS líquido y sólido .....	36
Control de la oxidación en <i>A. obscura</i> .....	37
Elongación y enraizamiento .....	37
Aclimatización .....	38
Análisis estadístico.....	39
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	40
Germinación <i>in vitro</i> de semillas .....	40
<i>Agave salmiana</i> .....	40
<i>Agave obscura</i> .....	44
Formación de brotes .....	47
<i>Agave salmiana</i> .....	48
<i>Agave obscura</i> .....	50
Formación de brotes en medio MS líquido y sólido.....	52
<i>Agave salmiana</i> .....	52
<i>Agave obscura</i> .....	57
Oxidación en cultivos de <i>Agave obscura</i> .....	64
Organogénesis indirecta .....	67
Enraizamiento y aclimatización.....	69
CONCLUSIONES.....	76
BIBLIOGRAFÍA.....	78
ANEXOS.....	89

## RESUMEN

Las especies del género *Agave* son altamente apreciadas por sus diversos usos, constituyen una fuente económica significativa y son sumamente importantes desde un punto de vista biológico. Debido a que son plantas sobreexplotadas y existe un alto disturbio de su hábitat, las poblaciones naturales continúan disminuyendo, por lo que es necesario aplicar alternativas para su reproducción y, así garantizar su conservación y aprovechamiento sostenible. El cultivo de tejidos vegetales representa una alternativa para su propagación, ya que es una herramienta biotecnológica que puede ser útil en la conservación de especies de importancia biológica, social y económica.

Se evaluó la efectividad del medio líquido comparado con el medio sólido para la inducción de un mayor número de brotes, explorando el potencial regenerativo de dos tipos de explantes extraídos de plántulas germinadas *in vitro* de *Agave salmiana* y *Agave obscura*.

Semillas desinfectadas de ambas especies se sembraron en medio Murashige y Skoog (MS) al 50% de macronutrientes, micronutrientes y sacarosa (MS50%) más carbón activado (CA) 1.5 g L<sup>-1</sup>. Para *A. salmiana*, el máximo porcentaje de germinación de semillas fue de 96.6% a los 21 días y en *A. obscura* no sobrepasó el 46.1% a los 18 días.

Plántulas de cinco meses se seccionaron para obtener explantes de tallo y la porción basal de las hojas, éstos fueron cultivados en MS líquido y sólido adicionado con Benciladenina (BA) (0-5 mg L<sup>-1</sup>) combinada con Ácido naftalenacético (ANA) (0-0.5 mg L<sup>-1</sup>).

En *A. salmiana* la mejor respuesta se obtuvo al cultivar tallos en MS líquido con BA 2 mg L<sup>-1</sup> (5 brotes/explante). En *A. obscura* la mejor respuesta fue en MS sólido con BA/ANA 3/0.5 mg L<sup>-1</sup> (12.8 brotes/explante de tallo). En ambas especies, los explantes de hoja mostraron su potencial regenerativo para la formación de brotes, sin embargo, el número fue muy bajo. En

## Propagación *in vitro* de *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck y *Agave obscura* Schiede (Agavaceae)

*A. obscura*, la sobrevivencia de alrededor del 30% de ambos tipos de explantes sembrados en medio líquido fue limitada por la oxidación que se presentó en los tejidos, en otro ensayo la oxidación disminuyó remojando los explantes previamente en una mezcla de ácido cítrico y ácido ascórbico durante 30 minutos antes de su cultivo en medio sólido.

Los brotes obtenidos en medio líquido se enraizaron en MS50% líquido con agrolita y los de medio sólido en MS50% con CA 1.5 g L<sup>-1</sup>.

Las plantas se aclimatizaron *ex vitro* utilizando un sustrato de tierra negra y agrolita (1:1). El porcentaje de sobrevivencia *ex vitro* alcanzó el 83.92% y 80.62% para *A. salmiana* y *A. obscura*, respectivamente.

## ABREVIATURAS

Ácido $\alpha$ -naftalenacético	ANA
Ácido 2,4-diclorofenoxiacético	2,4-D
Ácido abscísico	ABA
Ácido indolacético	AIA
Carbón activado	CA
Cultivo de tejidos vegetales	CTV
Embriogénesis somática	ES
Kinetina	KIN
Medio Murashige y Skoog (1962)	MS
Medio Schenk y Hildebrandt (1972)	SH
N <sup>6</sup> -Benciladenina	BA
N <sup>6</sup> -(meta-hidroxibencil) adenina	MT
Regulador de crecimiento vegetal	RCV
Tidiazuron	TDZ
Zeatina	Z

## INTRODUCCIÓN

México es el centro de origen y diversidad del género *Agave*, donde se distribuyen 261 especies, de las cuales 177 son endémicas, lo que significa que casi el 70% de las especies se encuentran solamente en México (García-Mendoza, 2011). Los agaves, también conocidos como magueyes, han sido cultivados desde tiempos prehispánicos por la gran variedad de usos y actualmente son la base de industrias para la producción de fibras y bebidas alcohólicas (Carrillo, 2007; Eguiarte y González, 2007), asimismo los agaves presentan componentes de interés médico (Allsopp *et al.*, 2013; Jasso-Padilla *et al.*, 2017) y ornamental, sin olvidar el papel preponderante que juegan en muchos ecosistemas de nuestro país (García-Mendoza, 1998).

*Agave salmiana* y *Agave obscura*, son especies de importancia industrial (pulque) y de potencial ornamental, respectivamente, de acuerdo a la NOM-059-SEMARNAT-2010 no se encuentran en alguna categoría de riesgo (SEMARNAT, 2010). No obstante, existen ejemplos de especies dentro del género *Agave* que han sido sobreexplotadas por su valor económico, como *A. tequilana* (obtención de bebidas alcohólicas) y *A. fourcroydes* (obtención de fibras), al punto de disminuir la variación genética en los cultivos de dichas especies (Colunga *et al.*, 1999; Gil *et al.*, 2001), aunado a la escasa resiembra y al lento crecimiento característico de estas plantas. Por lo anterior, resulta necesaria la búsqueda de alternativas y la aplicación de nuevas estrategias para la propagación de las especies del género *Agave*, tales como el cultivo de tejidos vegetales.

El cultivo de tejidos vegetales (CTV) es el conjunto de técnicas que permiten la siembra aséptica de células, tejidos u órganos aislados de la planta madre, bajo condiciones nutricionales y ambientales controladas (George, 2008; López y Olguín, 2013). El CTV se



## **Propagación *in vitro* de *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck y *Agave obscura* Schiede (Agavaceae)**

basa en la totipotencialidad que presentan las células para regenerar organismos completos (Zimmerman, 1993; Razdan, 2003). Considerando lo anterior, la biotecnología adquiere un papel significativo, ya que mediante ella se puede contribuir a la resolución de varios problemas que afectan la producción de aquellas especies que tienen un uso industrial (Domínguez, 2009). En el presente trabajo se evaluó el efecto del medio MS líquido y sólido para la propagación *in vitro* de *Agave salmiana* y *Agave obscura* como una alternativa para la generación de nuevas plantas a partir de tejidos de tallo y hoja.

## ANTECEDENTES

### Situación taxonómica y generalidades de la familia Agavaceae

Desde el 2003 el Grupo para la Filogenia de las Angiospermas II (acrónimo APG, del inglés *Angiosperm Phylogeny Group*), incluyó a Agavaceae (*sensu lato*) en la familia Asparagaceae del orden Asparagales.

Posteriormente, el APG III (2009) publicó que el número de familias reconocidas dentro del orden Asparagales pasaba de 26 a 14 familias, esta cifra, de acuerdo a Chase *et al.* (2009), era más manejable y facilitaba la comunicación entre los diferentes especialistas o usuarios; además con propósitos de enseñanza, era conveniente incluir a siete subfamilias dentro de Asparagaceae, entre ellas Agavoideae. Estos autores también reconocieron que la delimitación de la familia era difícil, ya que en ésta, la morfología y la citología es heterogénea, y existen pocos reportes moleculares de su filogenia.

García-Mendoza y Chávez-Rendón (2013) mencionan que estos estudios no son representativos, ya que están basados en el análisis de entre cinco y 10% de las especies que conforman a la familia Agavaceae (*sensu stricto*). Además, las filogenias de caracteres moleculares (Bogler y Simpson, 1995 y 1996; Bogler *et al.*, 2006) que se basan en las secuencias génicas de cloroplasto y núcleo *ndhF*, *rbcl* e *ITS*, apoyan la clasificación de la familia Agavaceae *sensu* Dahlgren *et al.* (1985). Tomando en cuenta el debate que aún existe entre los autores sobre la clasificación de este taxa, el presente trabajo seguirá el criterio de García-Mendoza y Chávez-Rendón (2013), ya que ellos consideran conveniente tratar al género *Agave* como parte de la familia Agavaceae *sensu* Dahlgren *et al.*, 1985.

## Propagación *in vitro* de *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck y *Agave obscura* Schiede (Agavaceae)

La familia Agavaceae (*sensu* Dahlgren *et al.*, 1985), está integrada por nueve géneros y es endémica de América, México es el centro de mayor riqueza y diversidad. Consta de 340 especies conocidas, y 261 (76%) de ellas se encuentran en la República Mexicana, de éstas, aproximadamente el 70% son endémicas (Eguiarte y González, 2007; García-Mendoza, 2011; García-Mendoza y Chávez-Rendón, 2013). Esta familia se distribuye desde el sur de Canadá (límites de la provincia de Alberta con Dakota del Norte, Estados Unidos) hasta Bolivia, incluyendo las islas del Caribe, desde las Bahamas hasta Aruba y, Trinidad y Tobago; su presencia en las islas Galápagos y Bermudas parece deberse a introducciones antropogénicas. En México, esta familia se observa en casi todos los ecosistemas, siendo particularmente abundante en las zonas semiáridas y templadas, y escasas en las regiones tropicales (García-Mendoza, 2004).

### **Género *Agave***

El género más diverso en la familia Agavaceae es *Agave*, que agrupa a 206 especies, de las que 159 se distribuyen en México con 119 endémicas (74%), siendo uno de los géneros más diversos de la flora nacional mexicana y el de mayor distribución geográfica en la familia, pues crece desde el sur de Estados Unidos hasta Colombia y Venezuela, incluyendo las islas del Caribe (Rocha *et al.*, 2006; García-Mendoza, 2011). Este endemismo de *Agave* se debe principalmente a los hábitats tan heterogéneos que presenta el país, los cuales difieren en clima, geología, topografía, altitud, entre otros factores ambientales. Además, este linaje surgió hace unos 8 millones de años en los territorios que vendrían a ser el Altiplano Mexicano, de este centro de origen sus especies se diversificaron y ampliaron su distribución debido a las propiedades intrínsecas del género como la plasticidad genética, la tolerancia ecológica, la capacidad de dispersión y las interacciones bióticas con otros organismos como

### **Propagación *in vitro* de *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck y *Agave obscura* Schiede (Agavaceae)**

los polinizadores (Rzedowski, 1968; García-Mendoza, 2002; Eguiarte y González, 2007; Rocha *et al.*, 2006; García-Mendoza, 2011).

Los agaves son plantas cuyas características fisiológicas y morfológicas les confieren una notable capacidad de adaptación a los ambientes áridos. Son plantas que pueden encontrarse en una gran diversidad de hábitats, incluyendo lugares montañosos de gran altitud. Se desarrollan tanto a nivel individual como poblacional sobre valles y planicies extensas con suelos aluviales, de profundidad y textura medias, y pH de neutro a ligeramente alcalino. Habitan en variados tipos de vegetación, destacando principalmente la vegetación xerófitas, los pastizales, los matorrales y los bosques (García-Herrera *et al.*, 2010).

#### ***Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck**

Son plantas en rosetas laxas y tamaños que van desde 1.50 m a 3.40 m de altura y 5 m de diámetro; hojas linear-lanceoladas, de color verde claro, a veces ligeramente blanquecinas, con una curvatura sigmoidea más o menos marcada; inflorescencia de 3.5 a 8 m de altura con 8 a 20 ramas, pedúnculo provisto de brácteas carnosas (Gentry, 1982; García-Mendoza, 2011). Es la especie de maguey más ampliamente explotada en la región pulquera que abarca desde Coahuila a Oaxaca (Galván, 1990). Es endémica de México, crece como planta silvestre, además de cultivada y domesticada en un gran número de sitios en el país (García-Mendoza, 2011) (Figura 1).



**Figura 1.** Plantas adultas de *Agave salmiana* en floración. Rancho La Soledad, Nanacamilpa. Tlaxcala (Imagen: Ana Laura López-Escamilla).

### ***Agave obscura* Schiede**

Son agaves de tamaño pequeño y mediano (50-100 cm), se pueden encontrar plantas individuales o de forma cespitosa (Figura 2), de color ligeramente verde a un verde oscuro, rosetas laxas, con numerosas hojas; ampliamente lineales a ovadas, a ligeramente acuminadas, rígidas, margen conspicuo. La inflorescencia es una espiga larga que mide de 3 a 5 m de altura, las flores tienen pedicelos cortos, de color púrpura oscuro, rojo o amarillo, la floración ocurre en junio, julio y agosto. Se distribuye en Veracruz, Puebla, Oaxaca, San Luis Potosí y Chiapas. Principalmente, es cultivada como una especie ornamental, y sus flores son comestibles (Gentry, 1982; Cházaro, 1989).



**Figura 2** Dos ejemplares de *Agave obscura* (→) en el Jardín Botánico del Instituto de Biología de la UNAM (Imagen: Rosa Mauricio Salgado).

### **Características morfológicas y fisiológicas del género *Agave***

Los agaves son plantas perennes con hojas dispuestas en espiral y arregladas en rosetas en el ápice de un tallo, el cual puede ser corto y apenas sobrepasar unos centímetros del suelo, mientras que en algunas especies puede ser largo y erecto alcanzando hasta los tres metros de altura. Las hojas por lo general son suculentas, fibrosas, con la base ensanchada y carnosas; su forma varía de linear a lanceolada u ovada, las hojas de las especies más pequeñas no exceden los veinte gramos de peso, mientras que las de los magueyes pulqueros (las especies de gran tamaño del género), llegan a pesar más de treinta kilos cada hoja; los márgenes de éstas exhiben una gran diversidad morfológica de dientes córneos, que son proyecciones del tejido foliar (pocas especies son inermes), cada hoja posee una espina terminal, su inflorescencia es espigada a racimosa (subgénero *Littaea*), o reunidas en

## Propagación *in vitro* de *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck y *Agave obscura* Schiede (Agavaceae)

panículas (subgénero *Agave*) (Gentry, 1982; Dahlgren *et al.*, 1985; García-Mendoza, 2007). Estas plantas presentan metabolismo CAM (metabolismo ácido de las crasuláceas, por sus siglas en inglés), en la noche abren los estomas para fijar CO<sub>2</sub> y durante el día los mantienen cerrados, evitando la pérdida excesiva de agua (Nobel *et al.*, 1996).

### Reproducción sexual

La mayoría de los agaves tienen un solo evento reproductivo, es decir, producen flores y frutos una sola vez en su vida y mueren, por lo que son plantas monocárpicas. Algunos agaves del grupo Polycephalae, por ejemplo *A. celsii* Hook, son policárpicos perennes, es decir, florecen varias ocasiones y no mueren después de fructificar. Durante su crecimiento las especies monocárpicas, acumulan recursos por periodos que puede variar entre ocho y 20 años, dependiendo de la especie, después del cual desarrollan una inflorescencia terminal o escapo (comúnmente conocido como quiote), los nutrientes almacenados en las hojas, eventualmente se traslocan hacia la inflorescencia (Gentry 1982; Cházaro, 1989; Arzate, 2009; Guillot *et al.*, 2009; Valencia *et al.*, 2012).

Las flores en el género *Agave* tienen diferentes grados de succulencia, son protándricas, hermafroditas, tubulares con ovario ínfero, poseen seis tépalos de coloración verdoso-amarillento, los seis estambres y el estilo son exsertos; en la base de la flor tubular se disponen tres nectarios que producen abundante néctar y tienen fragancias (García-Mendoza, 2007). El fruto es una cápsula seca, trilocular, con semillas dispuestas en hileras por lóculo, las semillas son negras y aplanadas (Gentry, 1982; García-Mendoza, 2007).

En todo el género se observan características asociadas con el síndrome de polinización por murciélagos (quiropterofilia) tales como flores largas, abiertas, desde tubulares profundas

### Propagación *in vitro* de *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck y *Agave obscura* Schiede (Agavaceae)

hasta en forma de tazón, verticales, con tépalos gruesos, producción de néctar nocturna y baja concentración de azúcar (Gentry, 1982). Algunas especies son visitadas por una gran variedad de polinizadores, que van desde insectos pequeños y vertebrados como aves (Rocha *et al.*, 2006).

Las inflorescencias que los agaves producen durante su reproducción sexual son sorprendentes tanto física como fisiológicamente, ya que la inflorescencia puede tener incrementos diarios de altura de más de 10 cm, tal crecimiento requiere cantidades considerables de agua, que proviene principalmente de las hojas (Nobel, 1988) por lo cual, subsecuente a la floración y producción de frutos, sobreviene la muerte de la planta.

En condiciones de campo, las especies de *Agave* producen miles de semillas, pero son escasas las que germinan y generan un individuo nuevo (García-Mendoza, 2007). Jordan y Nobel (1979) mencionan que en *Agave deserti* sólo una semilla, de entre 1.2 millones, logra desarrollarse en una planta madura.

El establecimiento de plántulas producto de la germinación de semillas o propagación de bulbilos de *A. deserti* y *A. macroacantha* requiere de temporadas húmedas y de la interacción ecológica conocida como nodricismo. Esto consiste en que las plantas adultas de una especie arbórea o arbustiva facilitan el establecimiento de plántulas de otras especies. Entre el uno al 10% de agaves que se establecen bajo plantas nodrizas pueden sobrevivir más de dos años, mientras que los establecidos sin esta protección mueren antes de cumplir un año, por ello los microhábitats proporcionados por las nodrizas son cruciales para la sobrevivencia de los agaves jóvenes (Jordan y Nobel, 1979; Hunter y Aarssen, 1988; Arizaga y Ezcurra, 2002).



## Reproducción vegetativa

Los agaves se propagan vegetativamente mediante la producción de hijuelos (producidos por rizomas) o bulbilos (pequeñas plantas derivadas de yemas axilares en las ramas de las inflorescencias). Los rizomas son tallos subterráneos que crecen lateralmente desde el tallo y finalmente emergen para dar lugar a un nuevo individuo (Gentry, 1982; Arzate, 2009), en esta vía de propagación, el tallo con entrenudos muy cercanos juega un papel importante, además de la forma de roseta, ya que son significativos en las relaciones hídricas de los rametos (clones, conectados al progenitor mediante un rizoma) (Nobel, 1988; Eguiarte y González, 2007). Tanto los hijuelos como los bulbilos son considerados clones.

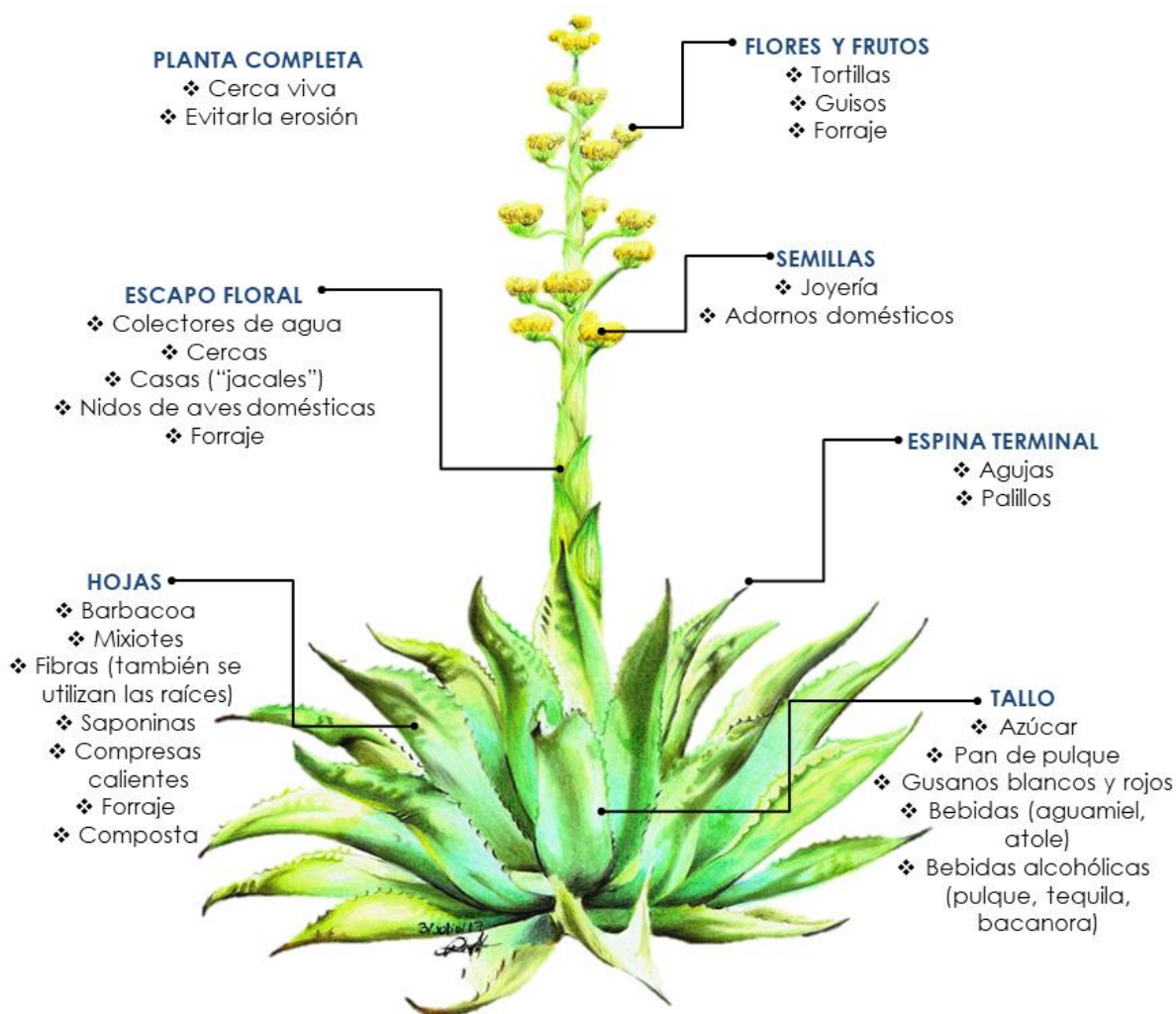
La producción de clones o clonalidad es considerada como una adaptación, ya que en el caso de especies anuales y/o monocárpicas es una opción ecológica que favorece la dispersión de un geneto (genotipo) en el tiempo y en el espacio, por ejemplo, permite que algunas especies anuales, inmóviles y monocárpicas se transformen en especies perennes, móviles y policárpicas. En las especies monocárpicas del género *Agave*, al producir hijuelos vegetativos, en cierto sentido, el geneto es iteróparo, es decir, que tiene varios ciclos reproductivos a lo largo de su vida. Además, la clonalidad es relativamente poco costosa, ya que no requiere generar los accesorios necesarios de la reproducción sexual para atraer polinizadores, como la producción de flores y recompensas como el néctar, los aromas y el polen para poder formar semillas (Mandujano, 2007).

## Importancia de los agaves

Las especies de *Agave* tienen gran importancia ecológica en México, ya que son componentes principales de los ecosistemas áridos y semiáridos predominantes en la mayor parte del territorio mexicano (Delgado-Lemus *et al.*, 2014), por ello los agaves destacan en

## Propagación *in vitro* de *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck y *Agave obscura* Schiede (Agavaceae)

México desde épocas prehispánicas, debido a su gran importancia económica y cultural para numerosos pueblos indígenas y mestizos, ya que los han aprovechado como fuente de alimento, bebida, medicina, combustible, ornato, ceremonial, textil, sustituto de jabón, abono, construcción de viviendas y elaboración de implementos agrícolas, entre otros usos (Nobel, 1988; García-Mendoza, 1998; Rocha *et al.*, 2006; García-Mendoza, 2007; García-Herrera *et al.*, 2010). Se reconocen más de 70 usos, algunos de ellos se mencionan en la Figura 3 y en el Anexo 1.



**Figura 3.** Principales productos que se obtienen y usos que se dan a las diferentes partes de una planta de agave (Ilustración por Rodolfo Castillo Rangel; productos y usos de las partes de la planta recopilados por Rosa Mauricio Salgado).

### Propagación *in vitro* de *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck y *Agave obscura* Schiede (Agavaceae)

Actualmente este recurso, aunque con problemas en su uso y manejo, recobra vigencia desde el punto de vista socioeconómico y agroecológico por los beneficios que trae a los pobladores del medio rural y al medio ambiente donde se desarrolla (García-Herrera *et al.*, 2010; Delgado-Lemus *et al.*, 2014).

A nivel internacional, los agaves son más conocidos por la producción de bebidas destiladas como el mezcal y el tequila, que se elaboran principalmente a partir de *A. angustifolia* y *A. tequilana*, respectivamente (Nobel, 1988). El aguamiel (savia dulce de los agaves) se fermenta para preparar la bebida alcohólica conocida como pulque, esta savia se obtiene de *A. salmiana*, *A. mapisaga*, *A. atrovirens* y *A. lehmannii*; estos agaves pulqueros, pueden alcanzar dos o más metros de altura y pueden vivir entre 10 y 15 años (Flores-Morales *et al.*, 2009). En cultivos destinados a la industria de licores, los agricultores cortan la inflorescencia, lo cual después de algunos meses permite que se acumulen azúcares y agua en el tallo, recursos que de otra manera estarían destinados a la producción de flores y néctar (Rocha *et al.*, 2006; Eguiarte y González, 2007). No obstante, evitar el desarrollo de las flores, frutos y semillas, disminuye la posible contribución sexual de los individuos (Delgado-Lemus *et al.*, 2014), lo que reduce la variabilidad genética en las poblaciones.

Las fibras extraídas de los agaves tienen alta durabilidad, como el ixtle y el henequén obtenidas principalmente de *Agave sisalana*, *A. lechuguilla* y *A. fourcroydes* (González *et al.*, 2004; García-Mendoza, 2011). Se ha estudiado la posibilidad de extraer otros productos además de fibras de las hojas de los agaves, por ejemplo, Gaona y Montañez (2017), lograron la extracción de pectina de residuos de las hojas de *A. lechuguilla* obteniendo un rendimiento del 15%, esto es una alternativa para el uso de las hojas como aditivo en la industria alimentaria.

### Propagación *in vitro* de *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck y *Agave obscura* Schiede (Agavaceae)

Adicionalmente se pueden extraer esteroides (saponinas en un 2% de su peso seco; para productos farmacéuticos), jarabes con altos contenidos de fructosa y derivados de inulina para la producción de prebióticos (Robert *et al.*, 2006)

Los magueyes también se emplean como sustrato para la obtención de insectos comestibles como las larvas de las hormigas *Liometopum apiculatum* y *L. occidentale* (coloquialmente conocidos como escamoles), gusano blanco (*Acentrocne me hesperiaris*) y gusano rojo (*Hypopta agavis*) (también llamado “chinicuil”), los cuales son considerados de gran valor nutritivo por su contenido de carbohidratos y proteínas, además de ser apreciados como platillos exóticos, cuyos precios en el mercado llegan a ser elevados (García-Herrera *et al.*, 2010).

Asimismo, el maguey constituye una de las mejores opciones forrajeras, se utilizan las hojas e incluso el tallo para darlo como suplemento a los animales proporcionándoles altos niveles de carbohidratos, minerales y agua, los cuales cubren los requisitos de mantenimiento y producción de ganado (García-Herrera *et al.*, 2010).

Los agaves han sido exportados de México a Europa como plantas ornamentales, principalmente *A. americana* y *A. victoria-reginae* (Nobel, 1988). Cházaro (1989) reportó el uso de *A. obscura* como planta de ornato en Veracruz, donde los magueyes pequeños son muy apreciados y vendidos en la época navideña para adornar los nacimientos, además del uso comestible de sus flores.

Por otra parte, los agaves son especies clave en los ecosistemas, tanto por su abundancia como por la cantidad de recursos que proporcionan a otros organismos; lo mismo retienen suelo que son sustento para el humano, y también son sumamente importantes en interacciones bióticas con aves, insectos y mamíferos como los murciélagos, por lo tanto

## Propagación *in vitro* de *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck y *Agave obscura* Schiede (Agavaceae)

donde hay abundancia y diversidad de estas plantas existe una alta biodiversidad, que es el caso de muchas de las regiones de aprovechamiento de los magueyes (Rocha *et al.*, 2006; Carrillo, 2007; Eguiarte y González, 2007; García-Mendoza, 2007; Telo, 2017).

### Importancia socioeconómica de *Agave salmiana*

Los cultivos de *A. salmiana* son aprovechados para elaborar pulque (bebida fermentada producida a partir de la savia de las plantas); de hecho, el "aguamiel" que es la savia dulce, se suele consumir directamente como bebida (Nobel, 1988), en esta savia se encuentra el hierro y zinc en concentraciones adecuadas para cubrir requerimientos diarios para el humano (Silos-Espino *et al.*, 2011). Recientemente se evaluó el uso del aguamiel y pulque como complejo orgánico en el cultivo *in vitro* de plantas, Rosas (2018) observó que aquellos tratamientos que contenían alguna concentración de pulque fueron mejores respecto a los tratamientos sin la adición del complejo orgánico; el agregar un complejo orgánico al medio de cultivo tiene un efecto favorable, posiblemente debido a la gran cantidad de sustancias como aminoácidos, carbohidratos y proteínas que el pulque contiene.

Además, a partir de este maguey se elabora el azúcar natural (miel de agave) de gran poder edulcorante, que en otros países se usa para endulzar alimentos, sueros y medicamentos para diabéticos (Flores-Morales *et al.*, 2009). Asimismo, las inflorescencias, los tallos y las hojas son comestibles. Entre sus usos gastronómicos, la cutícula de las hojas y las hojas de *A. salmiana* sirven como envoltorio de bocadillos de carne (Nobel, 1988), dichos platillos son conocidos en México como "mixiotes" y "barbacoa", respectivamente.

Por otra parte, existen nuevos estudios científicos que aportan más conocimiento hacia el consumo de productos extraídos de *A. salmiana* como los prebióticos, los cuales confieren

## **Propagación *in vitro* de *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck y *Agave obscura* Schiede (Agavaceae)**

efectos benéficos para la salud a través de la modulación de la microbiota intestinal (Jasso-Padilla *et al.*, 2017).

El maguey pulquero es un recurso natural de gran importancia en México, especialmente en la región del Altiplano comprendida por los estados de Tlaxcala, Hidalgo, Puebla y Estado de México. Su cultivo y aprovechamiento data de la época prehispánica y de él dependen económicamente un gran número de familias campesinas (Flores-Morales *et al.*, 2009) y actualmente ha adquirido una gran demanda comercial.

### **Problemática de conservación del género *Agave***

En agaves, la alta facilidad de propagación mediante clones asegura homogeneidad en los cultivos, lo cual es muy importante para obtener fibras o azúcares, ya que simplifica y hace más eficiente la producción (Colunga *et al.*, 1999; Gil *et al.*, 2001). No obstante, existen problemas asociados con la propagación vegetativa de los agaves. Por un lado, la nula variación genética puede provocar la pérdida total mediante la muerte de las plantas, debido a enfermedades producidas por bacterias, hongos e insectos (Eguiarte, 2007; Eguiarte y González, 2007), estas enfermedades se transmiten fácilmente a la siguiente generación de clones y se dispersan por el hombre (Arizaga y Ezcurra, 2002; Robert *et al.*, 2006). Por ejemplo, las plantas de los cultivos de producción del henequén (*A. fourcroydes* y *A. angustifolia*) y tequila (*A. tequilana*), constituyen uno solo genotipo en sus respectivas poblaciones (Colunga *et al.*, 1999; Gil *et al.*, 2001). Otro problema asociado con la clonalidad, es que un agave sólo produce 25 rizomas sanos durante un periodo de cinco años, por lo cual no hay una producción suficiente para la demanda comercial de estas plantas (Robert *et al.*, 2006).

### Propagación *in vitro* de *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck y *Agave obscura* Schiede (Agavaceae)

En el caso de *A. salmiana*, es una planta sobreexplotada, además tiene una baja reproducción vegetativa (de cinco a seis hijuelos por planta al año), sin embargo, uno de los inconvenientes es su lento crecimiento, deben pasar varios años para que un hijuelo alcance tallas comercialmente adecuadas (Malda y Ruiz, 2004). Otra vía de propagación es la sexual, para ello la planta debe tener cerca de 15-20 años y dar lugar a la floración, la cual puede ocurrir si no es cortado el escapo floral para la producción de aguamiel, y si se logra la polinización y posterior fecundación, puede ser que las semillas no prosperen por el deterioro acelerado de su hábitat que ha generado condiciones inadecuadas para la germinación (Peña-Valdivia *et al.*, 2006; García-Herrera *et al.*, 2010; Silos-Espino *et al.*, 2011).

En 1975, el *Centro de Investigación y Fomento del Maguey y el Nopal* (CIFMN) estimaba que la reserva de magueyes del Altiplano mexicano era de 50 millones y en 1985 sólo se contaba con 10 millones, esto debido a su explotación irracional y clandestina, aunado a las escasas e inadecuadas plantaciones, además de las políticas tendientes a sustituir el uso de las fibras por otras sintéticas y del pulque con otras bebidas de mayor impacto comercial, como las destiladas (Escobar, 1985). Todavía, se considera que la población magueyera es muy reducida, quizás un poco más de 50 mil ejemplares, de los cuales casi la décima parte se conserva en jardines botánicos y reservas ecológicas (Malda y Ruiz, 2004; Flores-Morales *et al.*, 2009).

En la actualidad, la cosecha de *A. salmiana* para fines comerciales, es de alto riesgo en el mantenimiento de las comunidades bióticas de las que forman parte, es común que esta extracción ocurra sin planificación e incluso de forma ilegal, y con pocas acciones dirigidas a recuperar y conservar las poblaciones afectadas. Además, las tasas actuales de utilización de *A. salmiana* parecen ser insostenibles y perjudiciales para sus poblaciones. El uso comercial

## Propagación *in vitro* de *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck y *Agave obscura* Schiede (Agavaceae)

de las comunidades nativas debe ir acompañado de un plan de conservación para asegurar que esta especie pueda continuar proporcionando sus importantes funciones socio-ecológicas (Martínez-Salvador *et al.*, 2012; Delgado-Lemus *et al.*, 2014).

Existen especies de *Agave* en peligro de extinción, por lo tanto, es necesario establecer políticas públicas que marquen un orden en el manejo del recurso, dando la importancia que requieren estas especies (García-Herrera *et al.*, 2010). Del género *Agave* actualmente se encuentran enlistadas 18 especies en la NOM-059-SEMARNAT-2010 (SEMARNAT, 2010), de éstas, seis especies se encuentran en la categoría de “amenazada”, nueve especies en “sujeta a protección especial” y tres en “peligro de extinción”.

Por medio del cultivo de tejidos vegetales (CTV) varios miles de plantas clonales pueden propagarse en pocos meses a partir de una sola planta madre. No obstante, el CTV también permite el uso de técnicas para generar e introducir nueva variabilidad genética mediante la generación de nuevos híbridos o mutantes, si este fuera el caso deseado. Los métodos descritos en el CTV proporcionan la selección de materiales de alto rendimiento, y la rápida propagación de alta calidad (elite) (Robert *et al.*, 2006; Domínguez, 2009). Se requiere de programas de mejoramiento en agaves, con técnicas de propagación *in vitro* donde se integren o simplemente se propaguen características deseables para el productor o la industria, tales como: el crecimiento rápido; producción de hojas sin espinas, y con más y mejor fibra; mayor rendimiento en peso y en contenido de azúcares; resistencia a la sequía, la humedad y a las enfermedades, entre otras (García-Herrera *et al.*, 2010).

El CTV representa una alternativa viable para la propagación y conservación *ex situ* de especies vegetales y adquiere un mayor valor si éstas se encuentran en alguna categoría de amenaza. La disponibilidad de plantas en peligro de extinción para el mercado, procedentes



## Propagación *in vitro* de *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck y *Agave obscura* Schiede (Agavaceae)

de cultivo *in vitro* disminuiría la demanda comercial, la presión de colecta y, por lo tanto, permitiría la recuperación de las poblaciones afectadas (López *et al.*, 1996, Malda *et al.*, 1999; Iriundo, 2001; Moebius-Goldammer *et al.*, 2003; Gómez, 2008; López y Olgúin, 2013).

### Cultivo de tejidos vegetales (CTV)

El cultivo de tejidos vegetales es el conjunto de técnicas que permiten cultivar células, tejidos u órganos aislados de la planta madre, bajo condiciones nutricionales y ambientales controladas, incluye técnicas y métodos utilizados para la investigación de muchas disciplinas botánicas y tiene varios objetivos prácticos (Celestino *et al.*, 2005; George, 2008; López y Olgúin, 2013). El proceso básico en cultivo de tejidos consiste en tomar una pequeña porción de la planta madre (explante), colocarlo en condiciones de crecimiento *in vitro* (un ambiente aséptico), promoviendo su proliferación, y luego transferir el brote a un ambiente *ex vitro* (Pietropaolo, 1981; López y Olgúin, 2013).

El cultivo de tejidos vegetales se basa en la totipotencialidad que presentan las células para regenerar organismos completos (Zimmerman, 1993; Razdan, 2003; López y Olgúin, 2013). La totipotencia celular se define como la capacidad que tiene cualquier célula para dar origen a todos los tipos de células diferenciadas de un organismo dado, así como la regeneración del mismo organismo (Razdan, 2003; Gahan, 2007, Taiz y Zeiger, 2006).

Las plantas han sido propagadas asexualmente desde hace muchos años por medio de estacas, esquejes e injertos. El cultivo de tejidos añade una nueva dimensión a la propagación vegetativa, al proporcionar un medio de multiplicación rápido en un corto espacio de tiempo, utilizando una pequeña cantidad de tejido de la planta madre (Pietropaolo, 1981; López y Olgúin, 2013).

## **Propagación *in vitro* de *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck y *Agave obscura* Schiede (Agavaceae)**

El cultivo de tejidos constituye una herramienta valiosa de la biotecnología vegetal, ya que explora condiciones que promueven la división celular y la reprogramación genética en condiciones *in vitro* y es considerado una herramienta importante, tanto para la ciencia básica, como para estudios aplicados; así mismo, en proyectos comerciales, tiene diversas aplicaciones como la conservación de germoplasma, el mejoramiento genético, la producción de metabolitos secundarios, la producción de semillas artificiales y la micropropagación de especies de interés hortícola y ornamental (Celestino *et al.*, 2005; López y Olguín, 2013).

### **Morfogénesis *in vitro***

La morfogénesis es el proceso que da origen a todos los cambios en la forma y estructura de los organismos (Phillips, 2004). La formación de nuevos órganos tales como brotes (tallos) y raíces pueden ser inducidos en tejidos cultivados *in vitro*, tales órganos se dice que son adventicios. Al desarrollo de estos brotes, de los que antes carecía, se denomina morfogénesis u organogénesis (George, 2008).

Existen tres diferentes rutas para la morfogénesis *in vitro*. Una es a partir de yemas preexistentes, cuya proliferación y crecimiento son promovidos; otra es la organogénesis o formación *de novo* de órganos en los explantes cultivados, por ejemplo: hojas, raíces y tallos adventicios, estos últimos llamados brotes; y mediante la embriogénesis somática, cuando se producen embriones a partir de células somáticas (Phillips, 2004; López y Olguín, 2013, Lema-Ruminska y Kulus, 2014).

La organogénesis y la embriogénesis pueden ocurrir de forma directa, cuando los órganos o embriones se forman sobre el tejido cultivado y/o indirecta, cuando los tejidos pasan por una fase de callo, del cual van a surgir las estructuras regeneradas. Un callo es definido como una

## Propagación *in vitro* de *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck y *Agave obscura* Schiede (Agavaceae)

masa desorganizada e irregular de células desdiferenciadas, formada por su división continua e incontrolada. El callo puede variar en textura, apariencia y tasa de crecimiento dependiendo de la especie, tipo de explante y composición del medio (Taiz y Zeiger, 2006; George, 2008; López y Olgúin, 2013). Dependiendo de las condiciones *in vitro* en donde se desarrolle el explante, además de las vías de organogénesis se pueden generar desórdenes fisiológicos como la hiperhidratación, así como la oxidación de los tejidos y su necrosis (Domínguez, 2009).

### Medio de cultivo

Para inducir la morfogénesis *in vitro*, los explantes se inoculan en medios de cultivo, éstos suministran los nutrimentos necesarios para el crecimiento *in vitro* (Razdan, 2003; George y De Klerk, 2008). La base de todos los medios nutritivos es una mezcla de sales minerales, combinando los macronutrimentos y los micronutrimentos esenciales, adicionando una fuente de carbono, usualmente sacarosa. Sin embargo, debido al estrés asociado durante la desinfección superficial y disección de los explantes, pocos medios de cultivo son capaces de mantener los tejidos vivos, por lo tanto, se requiere agregar otros suplementos tales como vitaminas, aminoácidos y reguladores de crecimiento vegetal (RCV) (Ramage y Williams, 2002).

Para establecer un sistema de cultivo de tejidos, se elabora un medio óptimo que se ajuste a los principales requerimientos nutricionales de la especie vegetal, al tipo de explante; la efectividad del medio de cultivo depende tanto de los ingredientes básicos (nutrimentos, sacarosa y RCV) como del agente gelificante, en el caso del uso de medio sólido. El uso de agar es muy común en CTV, sin embargo, este agente gelificante contiene muchas impurezas que pueden alterar las características químicas y físicas del medio, afectando directamente

### **Propagación *in vitro* de *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck y *Agave obscura* Schiede (Agavaceae)**

los tejidos y células cultivados (López-Escamilla *et al.*, 2016). Algunas alternativas al uso del agar son: agarosa, alginato, Gelrite® y Phytigel® e incluso se ha optado por el uso de medio líquido (Szabados *et al.*, 1993). Algunos tejidos muestran una mejor respuesta en medio sólido mientras que otros en un medio líquido (Razdan, 2003).

Cabe destacar que en medio líquido a menudo se observan tasas de crecimiento más rápidas que en medio solidificado con agar. Los cultivos pueden ser sumergidos completamente o sólo parcialmente en el medio líquido (Hvoslef-Eide y Preil, 2005; Thorpe *et al.*, 2008), esto último se consigue con el uso de soportes como papel filtro y algodón. El medio líquido, sin estructuras de soporte, pero con la necesidad del uso de mesas de agitación, se utiliza para el cultivo de protoplastos, células o sistemas de raíces para la producción de metabolitos secundarios, y la proliferación de embriones somáticos y nódulos meristemáticos (Thorpe *et al.*, 2008). Además, la etapa de enraizamiento y aclimatización se ven favorecidas con el uso del medio líquido, ya que es fácil removerlo de las raíces y así disminuir el riesgo de contaminación por residuos que el medio sólido puede dejar en las raíces (George y Davies, 2008).

El uso de medio líquido permite que los explantes se puedan colocar en un volumen suficiente de medio para evitar el agotamiento de los nutrientes y permitir la dispersión de las toxinas que podrían ser producidas por los explantes, lo cual en el medio sólido no es posible, ya que dichas toxinas no se pueden dispersar por la naturaleza sólida del medio (Thorpe *et al.*, 2008). Es importante mencionar que, en el caso de presentarse contaminación, ésta se desarrollará en el medio líquido de forma rápida y se dispersará y, es probable que conduzca a la pérdida total del cultivo (Hvoslef-Eide y Preil, 2005).

## **Propagación *in vitro* de *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck y *Agave obscura* Schiede (Agavaceae)**

El crecimiento y desarrollo en medio líquido pueden verse afectados por la concentración de oxígeno, que a menudo es insuficiente para satisfacer las necesidades respiratorias de las células y los tejidos sumergidos. La hiperhidratación es la formación *in vitro* de órganos anormales, que son frágiles y tienen una apariencia de agua acumulada en sus tejidos (George y De Klerk, 2008). La hiperhidratación en los cultivos *in vitro* está relacionada con la alta humedad relativa presente en la atmósfera de los frascos (Kevers *et al.*, 2004), por lo tanto, se deben tomar medidas para evitarla (Hvoslef-Eide y Preil, 2005), como añadir al medio osmoreguladores, tales como manitol, maltosa y sorbitol. Otra alternativa para aumentar la oxigenación del medio es utilizar sistemas de inmersión temporal, un método automatizado, en el que los tejidos se encuentran sumergidos en el medio por un período y, la subsecuente renovación de la atmósfera gaseosa (Thorpe *et al.*, 2008).

En comparación con los sistemas de cultivo basados en el uso de agar, los sistemas líquidos son más adaptables a la automatización y, por tanto, adecuados para la reducción de la mano de obra y los costos, ya que el medio puede cambiarse (o renovarse) fácilmente, y la limpieza de los recipientes de cultivo se simplifica (Hvoslef-Eide y Preil, 2005; George y Davies, 2008).

### **Reguladores de crecimiento vegetal (RCV)**

Algunas sustancias químicas que se sintetizan naturalmente dentro de los tejidos vegetales (es decir, endógenamente), tienen un papel de regulación en el crecimiento y el desarrollo, en lugar de un papel nutricional. Estos compuestos, que son generalmente activos en concentraciones muy bajas, se conocen como hormonas vegetales. Los productos químicos sintéticos con actividades fisiológicas similares a las hormonas vegetales usualmente se denominan reguladores de crecimiento vegetal (RCV), los cuales pueden ser adicionados (exógenamente) a los medios de cultivo para diversos objetivos (Malda *et al.*, 1999;

## **Propagación *in vitro* de *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck y *Agave obscura* Schiede (Agavaceae)**

Machakova *et al.*, 2008). Este tipo de sustancias se pueden clasificar principalmente en auxinas, giberelinas, citocininas, ácido abscísico, etileno, brasinoesteroides, poliaminas, ácido jasmónico y ácido salicílico (Calva y Pérez, 2005).

Los reguladores de crecimiento vegetal más usados en CTV son las auxinas y citocininas. La eficacia de las auxinas sintéticas ha sido ampliamente probada y demostrada, estas inducen el crecimiento de callo, la embriogénesis somática, el enraizamiento de los brotes y la organogénesis, promueven el alargamiento celular, pero inhiben la diferenciación (Gaspar *et al.*, 1996). De las auxinas, el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) es la más usada para la inducción y mantenimiento de callo debido a que suprime severamente la organogénesis (Calva y Pérez, 2005). Las citocininas, promueven el desarrollo de brotes adventicios y axilares, el crecimiento celular, la diferenciación celular y la organogénesis (Gaspar *et al.*, 1996); y pueden también evitar el envejecimiento celular (Calva y Pérez, 2005).

### **Carbón activado (CA)**

El carbón activado a menudo se usa en CTV para mejorar el crecimiento y el desarrollo celular, dichos efectos pueden deberse principalmente a la adsorción de sustancias inhibitorias en el medio de cultivo, disminuyendo los metabolitos tóxicos y la exudación de fenoles (Pan y van Staden, 1998; Thomas, 2008), por ejemplo, en cultivos donde se observa oxidación de los explantes, se puede incrementar el porcentaje de supervivencia de estos tejidos al utilizar el CA (Thomas, 2008).

Entre otros efectos que se le atribuyen al CA está la alteración del pH del medio hasta un nivel óptimo para la morfogénesis, y el oscurecimiento de los medios de cultivo, estableciendo así un ambiente oscuro que simula las condiciones del suelo (Thomas, 2008; Thorpe *et al.*, 2008).

### **Propagación *in vitro* de *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck y *Agave obscura* Schiede (Agavaceae)**

Se debe recordar también que las plantas requieren de minerales para su crecimiento, por lo cual las sustancias presentes de forma natural en el CA pueden estar involucradas en una serie de actividades estimulantes que promueven el crecimiento (Thomas, 2008).

El CA puede adsorber reguladores del crecimiento de las plantas, incluido el ácido abscísico (Thomas, 2008), lo que probablemente pueda influir en la germinación *in vitro* de semillas. Cabe recordar que la latencia de las semillas se debe principalmente a altos niveles de ácido abscísico presente en estas, y muchos tipos de semillas germinan cuando el ácido abscísico se elimina o inactiva de alguna manera (Campbell y Reece, 2007).

La adición del CA al medio de cultivo puede beneficiar o tener un efecto adverso en el crecimiento y desarrollo, ya que también puede adsorber sustancias esenciales requeridas para el crecimiento de los tejidos (Thomas, 2008); sin embargo, los efectos positivos o negativos del uso del CA en el medio de cultivo, dependen del medio, el tejido usado y/o los objetivos del investigador (Pan y van Staden, 1998).

### **Micropropagación**

El término micropropagación se utiliza para referirse a la multiplicación masiva de plantas genéticamente idénticas (clones) a la planta madre, en tiempos relativamente cortos y por medio de cultivos sucesivos hasta su transferencia a suelo, permitiendo así la obtención de plantas con mayor homogeneidad y calidad, libres de microorganismos y, difíciles de obtener por métodos de cultivo convencionales (Calva y Pérez, 2005; López y Olgúin, 2013; Lema-Ruminska y Kulus, 2014). La micropropagación es una herramienta útil tanto en la protección de especies en peligro de extinción como en la producción comercial, ya que es a menudo

## Propagación *in vitro* de *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck y *Agave obscura* Schiede (Agavaceae)

más rápida y más barata que el cultivo tradicional, con lo cual ha ido ganando popularidad en la industria hortícola (Lema-Ruminska y Kulus, 2014).

### Etapas de la micropropagación

La micropropagación consta de cinco etapas (López *et al.*, 1996; George y Debergh, 2008; López y Olgúin, 2013):

- **Etapa 0.** Selección y preparación de la planta madre. Antes de comenzar la micropropagación se debe prestar atención a la selección de la planta madre, ésta debe estar libre de cualquier síntoma de enfermedad. El crecimiento, la morfogénesis y las tasas de propagación *in vitro* se pueden mejorar por el tratamiento previo con sustancias antisépticas. También pueden ser necesarios procedimientos para detectar, reducir y/o eliminar las enfermedades bacterianas y virales.

- **Etapa I.** Establecimiento de cultivos asépticos. El siguiente paso es obtener cultivos asépticos del material vegetal seleccionado. El éxito en esta etapa requiere principalmente que los explantes se transfieran en un entorno libre de contaminantes microbianos. Después de un corto periodo de incubación cualquier recipiente contaminado, ya sea en los explantes o en el medio se descarta.

- **Etapa II.** Proliferación de los regenerantes. El objetivo de esta etapa es proliferar los nuevos brotes, para cuando sean separados del cultivo sean capaces de dar lugar a plantas completas. Algunos de los brotes producidos durante esta etapa pueden utilizarse como nueva fuente de explantes para posteriores ciclos de multiplicación, por lo general pueden ser subcultivados para aumentar su número.



## Propagación *in vitro* de *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck y *Agave obscura* Schiede (Agavaceae)

- **Etapa III.** Elongación y enraizamiento de brotes y/o germinación de los embriones somáticos. Los brotes multiplicados en la etapa II son pequeños, sin embargo, no son capaces de crecer autosuficientemente en el suelo. En la etapa III, se induce el crecimiento individual o grupos de plántulas, capaces de llevar a cabo la fotosíntesis, y la supervivencia sin un suministro artificial de carbohidratos. El enraizamiento de brotes, por lo general, es necesario inducirlo por medios de cultivo especiales o métodos para la formación de raíces. En el caso de los embriones somáticos, éstos pueden germinar y continuar su crecimiento; por su naturaleza bipolar no se requiere promover su enraizamiento, sino su maduración para que puedan establecerse como plántulas.

- **Etapa IV.** Transferencia y aclimatización *ex vitro*. Las plantas salen del ambiente *in vitro* al ambiente externo y son transferidas a un sustrato. Si no se realiza con cuidado, la transferencia puede resultar en una pérdida significativa del material. Esta etapa requiere de cuidados para que las plantas no mueran por la pérdida excesiva de agua o por el ataque de microorganismos.

### Cultivo *in vitro* de agaves

Debido a la importancia socioeconómica de los agaves, los protocolos para su propagación *in vitro* han sido reportados desde la década de los 80's. En la tabla 1 se muestra en resumen las características experimentales y los resultados que se han obtenido en algunos trabajos de cultivo *in vitro* de agaves.

**Propagación *in vitro* de *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck y *Agave obscura* Schiede (Agavaceae)**

**Tabla 1.** Trabajos realizados para la propagación *in vitro* de diferentes especies del género *Agave*.

Especie	Explante	Medio de inducción y RCV (mg L <sup>-1</sup> )	Respuesta	Medio de enraizamiento (mg L <sup>-1</sup> )	Aclimatización (sustrato)	Sobrevivencia (%)	Referencia
<i>Agave fourcroydes</i>	Rizoma y tallo	SH + BA (10, 25)/ 2,4-D (0.25)	Brotos por OI y OD	MS (KNO <sub>3</sub> 5mgL <sup>-1</sup> , NH <sub>4</sub> N03 1mgL <sup>-1</sup> )+ 2,4 D (0.025, 1 mg L <sup>-1</sup> )	Tierra y agrolita (1:1)	NR	Robert <i>et al.</i> , 1987
<i>A. arizonica</i>	Hoja (secciones basales)	MS + BA (1)/ANA (1), 2,4-D (0.3) (inducción callo)	Brotos por OI	MS	Sustrato comercial	90	Powers y Backhaus, 1989
<i>A. cantala</i> <i>A. fourcroydes</i> <i>A. sisalana</i>	Tallo (parte central y basal)	MS + ANA (0.075)/AIB (0.1)/ KIN (0.5)	Brotos por OI	MS	Arena	95	Binh <i>et al.</i> , 1990
<i>A. sisalana</i>	Rizoma y hoja (secciones laterales)	MS, SH + BA(0.5, 1)	Brotos por OD	SH (10 g de sacarosa)	Tierra y arena (1:1)	97.6	Das, 1992
<i>A. victoria-reginae</i>	Hoja	MS con vitaminas L2, + 2,4-D (0.3)	Plántulas por ESD	MS50% y SH50%	NR	90	Rodríguez-Garay <i>et al.</i> , 1996
<i>A. sisalana</i>	Rizoma y tallo	MS, SH, Gamborg y White con vitaminas MS, + KIN (0.5 y 1)/ANA (0.2)	Brotos OD y OI	MS 50% líquido (arena fina)	Suelo "condiciones naturales"	NR	Nikam, 1997
<i>A. parrasana</i>	Tallo (parte basal)	MS + BA (3)/ 2,4-D (0.009)	Brotos por OI	NR	NR	NR	Santacruz-Ruvalcaba <i>et al.</i> , 1999
<i>A. sisalana</i>	Rizoma y hojas jóvenes	MS + BA (6 y 8)	Brotos por OI	MS + AIA (2)	Vermiculita y peat moss (1:1) no estériles	"Satisfactorio"	Hazra <i>et al.</i> , 2002
<i>A. victoria-reginae</i>	Tallo (parte basal)	MS + BA (0.5, 1) y MS + 2,4-D (0.5, 1)	Plántulas por ESI y Brotos por OI	MS	Tierra, perlita y arena (1:1:1)	92	Martínez-Palacios <i>et al.</i> , 2003
<i>A. sisalana</i>	Tallo (parte basal)	MS + 2,4-D (0.2)/ BA (1)	Plántulas por ESI y Brotos por OI	MS50%	Tierra y arena (1:1)	100	Nikam <i>et al.</i> , 2003
<i>A. angustifolia</i>	Tallo (Segmentos centrales)	MS + BA (1)	Brotos por OD	MS al 75% + AIB (0.75)	NR	NR	Enríquez del Valle <i>et al.</i> , 2005

Propagación *in vitro* de *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck y *Agave obscura* Schiede (Agavaceae)

Tabla 1.-Continuación

Especie	Explante	Medio de inducción y RCV (mg L <sup>-1</sup> )	Respuesta	Medio de enraizamiento (mg L <sup>-1</sup> )	Aclimatización (sustrato)	Sobrevivencia (%)	Referencia
<i>A. atrovirens</i>	Hoja (Secciones basales)	MS + BA (1.5)/ 2,4-D (1.5)	Brotos por OI	NR	NR	NR	Toribio, 2005
<i>A. tequilana</i>	Tallo y hojas (parte basal)	MS + BA (10)/ 2,4-D (0.3)	Brotos por OI	MS	Tierra	100	Valenzuela-Sánchez <i>et al.</i> , 2006
<i>A. vera-cruz</i>	Tallo (ápices), cotiledones y epicotilo	MS con vitaminas L2, + 2,4-D (1) MS + Z (.2)/ ANA (1) y 40 g L <sup>-1</sup> sacarosa	Plántulas por ESI	MS	Tierra, arena y sustrato comercial (1:1:1)	95	Tejavathi <i>et al.</i> , 2007
<i>A. tequilana</i>	Tallo (parte basal)	MS con vitaminas L2, + BA (5,10,15)/2,4-D (1)	Plántulas por ESI	MS	NR	95-100	Portillo <i>et al.</i> , 2007
<i>A. inaequidens</i>	Tallo	MS + BA (3)	Brotos por OD	MS	Peat moss (60%) y perlita (40%)	100	Aureoles-Rodríguez <i>et al.</i> , 2008
<i>A. cupreata</i> <i>A. difformis</i> <i>A. karwinskii</i> <i>A. obscura</i> <i>A. potatorum</i>	Tallo (parte basal)	MS + TDZ (0.1-0.2); MT (0.5, 2)	Brotos por OD y Plántulas por ESD	MS	Tierra y arena (1:1)	En promedio 72, para <i>A. obscura</i> 100	Domínguez <i>et al.</i> , 2008 Domínguez, 2009
<i>A. tequilana</i> <i>A. duranguensis</i> <i>A. salmiana subespecie crassispina</i>	Tallo	MS semisólido modificado (KNO <sub>3</sub> y NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> : 0.5mg L <sup>-1</sup> ) + BA (10) y 2,4-D (1.5)	Brotos por OI	NR	NR	NR	Ramírez-Malagón <i>et al.</i> , 2008
<i>A. obscura</i> <i>A. pigmaea</i> <i>A. victoria-reginae</i>		MS + BA (0.1-6)/AIB (0.01-0.5)					

**Propagación *in vitro* de *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck y *Agave obscura* Schiede (Agavaceae)**

Tabla 1.- Continuación

Especie	Explant	Medio de inducción y RCV (mg L <sup>-1</sup> )	Respuesta	Medio de enraizamiento (mg L <sup>-1</sup> )	Aclimatización (sustrato)	Sobrevivencia (%)	Referencia
<i>A. tequilana</i>	Callo embriogénico	MS líquido modificado (NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 0.5mg L <sup>-1</sup> ) con vitaminas L2, hidrolizado de caseína (250) y glutamina (500)	Plántulas por ESI	MS	NR	90	Santacruz-Ruvalcaba y Portillo, 2009
<i>A. salmiana</i>	Tallo y hoja (incluyendo el cotiledón)	MS + BA (2)/2,4-D (0.5), BA (1)/2,4-D (1), BA(1)/2,4-D (0.5)	Brotos por OD y OI, Plántulas por ESI	MS 50% y SH 50%	Tierra negra + tepojal 1:1	44	Gómez, 2010
<i>A. tequilana</i>	Hoja	MS + BA (10)/2,4-D (0.025) MS y SH + BA (0.3)/2,4-D (3)	Plántulas por ESI	MS y SH	NR	NR	Rodríguez- Sahagún <i>et al.</i> , 2011
<i>A. salmiana</i>	Tallo	MS + BA (2)/AIA (0.25)	Brotos por OD	MS + AIA (0.2)	NR	100	Silos-Espino <i>et al.</i> , 2011
<i>A. fourcroydes</i>	Tallo (segmentos transversales)	MS + vitaminas L2 + Dicamba (0.5); Picloram (0.5)	Plántulas por ESD	MS50%	Vermiculita y tierra (3:1)	85	Monja-Mio y Robert, 2013
<i>A. victoria-reginae</i>	Tallo	MS50% líquido + TDZ (0.05)/BA (1)	Brotos por OD	NR	NR	NR	Montejo y Núñez, 2016

**Propagación *in vitro* de *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck y *Agave obscura* Schiede (Agavaceae)**

Tabla 1.- Continuación

Especie	Explante	Medio de inducción y RCV (mg L <sup>-1</sup> )	Respuesta	Medio de enraizamiento (mg L <sup>-1</sup> )	Aclimatización (sustrato)	Sobrevivencia (%)	Referencia
<i>A. cocui</i>	Tallo (base) y Hoja (segmentos basales y segmentos medios) de bulbilos	MS + BA (0.3)/ 2,4-D (2)	Callo	NR	NR	NR	Chirino <i>et al.</i> , 2017
<i>A. duranguensis</i>	Tallo	MS50% líquido + KIN (10)/AIB (3)	Brotos por OD	NR	NR	NR	Flores y Muñoz, 2017

2,4-D: Ácido 2,4-diclorofenoxiacético

AIA: Ácido indolacético

AIB: Ácido Indolbutírico

ANA: Ácido α-naftalenacético

BA: N<sup>6</sup>-Benciladenina

ESD: Embriogénesis Somática Directa

ESI. Embriogénesis Somática Indirecta

KIN: Kinetina

MS: Medio Murashige y Skoog (1962)

MT: N<sup>6</sup>-(meta-hidroxibencil) adenina

NR: No Reportado

OD: Organogénesis Directa

OI: Organogénesis Indirecta

SH: Medio Schenk y Hildebrandt (1972)

TDZ: Tiazuron

Z: Zeatina

## Propagación *in vitro* de *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck y *Agave obscura* Schiede (Agavaceae)

En la propagación *in vitro* en el género *Agave*, las especies que destacan por el número de investigaciones realizadas son: *A. sisalana*, *A. tequilana*, *A. fourcroydes* y *A. victoria-reginae*, esta última incluida en la NOM-059-SEMARNAT-2010 (SEMARNAT, 2010) en la categoría de “En peligro de extinción”. La mayoría de los reportes se han establecido con aquellas especies consideradas cultivadas, como las que se utilizan para la producción de tequila (*A. tequilana*), de mezcal (*A. atrovirens*, *A. cupreata*, *A. inaequidens*, *A. karwinskii*, *A. potatorum*), de aguamiel y pulque (*A. duranguensis*, *A. salmiana*) y obtención de fibras (*A. angustifolia*, *A. cantala*, *A. sisalana*, *A. vera-cruz*, *A. fourcroydes*); además de otras poblaciones silvestres que son sobreexplotadas por la variedad de usos que se le pueden dar a la planta, incluyendo el uso ornamental (*A. arizonica*, *A. difformis*, *A. obscura*, *A. parrasana*, *A. pigmaea*, *A. victoria-reginae*).

En cuanto a las condiciones experimentales utilizadas, predomina el uso del medio MS sólido; el medio líquido se reportó para la inducción de embriogénesis somática en *A. tequilana* (Santacruz-Ruvalcaba y Portillo, 2009) y la inducción de brotes por organogénesis directa en *A. victoria-reginae* (Montejo y Nuñez., 2016) y *A. duranguensis* (Flores y Muñoz, 2017).

Los RCV que más se han empleado son auxinas (2,4-D, ANA, AIB, picloram y dicamba) y citocininas (BA, KIN, TDZ, 2iP y MT), y de éstas han sido ampliamente reportados el 2,4-D y la BA.

Para la obtención de explantes se han ocupado principalmente los tallos y las hojas, y en menor uso el rizoma y bulbilos.

La formación de brotes por organogénesis directa e indirecta, así como la embriogénesis somática, fueron las respuestas morfogénicas obtenidas.

### **Propagación *in vitro* de *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck y *Agave obscura* Schiede (Agavaceae)**

La elongación y enraizamiento de brotes, o en dado caso la maduración y germinación de embriones somáticos, fue promovida principalmente utilizando medios sólidos; sólo en *A. sisalana* (Nikam, 1997) reportó el uso de medio líquido para el enraizamiento de brotes, además son pocas las investigaciones que reportan el uso de RCV para promover la formación de raíces. Respecto al establecimiento de las plantas obtenidas en las diversas investigaciones, los porcentajes de sobrevivencia se encuentran entre el 44 y 100%.

Se ha demostrado que el cultivo de tejidos vegetales ha sido eficiente en la propagación de las especies del género *Agave*. Si bien ya existen reportes para la propagación de *A. salmiana* y *A. obscura*, en el presente trabajo se exploró la respuesta de los explantes cultivados de ambas especies en medio sólido y líquido.

## JUSTIFICACIÓN

Debido a que *Agave obscura* y *Agave salmiana* son especies que han sido utilizadas con fines ornamentales, y en la explotación para la elaboración de bebidas, aunado a la vulnerabilidad de sus hábitats por el cambio de uso de suelo, sus poblaciones en el campo han disminuido. Resulta indispensable establecer estrategias para la conservación de estas especies, tales como la propagación por cultivo de tejidos vegetales. Por lo anterior, el presente trabajo explora la respuesta *in vitro* de las dos especies en medio sólido y líquido, proponiéndose como una alternativa viable para la propagación y obtención de individuos que pueden ser destinados a la elaboración de productos comerciales y al mismo tiempo promover su conservación.

## OBJETIVOS

### Objetivo general

- Inducir la formación de brotes *in vitro* en *Agave salmiana* y *Agave obscura*

### Objetivos particulares

- Promover la germinación *in vitro* de semillas de *A. salmiana* y *A. obscura*.
- Determinar la mejor concentración de citocinina/auxina en medio sólido y líquido para inducir la formación de brotes a partir de explantes de plántulas germinadas *in vitro*.
- Determinar el tipo de explante más regenerativo.
- Promover el enraizamiento de los brotes y su posterior aclimatización.



## MATERIALES Y MÉTODOS

### Desinfección de semillas

#### *Agave salmiana*

Se utilizaron semillas de *Agave salmiana* (Figura 4a) colectadas en mayo de 2011 en el municipio de Pinos, Zacatecas; se almacenaron en bolsas de papel encerado a una temperatura de 5°C hasta su siembra en 2014. Las semillas fueron donadas por la Dra. Ana Laura López Escamilla del Laboratorio Regional de Biodiversidad y Cultivo de Tejidos Vegetales, Unidad Tlaxcala, del Instituto de Biología de la UNAM (IB-UNAM).

Las semillas fueron colocadas en un crisol de porcelana y escarificadas sumergiéndolas durante cinco segundos (repetición 1) y durante diez segundos (repetición 2) en ácido sulfúrico concentrado (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Después, con la ayuda de una piceta, se enjuagaron con agua destilada, y posteriormente se lavaron en una solución de agua destilada con tres gotas de detergente líquido comercial Salvo® (“libre de cloro”) durante 20 minutos. Al término, se enjuagaron de nuevo con agua destilada, y se desinfectaron en etanol al 70% (v/v) durante un minuto y después con una solución de hipoclorito de sodio al 1.8% (cloro comercial Cloralex® al 30% v/v) adicionado con Tween 80 (3 gotas/50 mL) durante 30 minutos. Todo el proceso se llevó a cabo en agitación constante, excepto la escarificación. Por último, en condiciones asépticas, en una campana de flujo laminar, se enjuagaron tres veces con agua destilada esterilizada, un minuto cada enjuague.

### ***Agave obscura***

Las semillas de *Agave obscura* (Figura 4b) fueron colectadas en junio de 2011 en Coyomeapan, Puebla, y almacenadas en bolsas de papel encerado a una temperatura de 5°C hasta su siembra en 2014. Las semillas fueron donadas por el Dr. Abisaí García Mendoza del Jardín Botánico del IB-UNAM.

No se realizó escarificación, ya que en una prueba exploratoria de germinación se observó que no era necesario para esta especie (A. Y. Pérez, comunicación personal, 2014). Las semillas se lavaron en 50 mL de agua destilada con tres gotas de detergente líquido comercial Salvo® (“libre de cloro”) durante 20 minutos. Las semillas se enjuagaron con agua destilada y se desinfectaron primero con etanol al 70% (v/v) durante un minuto, y después con una solución de hipoclorito de sodio al 1.2 % (cloro comercial Cloralex® al 20% v/v) adicionado con Tween 80 (3 gotas/50 mL) durante 30 minutos. Todo el proceso se llevó a cabo en agitación continua. En condiciones asépticas, en la campana de flujo laminar, las semillas se enjuagaron tres veces con agua destilada esterilizada, un minuto cada enjuague.



**Figura 4.** Semillas de *Agave salmiana* (a) y *Agave obscura* (b) (Barra 0.5cm).

durante 20 minutos. Las semillas se enjuagaron con agua destilada y se desinfectaron primero con etanol al 70% (v/v) durante un minuto, y después con una solución de hipoclorito de sodio al 1.2 % (cloro comercial Cloralex® al 20% v/v) adicionado con Tween 80 (3 gotas/50 mL) durante 30 minutos. Todo el proceso se llevó a cabo en agitación continua. En condiciones asépticas, en la campana de flujo laminar, las semillas se enjuagaron tres veces con agua destilada esterilizada, un minuto cada enjuague.

### **Siembra *in vitro* de semillas**

Para ambas especies, el medio de germinación de las semillas fue Murashige y Skoog (1962) a la mitad de concentración de macro y micronutrientes (MS50%), sacarosa 15 g L<sup>-1</sup>, carbón

### Propagación *in vitro* de *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck y *Agave obscura* Schiede (Agavaceae)

activado (CA) 1.5 g L<sup>-1</sup>, pH 5.7-5.8 y agar bacteriológico Bioxon<sup>®</sup> 8 g L<sup>-1</sup> (Anexo 2). El medio de cultivo fue esterilizado en una autoclave a 121°C y 1.5 Kg/cm<sup>2</sup> durante 18 minutos.

Para *A. salmiana* se sembraron 120 semillas con dos repeticiones (240 semillas en total), y para *A. obscura* 120 semillas con tres repeticiones (360 semillas en total).

Se sembraron cinco semillas por frasco (tipo Gerber<sup>®</sup> con 25-30 mL de medio MS50%) y fueron incubadas en una cámara de ambiente controlado con temperatura de 25±2°C, fotoperiodo 16/8 h y 30-40 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> de intensidad luminosa.

El porcentaje de germinación se evaluó diariamente durante 30 días. Se consideró semilla germinada cuando emergió la radícula.

#### **Obtención de explantes**

Se seleccionaron plántulas germinadas *in vitro*, con una edad entre cuatro y seis meses a partir de la fecha de siembra, y longitud de 3 a 4 cm (Figura 5a y 5c). Por cada plántula se extrajo un explante de tallo y tres explantes de hoja, la raíz y el cotiledón se eliminaron. El tallo se obtuvo al remover las hojas que lo envolvían. Los explantes de hoja correspondieron al primer medio centímetro del extremo basal de la misma (Figura 5b, 5d).



**Figura 5.** Obtención de explantes. Plántula de *A. salmiana* (a) y *A. obscura* (c) de cinco meses de edad. Plántulas disecadas de *A. salmiana* (b) y *A. obscura* (d) donde se muestran los explantes de tallo (T), segmentos basales de hoja (H), cotiledón (C) y raíces (R). Barra= 1 cm

### Ensayo preliminar (MS sólido + BA/ANA)

En el cultivo *in vitro* del género *Agave* se han utilizado diferentes explantes (tallos, hojas, cotiledones y rizomas), distintos medios de cultivo (MS, SH, Gamborg y White) y reguladores de crecimiento (BA, 2,4-D, ANA, KIN, TDZ, AIA) en distintas concentraciones. De acuerdo con lo anterior, se realizó un ensayo exploratorio utilizando los explantes (tallos y hojas), el medio de cultivo (MS) y reguladores de crecimiento (BA y ANA) que han mostrado buenos resultados, lo que ha sido reportado en la literatura (Tabla 1).

Se utilizaron cinco concentraciones puntuales de BA/ANA (0.5/0.1, 3/0, 3/1 y 5/1 mg L<sup>-1</sup>) incluyendo el grupo control (0/0), estas combinaciones se adicionaron a medio MS sólido con sacarosa 30 g L<sup>-1</sup>, pH 5.7-5.8, y agar bacteriológico Bioxon® 8 g L<sup>-1</sup>. Se emplearon explantes de tallo y segmentos basales de hoja de plántulas de 16 meses de edad de *A. salmiana* y de plántulas de seis meses de edad de *A. obscura*. Para cada tratamiento hormonal se

## Propagación *in vitro* de *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck y *Agave obscura* Schiede (Agavaceae)

sembraron cinco explantes de tallo y 15 explantes de hoja, se colocaron 5 explantes por frasco.

Los cultivos se incubaron a  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ , fotoperiodo 16/8 h luz/oscuridad e intensidad luminosa de  $30\text{-}40\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Se evaluaron semanalmente durante cinco meses para observar las respuestas morfogénicas.

### Medio de inducción MS líquido y sólido

Explantes de tallo y segmentos basales de hoja de ambas especies se sembraron en medio MS líquido o sólido suplementados con BA (0, 0.5, 1, 2, 3, 5  $\text{mg L}^{-1}$ ) y ANA (0 y 0.5  $\text{mg L}^{-1}$ ), pH 5.7-5.8, sacarosa 30  $\text{g L}^{-1}$ , agar Bioxon<sup>®</sup> 8  $\text{g L}^{-1}$  (medio sólido) y puentes de papel filtro para el medio líquido, haciendo un total de 12 tratamientos para cada tipo de medio.

El número de explantes de tallo varió de acuerdo a la disponibilidad de plántulas con la talla (3-4 cm de altura) y edad (4-6 meses) adecuadas, mientras que para los explantes de hoja estuvo en función del número de hojas desarrolladas por cada plántula. En *A. salmiana* en cada tratamiento de medio líquido se sembraron siete explantes de tallo y 21 explantes de hoja, y doce explantes de tallo y 30 explantes de hoja en medio sólido. En *A. obscura*, se sembraron cinco explantes de tallo y 20 explantes de hoja por cada tratamiento en ambos medios MS (líquido y sólido).

Los explantes se incubaron a  $25^{\circ}\pm 2\text{C}$ , fotoperiodo 16/8 h luz/oscuridad, e intensidad luminosa de  $30\text{-}40\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Los cultivos se revisaron semanalmente durante cinco meses para observar las respuestas morfogénicas.

### **Control de la oxidación en *A. obscura***

En el caso de los tejidos que fueron cultivados en medio MS sólido se empleó en ellos una solución antioxidante, compuesta de la mezcla de ácido ascórbico y ácido cítrico, ambos a una concentración de 250 mg L<sup>-1</sup>, pH 5.8, que se esterilizó por filtración empleando membranas Millipore® de 0.45 µm. Ambos tipos de explantes fueron remojados 30 minutos en la solución antioxidante previo a su siembra en medio sólido.

### **Elongación y enraizamiento**

Para promover la elongación y el enraizamiento, los brotes obtenidos fueron subcultivados a un medio basal, sin reguladores del crecimiento. Los brotes procedentes del ensayo preliminar fueron transferidos a medio MS sólido después de permanecer cinco meses en el medio de inducción.

Los brotes generados en los diferentes tratamientos hormonales fueron individualizados y subcultivados después de permanecer cinco meses en el medio de inducción. Los procedentes de medio MS sólido, a medio MS a la mitad de su concentración de macro y micronutrientes, sacarosa 15 g L<sup>-1</sup>, pH 5.7-5.8, agar bacteriológico Bioxon® 8 g L<sup>-1</sup> y carbón activado (CA) 1.5 g L<sup>-1</sup> (MS50% sólido), mientras que los brotes procedentes del medio de inducción MS líquido se transfirieron a frascos Gerber® con Agrolita® (agrolita) humedecida con 25 mL de medio MS50% líquido.

Los brotes que mostraron signos de hiperhidratación fueron subcultivados en medio MS50% sólido con CA 1.5 g L<sup>-1</sup>.

Los cultivos permanecieron cinco meses en incubación a 25±2°C, con fotoperiodo 16/8 h luz/oscuridad y 30-40 µmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> de intensidad luminosa.

## Aclimatización

Las raíces de los brotes se lavaron con agua destilada y se sumergieron durante cinco minutos en fungicida Captan ( $1\text{gL}^{-1}$ ); sin enjuagar esta última solución, se sembraron en charolas de plástico transparente con tapa. El sustrato empleado fue una mezcla de agrolita y tierra negra (1:1), el cual se esterilizó a  $121^{\circ}\text{C}$  y  $1.5\text{ Kg/cm}^2$  durante 15 minutos.

Antes de ser llevados a un invernadero todos los brotes enraizados fueron pre-aclimatizados en un cuarto de incubación ( $28\text{-}30^{\circ}\text{C}$ , 16/8 h luz/oscuridad y  $30\text{-}40\ \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ ). En el caso de *A. salmiana*, los brotes enraizados en MS sólido y MS líquido con agrolita permanecieron cinco meses, los que enraizaron en MS50%+CA sólido sólo un mes. Los brotes de *A. obscura* enraizados en MS líquido con agrolita y MS50%+CA sólido se pre-aclimatizaron cinco meses, mientras que los del ensayo preliminar un mes. Los primeros dos meses, las charolas permanecieron cerradas, al tercer mes se perforaron las tapas de las charolas, y a los cuatro meses la tapa de la charola se abrió ligeramente (3 cm de apertura).

Concluido el tiempo correspondiente en el cuarto de incubación, se llevaron al invernadero de la Facultad de Ciencias de la UNAM, en donde las charolas permanecieron destapadas por completo. Después de un año, las plantas se transfirieron a bolsas individuales. En todos los casos, durante los primeros dos meses, se regaron aproximadamente cada tres días vigilando que el sustrato no estuviese muy húmedo para disminuir la posibilidad de contaminación fúngica, cuando esto se presentó, la parte afectada se roció con Captan ( $1\text{ g L}^{-1}$ ). En los últimos tres meses el riego se hizo una vez por semana.

## Análisis estadístico

### ❖ Germinación de semillas

Se registró diariamente el número de semillas germinadas durante un mes. Se consideró como criterio de germinación la emergencia de la radícula. Los resultados son presentados como porcentaje. Para la obtención del porcentaje de germinación se dividió el número de semillas germinadas (NSG) entre el número de semillas sembradas, y el cociente se multiplicó por 100 como se muestra en la siguiente fórmula:

$$\text{Germinación (\%)} = \frac{NSG}{NSS} \times 100$$

Se realizó una prueba T-student para muestras independientes, para determinar el mejor tratamiento de escarificación en las semillas de *A. salmiana*.

### ❖ Inducción de brotes

Se obtuvieron el promedio y error estándar del número de brotes por cada tratamiento hormonal y medio de cultivo. Se realizó una prueba de normalidad (Shapiro-Wilk) para comprobar la distribución normal, y debido a que los datos no presentaron una distribución normal se transformaron logarítmicamente usando la fórmula  $X = \ln(X+1)$ . Para comparar los datos entre grupos, se utilizó la prueba ANOVA y la prueba *post hoc* de Tukey para encontrar las diferencias significativas entre grupos (entre tratamientos y medios de cultivo). Los análisis y las gráficas se elaboraron con el programa SPSS Statistics ver. 24 (2016) y las gráficas con Microsoft Excel (2010).

En la figura 6 se puede observar de manera general la metodología seguida en este trabajo.



Propagación *in vitro* de *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck y *Agave obscura* Schiede (Agavaceae)

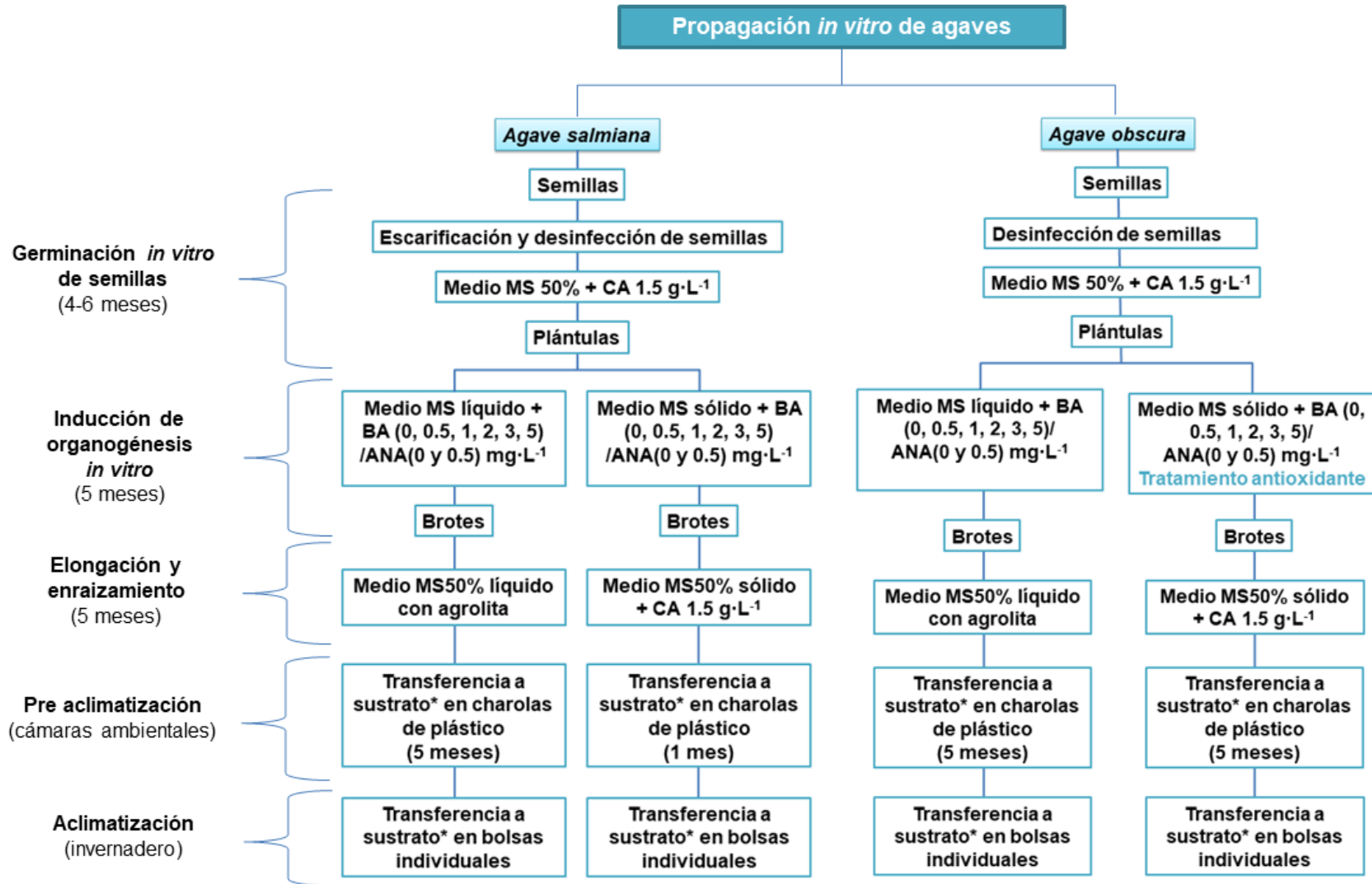


Figura 6. Método para la propagación *in vitro* de *Agave salmiana* y *Agave obscura*.

\*El sustrato utilizado fue tierra negra y Agrolita® (1:1).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

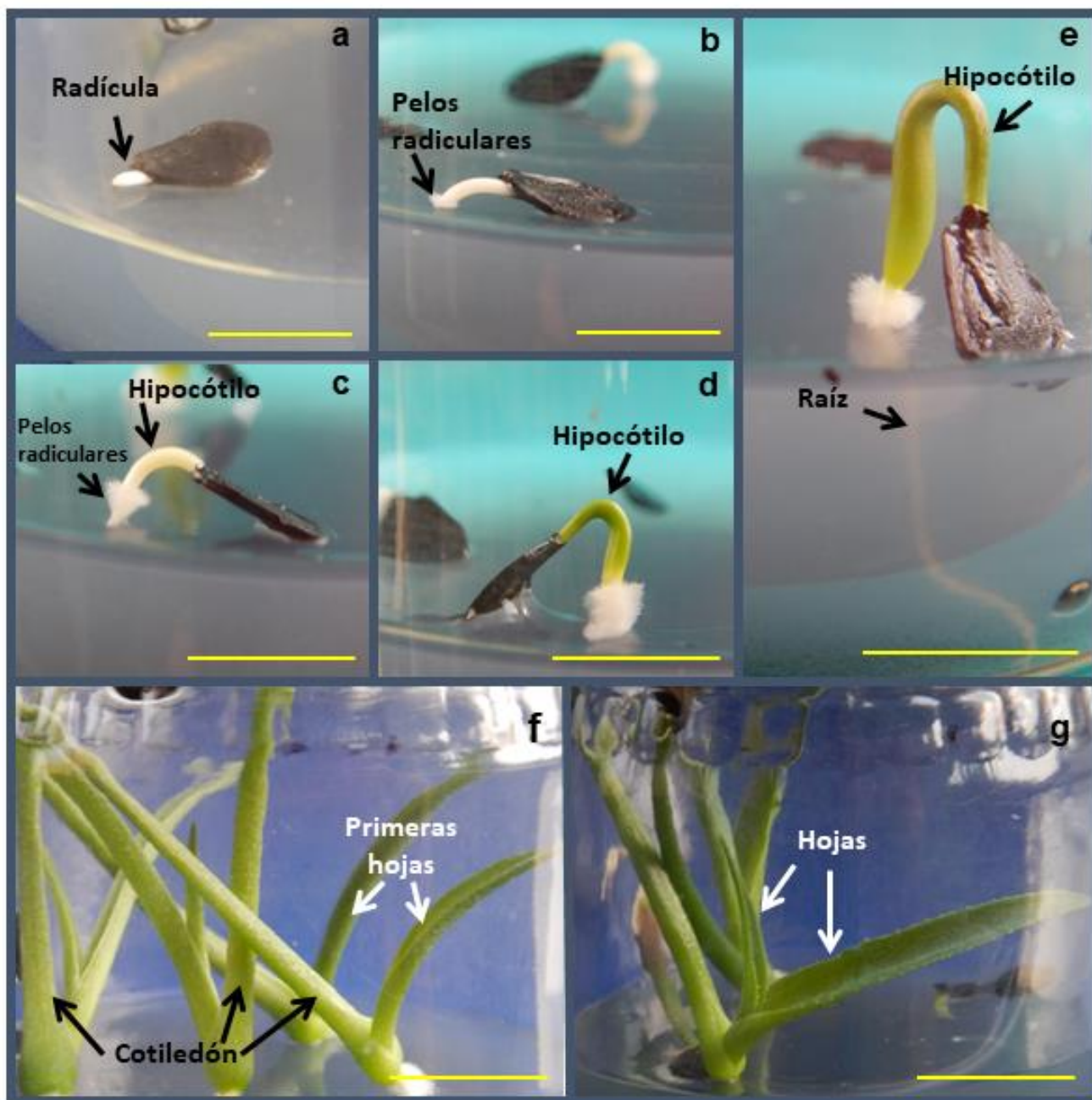
### Germinación *in vitro* de semillas

Las técnicas de desinfección empleadas para ambas especies fueron exitosas debido a que no se presentó contaminación.

#### *Agave salmiana*

La germinación de las semillas de *A. salmiana* inició con el rompimiento de la cubierta seminal y la emergencia de la radícula, en promedio, a los cinco días de cultivo (Figura 7a), a partir de la radícula se comenzaron a formar pelos radiculares en los primeros siete días (Figura 7b), posteriormente surgió el hipocótilo de color blanco (Figura 7c) que después de diez días se tornó a color verde (Figura 7d); a los 12 días la raíz se introdujo dentro del medio de cultivo (Figura 7e). Dos semanas después de la germinación, el cotiledón alcanzaba un intervalo de longitud de 4-5 cm. A la cuarta semana el epicótilo inició su crecimiento y se desarrolló la primera hoja (Figura 7f y 7g). A los cinco meses, las plántulas medían de 3-4 cm de altura y habían desarrollado varias hojas.

En esta especie las semillas germinaron rápido y se registraron altos porcentajes de germinación (93 y 96%) lo que indica que después de tres años de su colecta y almacenamiento las semillas conservaron su viabilidad, reiterando lo que menciona Sánchez-Urdaneta *et al.* (2002), que las semillas de *A. salmiana* no presentan latencia, y su germinación es rápida y uniforme. El tiempo de la emergencia de la radícula (cinco días de cultivo) coincide con lo reportado para la misma especie por Peña-Valdivia *et al.* (2006).



**Figura 7.** Germinación y desarrollo de plántulas *in vitro* de *A. salmiana* en medio MS50%. Se señala con flechas: emergencia de la radícula (a), desarrollo de pelos radiculares e hipocótilo (b, c, d, e), desarrollo del cotiledón (f), primeras hojas a partir del epicótilo (g) (Barra= 1 cm).

Malda y Ruiz (2004), reportan la emergencia de la radícula de *A. salmiana* a los tres días de cultivo en medio MS adicionado con 7/1 mg L<sup>-1</sup> BA/ANA y en medio MS basal a los cinco días.

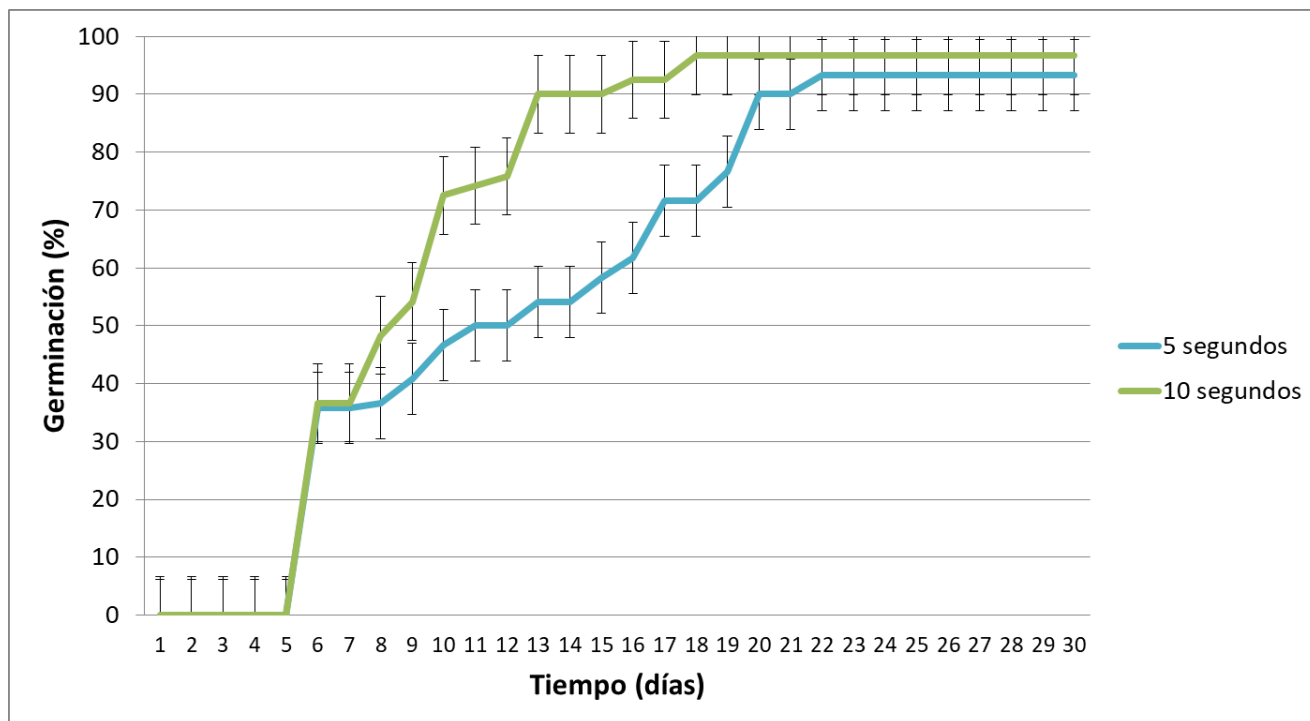
### Propagación *in vitro* de *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck y *Agave obscura* Schiede (Agavaceae)

Si bien, en este caso el uso de RCV acortó el inicio de la germinación *in vitro*, éstos no son estrictamente necesarios para que ocurra este proceso en *A. salmiana*.

De los ensayos de escarificación con ácido sulfúrico concentrado ( $H_2SO_4$ ) realizados en *A. salmiana*, se registró el 93.33% de germinación con cinco segundos de escarificación y el 96.66% con 10 segundos. Para ambos tratamientos el inicio de la germinación fue al quinto día. Con el tratamiento de cinco segundos la germinación se fue incrementando paulatinamente durante el tiempo de incubación; en cambio, con el tratamiento de 10 segundos, se observaron dos incrementos importantes: del quinto al octavo día (37%) y del décimo al décimo tercer día (72% a 90%), logrando su asíntota a los 21 días (96.66%), menor tiempo registrado que con el tratamiento de cinco segundos que la adquiere hasta el día 21 con 93.33% de germinación (Gráfica 1). Estadísticamente, la prueba T-student indicó que no existen diferencias significativas ( $T=4.443$ ,  $P>0.05$ ) entre los tratamientos de escarificación. Con cinco segundos de escarificación en promedio se obtuvieron  $71.90\pm 6.35$  semillas germinadas, y con 10 segundos  $85.41\pm 6.60$  semillas.

Los porcentajes de germinación *in vitro* fueron similares a los reportados por Malda y Ruiz (2004) con *A. salmiana*, donde obtuvieron el 87% utilizando medio MS, para la misma especie Gómez (2010) reportó el 93% en medio MS50%. En ambos trabajos no emplearon carbón activado ni la escarificación. De acuerdo a lo anterior, las semillas de *A. salmiana* no requieren de la escarificación para su germinación *in vitro*, sin embargo, ésta puede promover un mayor porcentaje y acortar el tiempo de este proceso.

## Propagación *in vitro* de *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck y *Agave obscura* Schiede (Agavaceae)

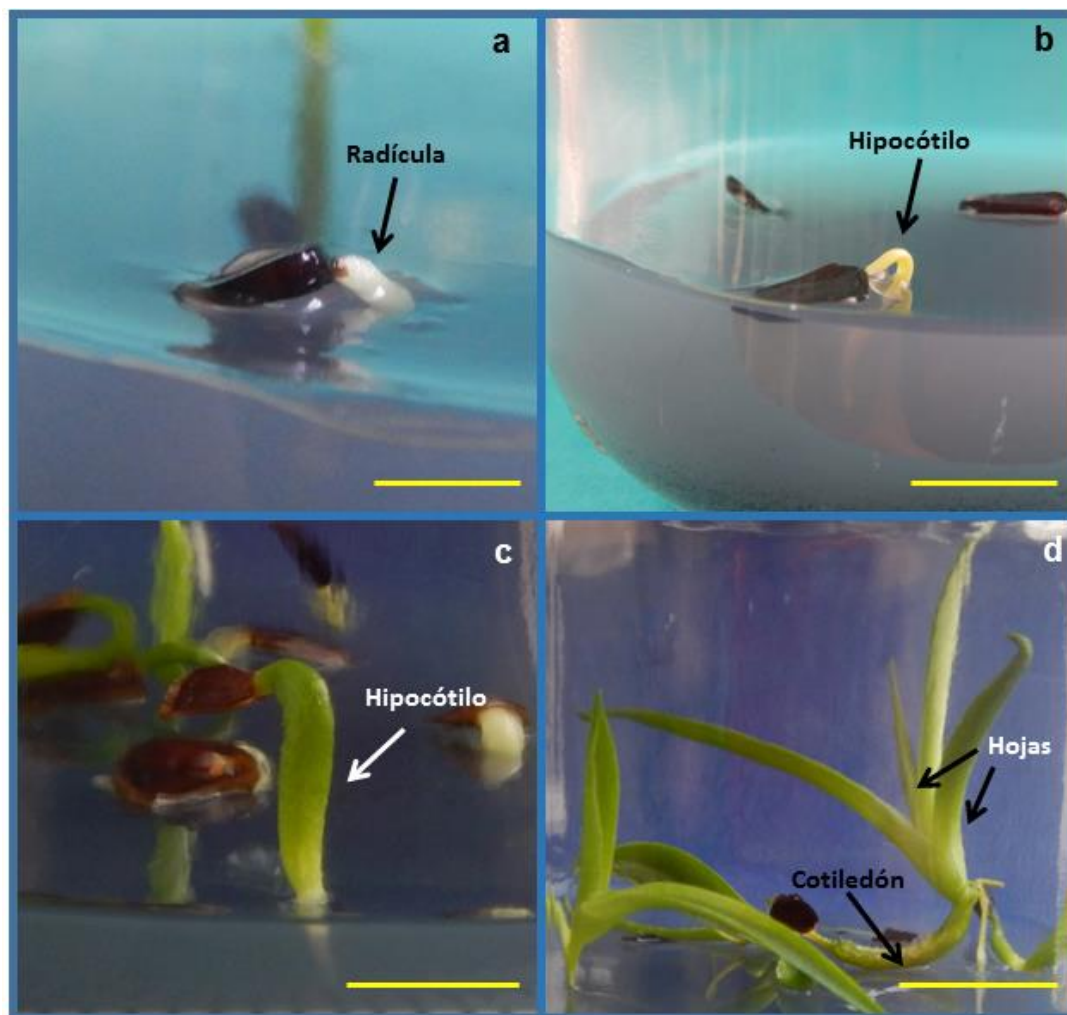


**Gráfica 1. Curva de germinación acumulada *in vitro* de semillas de *A. salmiana* escarificadas con  $H_2SO_4$ . Con 5 segundos se obtuvo el 93.33% y con 10 segundos el 96.66%. Siembra en medio MS50% con CA  $1.5\text{ gL}^{-1}$ .**

Durante el desarrollo de las plántulas *in vitro*, los cotiledones alcanzaron en promedio cuatro centímetros de altura a los 15 días de iniciada la germinación, y a los 25 días ya se habían desarrollado las primeras hojas. En contraste, Vázquez *et al.* (2011) observaron para la misma especie, que el cotiledón comenzó su desarrollo a los 13 días después de la siembra y alcanzó una longitud máxima de tres centímetros, mientras que el desarrollo de las hojas ocurrió a los 31 días, esto en plántulas de *A. salmiana* germinadas en invernadero, en contraste con las germinadas *in vitro*, en el presente trabajo, donde las hojas surgieron a las dos semanas (Figura 7f). De acuerdo a Malda y Ruiz (2004), el cultivo *in vitro* puede acelerar la germinación y desarrollo de las plántulas.

### *Agave obscura*

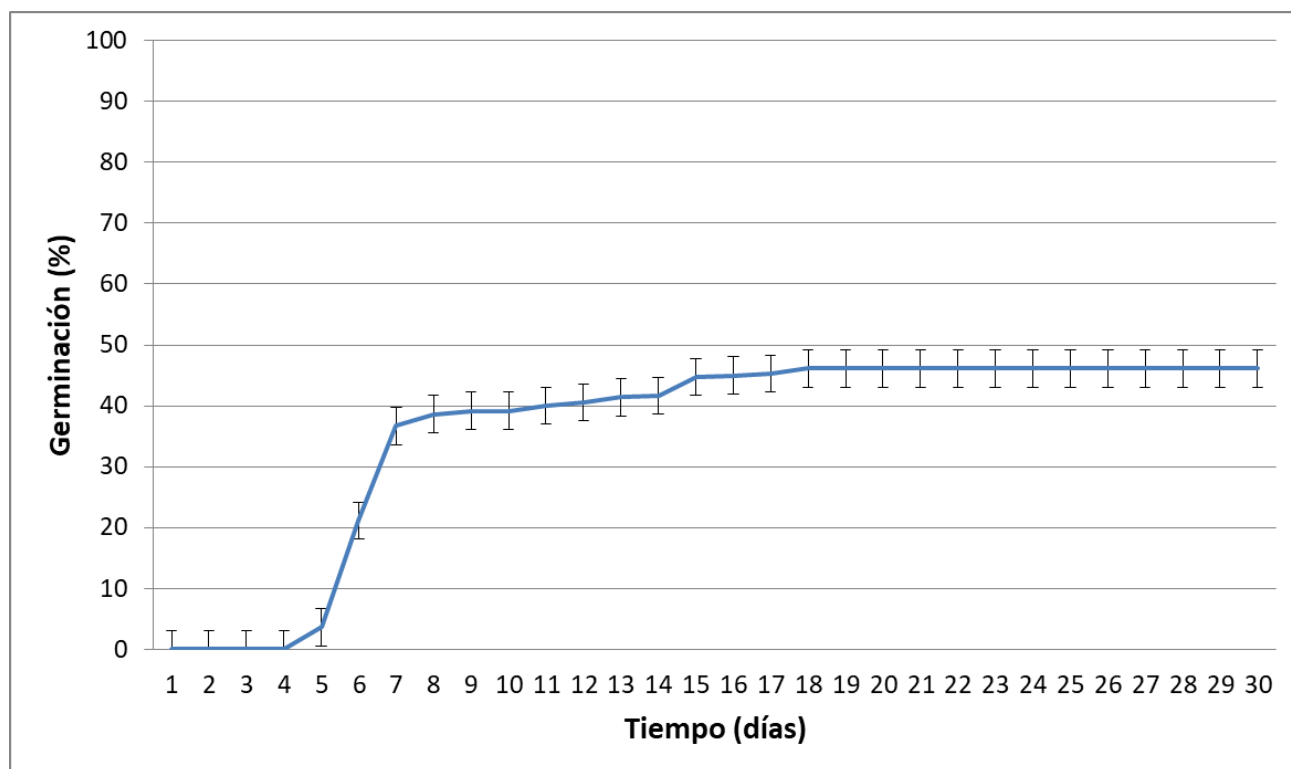
La germinación de *A. obscura* inició con el rompimiento de la cubierta seminal y el surgimiento de la radícula a los cuatro días de cultivo (Figura 8a). La radícula se sumergió en el medio de cultivo en los primeros seis días, posteriormente se desarrolló el hipocótilo, que primero fue de color blanco (Figura 8b) y después se tornó de color verde (Figura 8c). Dos semanas después el cotiledón alcanzaba una altura de 1-2 cm, a la tercera semana el epicótilo inició su desarrollo con la aparición de la primera hoja. A los cinco meses, las plántulas medían entre 2-3.5 cm de altura y habían desarrollado varias hojas (Figura 8d).



**Figura 8.** Germinación y desarrollo de plántulas *in vitro* de *Agave obscura* en medio MS50%. Se señala con flechas: emergencia de la radícula (a); desarrollo del hipocótilo (b, c), primeras hojas a partir del epicótilo (d) (Barra= 0.5 cm).

## Propagación *in vitro* de *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck y *Agave obscura* Schiede (Agavaceae)

En *A. obscura* se registró 46.11% de germinación. La germinación inició al cuarto día, incrementándose gradualmente durante el tiempo de incubación. Se observó un aumento en el porcentaje en el séptimo día (entre 30-40%), y para el décimo octavo día alcanzaron su máximo porcentaje de germinación (Gráfica 2).



**Gráfica 2. Curva de germinación acumulada *in vitro* de *A. obscura*.** Se obtuvo 46.11% de germinación en medio MS50% con CA 1.5 g L<sup>-1</sup>.

Domínguez (2009), reporta para *A. obscura* el 100% de germinación *in vitro*, entre los 30-45 días las plántulas alcanzaron una altura de 3-6 cm. Comparándolo con el mayor porcentaje obtenido (48.33%) y la altura de las plántulas de 2-3.5 cm después de cinco meses, es probable que la diferencia se deba al medio de cultivo empleado para la germinación, ya que Domínguez (2009) utilizó medio MS basal y en el presente trabajo fueron germinadas en el mismo medio pero a la mitad de su concentración, lo cual puede indicar que *A. obscura*



## Propagación *in vitro* de *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck y *Agave obscura* Schiede (Agavaceae)

requiere de una mayor cantidad de nutrientes para su germinación y el óptimo desarrollo de las plántulas.

Las semillas de *A. obscura* usadas en este experimento fueron colectadas y almacenadas aproximadamente tres años. Domínguez (2009) menciona que las semillas que utilizó fueron adquiridas con proveedores, por lo cual no se definió el origen, tiempo y condiciones de almacenamiento, lo que pudo influir en el porcentaje de germinación que reporta (100%). En general, existen pocos estudios sobre la viabilidad de semillas de *Agave*, en otras especies de plantas suculentas como las cactáceas se ha encontrado que la pérdida de viabilidad de las semillas bajo condiciones de laboratorio (longevidad potencial) puede ser muy variable entre las distintas especies, mientras que para algunas especies la viabilidad decrece considerablemente durante un año, otras pueden mantenerla por más de 5 años (Rojas-Aréchiga y Vázquez-Yanes, 2000).

Ramírez-Malagón *et al.* (2008), registraron explantes de *A. obscura* a partir de plántulas germinadas *in vitro*, sin embargo, no reportan los porcentajes de germinación ni tampoco mencionan la escarificación de las semillas.

De acuerdo con lo mencionado, sería importante hacer estudios que evalúen la viabilidad y si se requiere un tratamiento de escarificación de semillas de *A. obscura*, para promover mayores porcentajes de germinación.

Un problema frecuente de las especies del género *Agave* es el bajo establecimiento de plántulas germinadas en condiciones silvestres, esto se debe a que tienen una cantidad baja de reservas, poca capacidad de absorción de agua, aunado a los cambios de temperatura y variaciones microclimáticas, que pueden causar la muerte del embrión y, por ende, la poca viabilidad de las semillas (Gentry, 1982; Arizaga, 1998). La importancia de la propagación



## Propagación *in vitro* de *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck y *Agave obscura* Schiede (Agavaceae)

mediante semillas radica en la enorme cantidad de semillas que produce un solo qurote, por lo que se puede obtener una gran cantidad de plantas en un breve período. La germinación *in vitro* de semillas representaría una alternativa viable para la obtención de plántulas con material genético recombinado, en dado caso que esta variabilidad se requiera en algún programa de conservación de las especies de *Agave*. Como ya se mencionó, el cultivo *in vitro* favorece la germinación y el desarrollo de las plántulas, además es posible obtener plántulas de tallas homogéneas (Ramírez-Malagón *et al.*, 2008), aunque en *A. obscura* se obtuvo un porcentaje de germinación *in vitro* menor al 50%, este proceso sería una alternativa para su propagación.

### Formación de brotes

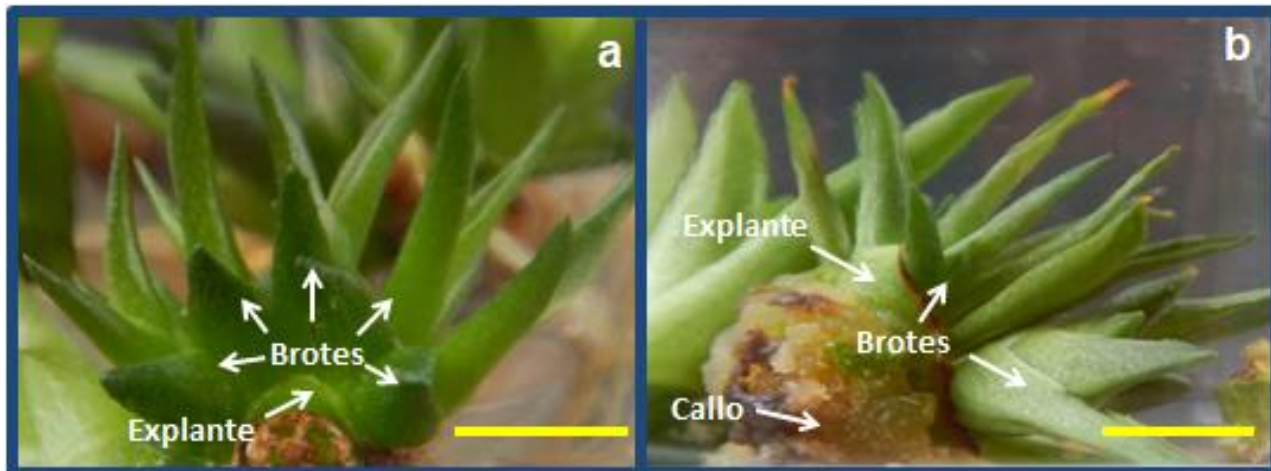
En *A. salmiana* y *A. obscura* la formación de brotes ocurrió vía organogénesis directa e indirecta en ambos tipos de explantes (tallo y región basal de hoja). Los trabajos publicados con el género *Agave* destacan el uso de BA, en comparación a otras citocininas, ésta ha sido efectiva en la formación de brotes vía directa (Robert *et al.*, 1987; Powers y Backhaus, 1989; Binh *et al.*, 1990; Santacruz-Ruvalcaba *et al.*, 1999; Hazra *et al.*, 2002; Nikam *et al.*, 2003; Toribio 2005; Valenzuela-Sánchez *et al.*, 2006) y vía indirecta (Das, 1992; Nikam, 1997; Enríquez del Valle *et al.*, 2005; Aureoles-Rodríguez *et al.*, 2008; Gómez, 2010; Silos-Espino *et al.*, 2011). En el cultivo *in vitro* de agaves prevalece el uso de 2,4-D, sin embargo, se han reportado otras auxinas como AIB, AIA, Dicamba, Picloram y ANA. Esta última reportada para la inducción de brotes vía organogénesis indirecta (Power y Backhaus, 1989), brotes vía organogénesis directa (Nikam, 1997) y para la obtención de embriogénesis somática indirecta (Tejevathi *et al.*, 2007).

## Propagación *in vitro* de *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck y *Agave obscura* Schiede (Agavaceae)

En ambas especies la respuesta se observó en todas las concentraciones del ensayo preliminar de BA/ANA 0.5/0.1, 3/0, 3/1 y 5/1 mg L<sup>-1</sup> en medio MS, excepto en el control.

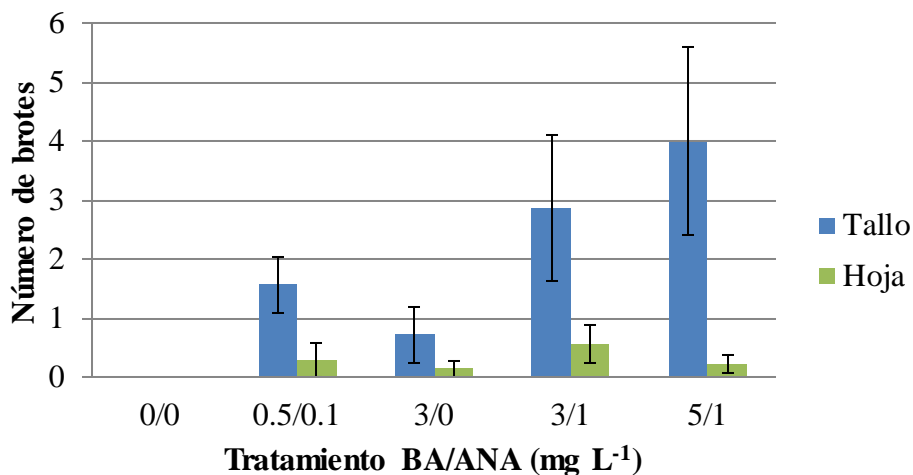
### ***Agave salmiana***

La formación de brotes fue por organogénesis directa. En ambos tipos de explantes la respuesta fue visible hasta la cuarta semana de cultivo, inicialmente se observó el desarrollo de protuberancias en la superficie del tejido en la parte basal de los explantes, estas protuberancias de color verde posteriormente se fueron alargando, a la quinta y sexta semana estas formaciones se elongaron y en el ápice se presentaba una bifurcación, a partir de la cual se desarrollaron las hojas a la séptima semana. A las ocho semanas los brotes medían entre 0.5-1.5 cm (Figura 9). En ambos tipos de explantes se observó un cambio en el color, de verde a café, probablemente como consecuencia del daño a los tejidos al momento de la disección (Figura 9b), no obstante, este aspecto oxidado no limitó el desarrollo de los brotes. La parte basal en contacto con el medio de cultivo se desorganizó formando un escaso callo de aspecto friable (desmenuzable), que no intervino en el desarrollo de los brotes. El grupo control no generó ninguna respuesta morfogénica, sólo se observó el oscurecimiento de los tejidos, a pesar de que el tejido vegetal no presentó síntomas de necrosamiento, este tampoco presentó ningún desarrollo.



**Figura 9.** Formación de brotes en *A. salmiana* vía organogénesis directa en ensayo preliminar. A partir de explantes de tallo con BA/ANA 0.5/0.1 mg L<sup>-1</sup> (a), y a partir de explantes de hoja, con BA/ANA 5/1 mg L<sup>-1</sup>, se observa la formación de callo en la parte basal del explante (b) (Barra = 0.5cm).

En explantes de tallo el mayor número de brotes se generó con BA/ANA 5/1 mg L<sup>-1</sup>, 4 brotes promedio por explante (Gráfica 3). En el tratamiento control, la respuesta fue nula para los dos tipos de explantes, lo que nos indica que es necesaria la presencia de fitoreguladores exógenos para promover alguna respuesta morfológica.



**Gráfica 3.** Número de brotes por explante de tallo y hoja de *A. salmiana* obtenidos en los diferentes tratamientos de BA/ANA, después de cinco meses de cultivo.

### **Propagación *in vitro* de *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck y *Agave obscura* Schiede (Agavaceae)**

El tallo fue el explante más regenerativo. En las cuatro combinaciones hormonales ensayadas, se registró un promedio de 0.5 a 4 brotes por explante. En BA/ANA 0.5/0.1 mg L<sup>-1</sup> el número promedio de brotes por explante fue de 1.5 y en ausencia de auxina 3/0 mg L<sup>-1</sup> disminuyó a 0.7. El número de brotes por explante se incrementó de 3 a 4 al aumentar la concentración de la citocinina siempre con la presencia de la auxina. Es evidente que la combinación citocinina/auxina les fue más favorable.

En el explante de hoja, en todos los tratamientos se observó poca formación de brotes, el promedio de brotes obtenidos fue por debajo de 0.5 y no se define una tendencia como en el caso de los explantes de tallo (Gráfica 3). Sin embargo, aquí se demuestra el potencial regenerativo de la región basal de hoja. Es posible que este tipo de explante requiera concentraciones más elevadas de citocinina/auxina, o bien, diferentes RCV para promover respuesta morfogénica.

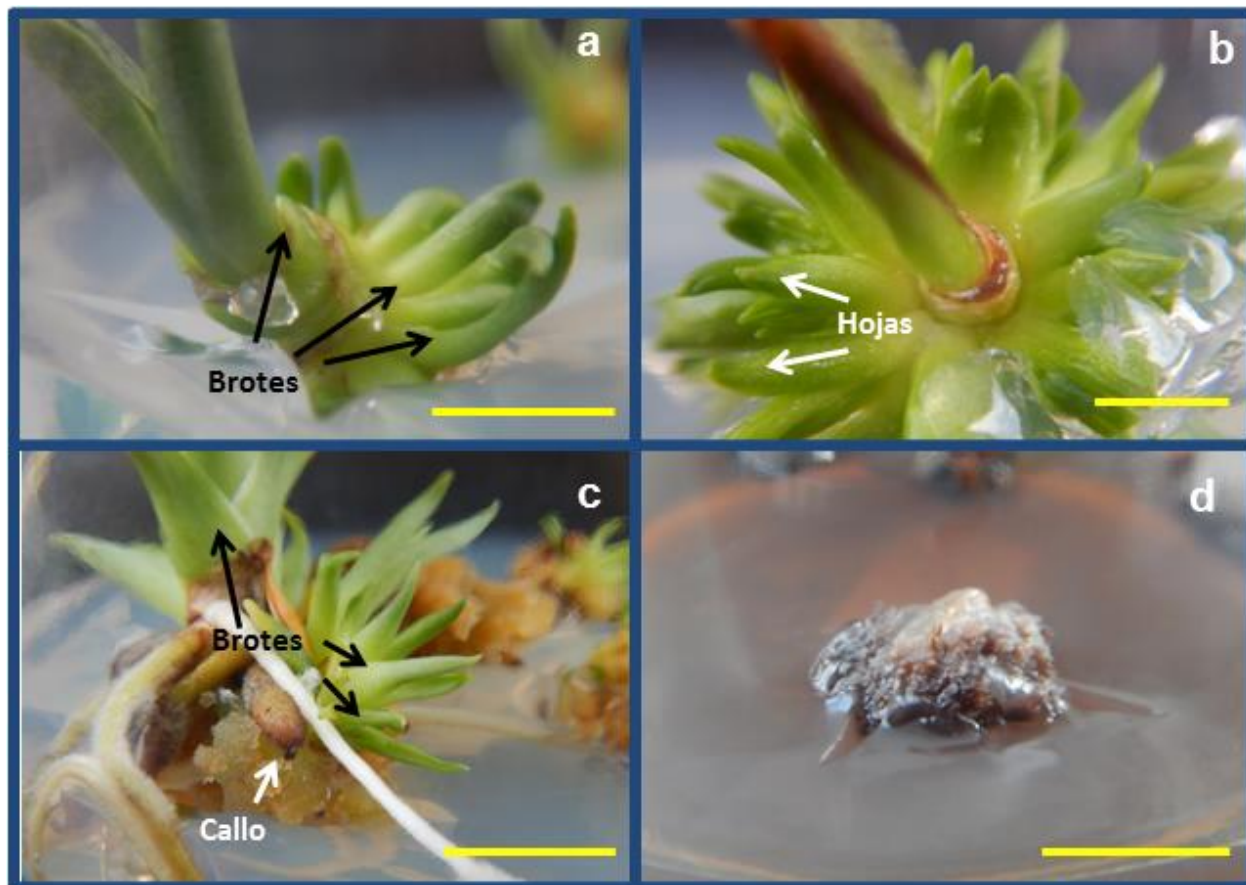
### ***Agave obscura***

La formación de brotes por organogénesis directa se observó a la cuarta semana de cultivo. La producción de los brotes inició como una protuberancia en la base de los explantes, la cual a la quinta semana se elongó, y durante la séptima y octava semana de cultivo a partir del ápice de esta estructura se desarrollaron las hojas. A las ocho semanas los brotes medían entre 0.5-1 cm (Figura 10a). Durante la primera semana, el 30% de los explantes cultivados (tallos y hojas) presentaron necrosis por oxidación, lo que resultó una limitante para lograr su propagación debido a la pérdida de material vegetal (Figura 10d).

Para *A. sisalana*, Nikam (1997) reportó el cultivo de explantes de tallo y rizoma, en distintos medios de cultivo (MS, SH, Gamborg y White) adicionados con KIN y ANA, este autor

### Propagación *in vitro* de *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck y *Agave obscura* Schiede (Agavaceae)

encontró que fue en el medio MS donde obtuvo los mejores resultados para la formación de brotes (11-27 brotes por explante). En el presente trabajo no se experimentó con distintos medios de cultivo, pero se observó que en *A. obscura* el uso de medio MS sólido fue favorable, ya que sí hubo respuesta morfogénética tanto en el explante de tallo como en el de hoja.



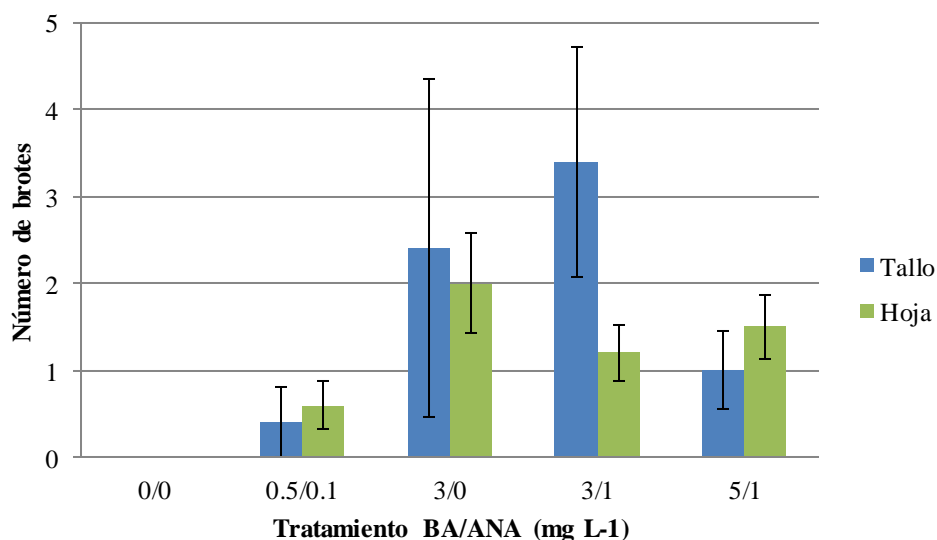
**Figura 10. Formación de brotes vía organogénesis directa de *A. obscura* en el ensayo preliminar.** A partir de explante de tallo (de 30 a 60 días de cultivo) BA/ANA 3/1 mg L<sup>-1</sup> (a, b), formación de brotes en la parte superior del explante BA 3 mg L<sup>-1</sup> (c). Oxidación y necrosis del explante (d) (Barra= 0.5 cm).

El explante más regenerativo fue el tallo, el grupo control no generó respuestas morfogénéticas, y fue evidente que la presencia de la citocinina es importante para promover la formación de brotes (Figura 10b). Los tratamientos que formaron el mayor número de brotes fueron BA/ANA 3/1 (3.4 brotes por explante) y 3/0 (2.4 brotes por explante), sin

## Propagación *in vitro* de *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck y *Agave obscura* Schiede (Agavaceae)

embargo, al incrementar la concentración de la citocinina a 5/1, el promedio disminuyó a 1 brote por explante, valor ligeramente superior al obtenido en la combinación 0.5/0.1 (0.4 brotes por explante).

El explante de hoja fue un poco menos regenerativo, obteniéndose el mayor promedio en la combinación BA/ANA 3/0 (2 brotes por explante) seguidas de las combinaciones 5/1 y 3/1 con 1.5 brotes por explante y 1.2 brotes por explante, respectivamente. Concentraciones bajas de citocininas también disminuyeron la formación de brotes como en los explantes de tallo (Gráfica 4).



**Gráfica 4.** Número de brotes por explante de tallo y hoja de *A. obscura* obtenidos en los diferentes tratamientos de BA/ANA, después de cinco meses de cultivo.

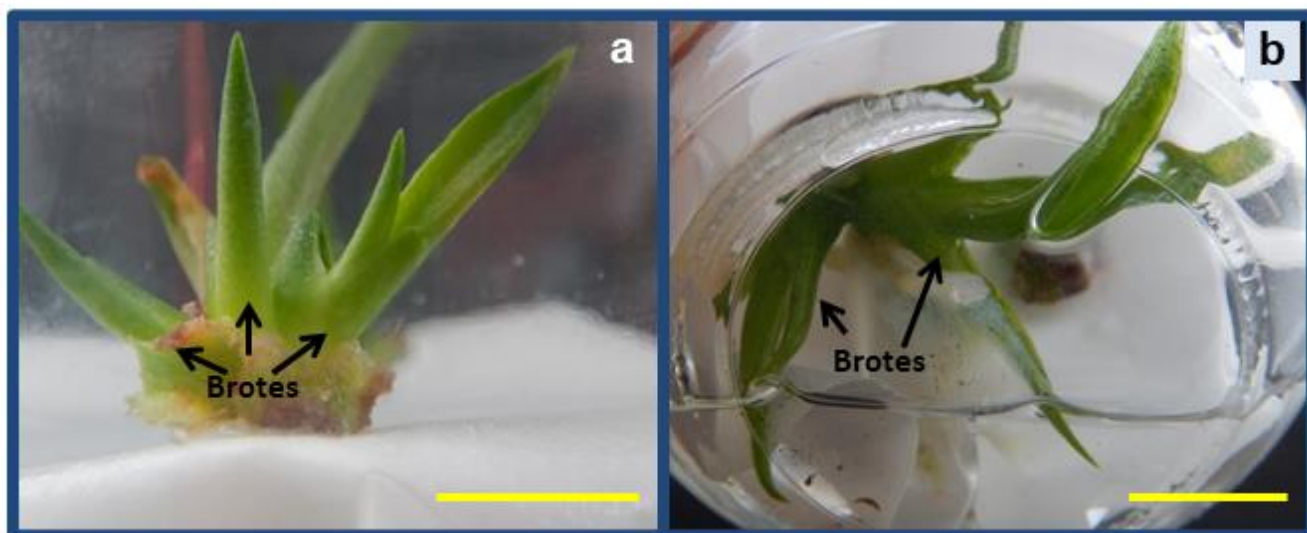
## Formación de brotes en medio MS líquido y sólido

### *Agave salmiana*

La generación de brotes en medio MS líquido se observó a partir de la segunda semana de incubación, a la quinta y sexta semana los brotes tenían una altura de 1 cm en promedio y

### Propagación *in vitro* de *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck y *Agave obscura* Schiede (Agavaceae)

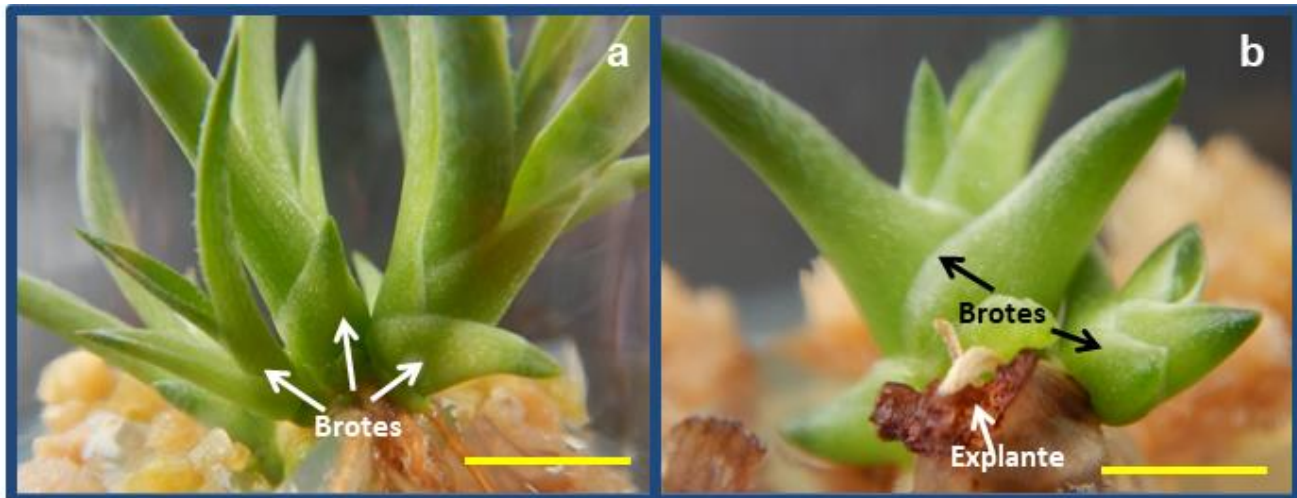
desarrollaron sus primeras hojas (Figura 11a). Al cuarto mes de incubación los brotes alcanzaban una altura de 4.5 cm en promedio. Durante su desarrollo algunos brotes crecieron por debajo del papel filtro (Figura 11b). Al quinto mes de incubación los brotes medían 5 cm de altura en promedio.



**Figura 11.** Organogénesis directa en explantes de tallo de *A. salmiana* en medio MS líquido. Desarrollo de brotes con el tratamiento BA 0.5 mg L<sup>-1</sup> (a) (Barra= 0.5 cm). Formación de brotes por debajo del papel filtro, con BA 2 mg L<sup>-1</sup> (b) (Barra= 1 cm).

En medio sólido, la organogénesis directa se observó a partir de la cuarta semana de cultivo (Figura 12). En la sexta semana de incubación los brotes tenían una altura de 1 cm en promedio, y presentaban sus primeras hojas. Al quinto mes de incubación los brotes alcanzaban una altura de 4 cm en promedio.





**Figura 12.** Brotes de *A. salmiana* en medio MS sólido. Formación de brotes en explante de tallo con BA/ANA 3/0.5 mg L<sup>-1</sup> (a); brotes a partir de un explante de hoja con BA 5 mg L<sup>-1</sup> (b), después de cuatro meses de incubación. (Barra= 0.5 cm).

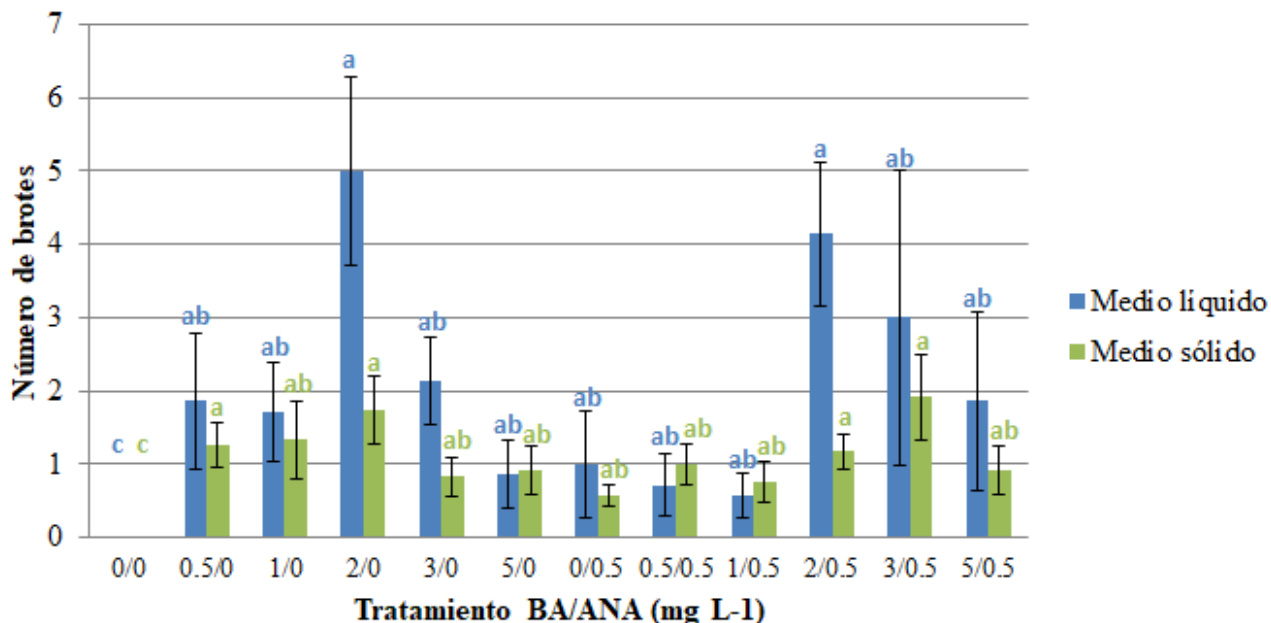
Hvoslef-Eide y Preil (2005), señalan que una de las ventajas del empleo del medio líquido es que se promueven tasas rápidas de crecimiento. En *A. salmiana*, se observó que en medio líquido el inicio de la organogénesis y desarrollo de los brotes se presentó dos semanas antes que en el medio sólido.

Fue posible observar que tanto en medio líquido como en sólido no hubo desarrollo de brotes en el grupo control, lo que se presentó fue oxidación en el área de corte de los explantes, y no hubo cambios en el tamaño o apariencia. Los explantes de tallo produjeron mayor número de brotes por tratamiento en medio líquido que en medio sólido. Es evidente el efecto de los reguladores de crecimiento, se observa que en la concentración de BA 2 mg L<sup>-1</sup> se obtiene el mayor número de brotes (5) pero al ser más alta la concentración de la citocinina (3 y 5 mgL<sup>-1</sup>) el número de brotes disminuyó a 2 y 0.86, respectivamente. Al combinarse la citocinina/auxina se observó un comportamiento similar, alcanzando la mayor formación de brotes (4.14) con BA/ANA 2/0.5 mg L<sup>-1</sup>, y a concentraciones mayores el número de brotes fue menor. Se puede determinar que en el medio líquido se obtuvo mayor número de brotes debido a que los



## Propagación *in vitro* de *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck y *Agave obscura* Schiede (Agavaceae)

nutrimentos, y en este caso los reguladores de crecimiento se encuentran más disponibles para el tejido, siendo las concentraciones óptimas BA 2 mg L<sup>-1</sup> y BA/ANA 2/0.5 mg L<sup>-1</sup> (Gráfica 5).



**Gráfica 5.** Número de brotes de *A. salmiana* en medio MS líquido y sólido. Brotes formados en explantes de tallo con distintas concentraciones de BA/ANA, después de cinco meses de cultivo.

En explantes de tallo cultivados en medio líquido, el análisis estadístico mostró que existieron diferencias significativas entre los tratamientos y el número de brotes ( $F=3.032$ ,  $P<0.05$ ), según la prueba de Tukey, se conformaron tres grupos, diferenciados por *a*, *ab*, y *c* (Tabla 2). En dos de los tratamientos se observaron respuestas favorables en cuanto a la formación de brotes: en BA 2 mg L<sup>-1</sup> con 5 brotes en promedio (35 brotes totales) y BA/ANA 2/0.5 mg L<sup>-1</sup> 4.14 brotes en promedio (29 brotes totales).

Para el explante de tallo en medio sólido existen diferencias significativas ( $F=2.617$ ,  $P<0.05$ ), de acuerdo a la prueba de Tukey, se conformaron tres grupos, diferenciados por *a*, *ab*, y *c* (Tabla 2). Los tratamientos que presentaron la mayor cantidad de brotes, fueron BA/ANA 3/0.5

**Propagación *in vitro* de *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck y *Agave obscura* Schiede (Agavaceae)**

mg L<sup>-1</sup> con 1.92 brotes promedio (23 brotes totales), BA 2 mg L<sup>-1</sup> con 1.75 brotes promedio (21 brotes por tratamiento), BA 0.5 mg L<sup>-1</sup> con 1.25 brotes promedio (15 brotes por tratamiento), y BA/ANA 2/0.5 mg L<sup>-1</sup> con 1.17 brotes promedio por explante (14 brotes por tratamiento).

**Tabla 2.** Número promedio de brotes en explantes de tallo de *A. salmiana*, después de 5 meses de inducción.

Concentración (mg L <sup>-1</sup> )		Medio líquido			Medio sólido				
BA	ANA	Brotos por tratamiento	Brotos por explante (media ± ES) *			Brotos por tratamiento	Brotos por explante (media ± ES) *		
0	0	0	0.00	±	0.00	c	0	0.00 ± 0.00	c
0.5	0	13	1.86	±	0.94	ab	<b>15</b>	<b>1.25 ± 0.31</b>	<b>a</b>
1	0	12	1.71	±	0.68	ab	16	1.33 ± 0.54	ab
<b>2</b>	<b>0</b>	<b>35</b>	<b>5</b>	±	<b>1.29</b>	<b>a</b>	<b>21</b>	<b>1.75 ± 0.46</b>	<b>a</b>
3	0	15	2.14	±	0.60	ab	10	0.83 ± 0.27	ab
5	0	6	0.86	±	0.46	ab	11	0.92 ± 0.34	ab
0	0.5	7	1	±	0.72	ab	7	0.58 ± 0.15	ab
0.5	0.5	5	0.71	±	0.42	ab	12	1 ± 0.28	ab
1	0.5	4	0.57	±	0.30	ab	9	0.75 ± 0.28	ab
<b>2</b>	<b>0.5</b>	<b>29</b>	<b>4.14</b>	±	<b>0.99</b>	<b>a</b>	14	1.17 ± 0.24	<b>a</b>
<b>3</b>	<b>0.5</b>	<b>21</b>	<b>3</b>	±	<b>2.01</b>	<b>ab</b>	<b>23</b>	<b>1.92 ± 0.58</b>	<b>a</b>
5	0.5	13	1.86	±	1.22	ab	11	0.92 ± 0.34	ab

Media ± error estándar

\*Letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo a la prueba de Tukey ( $\alpha=0.05$ ). De acuerdo al análisis, en los explantes de Hoja no hubo diferencias significativas entre los tratamientos.

Silos-Espino *et al.* (2011) reportaron para *A. salmiana* la formación de 20.3 brotes por explante con BA/AIA 2/0.25 mg L<sup>-1</sup>. Como se puede observar en la tabla anterior, en este trabajo una concentración similar (BA/ANA 2/0.5 mg L<sup>-1</sup>) produjo 4.14 brotes por explante utilizando medio líquido y los explantes de aproximadamente 0.5 cm de espesor y 0.3 cm de grosor obtenidos de plántulas de 4-6 meses de edad, en cambio, Silos-Espino y colaboradores utilizaron cilindros de tallo de 0.2 a 0.4 cm de espesor y 2 cm de grosor de plantas de 2-3 años de edad, lo cual probablemente influyó en el número promedio de brotes

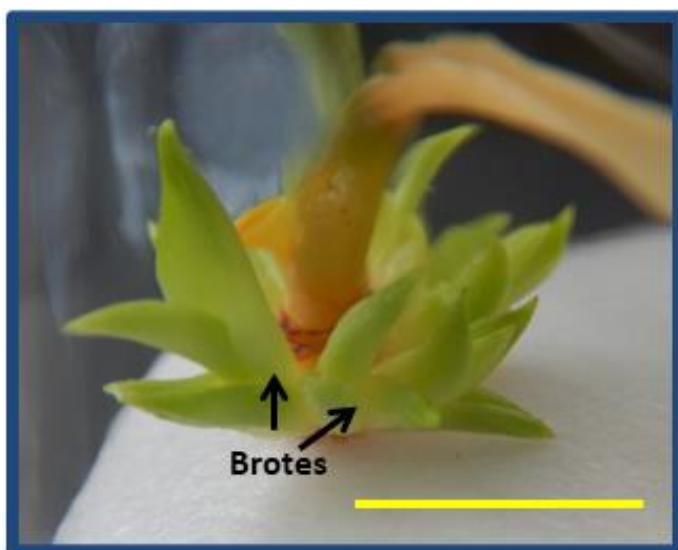
## Propagación *in vitro* de *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck y *Agave obscura* Schiede (Agavaceae)

generados de *A. salmiana* en estas dos investigaciones, debido al tamaño de la superficie del explante para la formación de los brotes.

En los explantes de hoja de *A. salmiana* hubo escasa respuesta morfogénica, en ambos medios de cultivo. Para la misma especie Malda y Ruiz (2004) obtuvieron 2 brotes por explante de hoja en concentraciones BA/ANA 3/0.1 a 7/0.1 mg L<sup>-1</sup> y Gómez (2010) reportó la formación de brotes con BA en 5 y 10 mg L<sup>-1</sup> obteniendo 8 y 6 brotes por explante respectivamente. Es posible que en los explantes de hoja se requiera de concentraciones más altas de citocinina para promover la respuesta organogénica como lo anteriormente citado.

### ***Agave obscura***

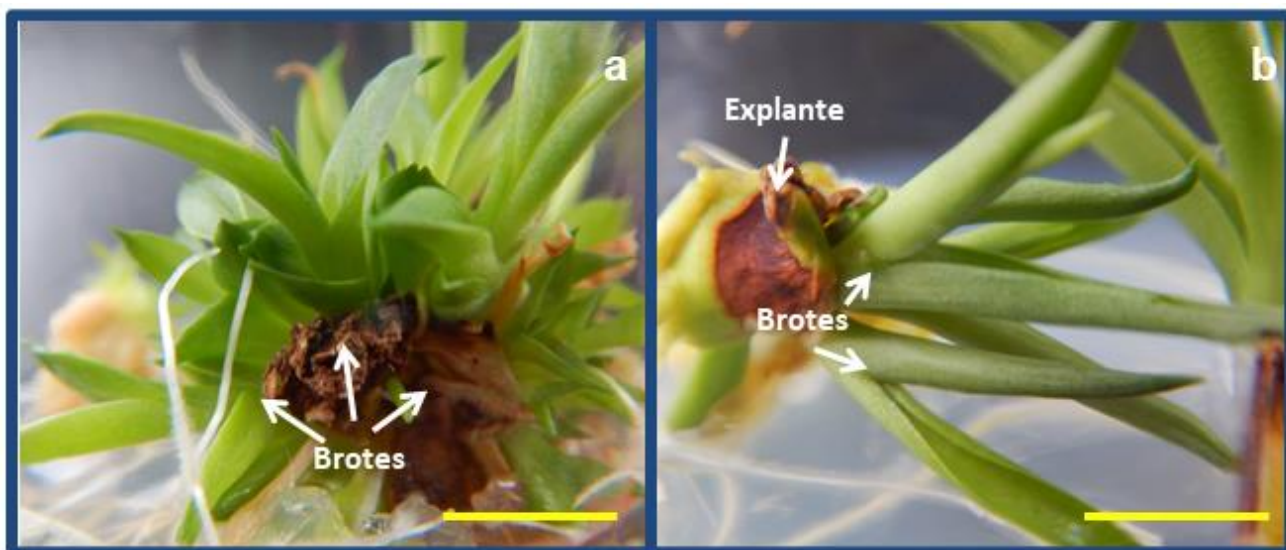
La generación de brotes en medio MS líquido (Figura 13) se observó a partir de la tercera semana de incubación, durante la séptima semana los brotes presentaban sus primeras hojas y una altura promedio de 1 cm, la organogénesis de los brotes se dio en la superficie del papel filtro como por debajo de este. Al quinto mes los brotes alcanzaron una altura promedio de cuatro centímetros.



**Figura 13.** Brotes por organogénesis directa a partir de tallo de *A. obscura* en medio MS líquido con BA/ANA 2/0.5 mg L<sup>-1</sup> a los 60 días de cultivo (Barra= 0.5 cm).

## Propagación *in vitro* de *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck y *Agave obscura* Schiede (Agavaceae)

En el medio MS sólido, la generación de brotes (Figura 14) se observó durante la cuarta semana de cultivo. En la séptima semana los brotes en promedio median 1 cm de altura y presentaban sus primeras hojas. Al quinto mes de incubación los brotes medían 3.5 cm en promedio.



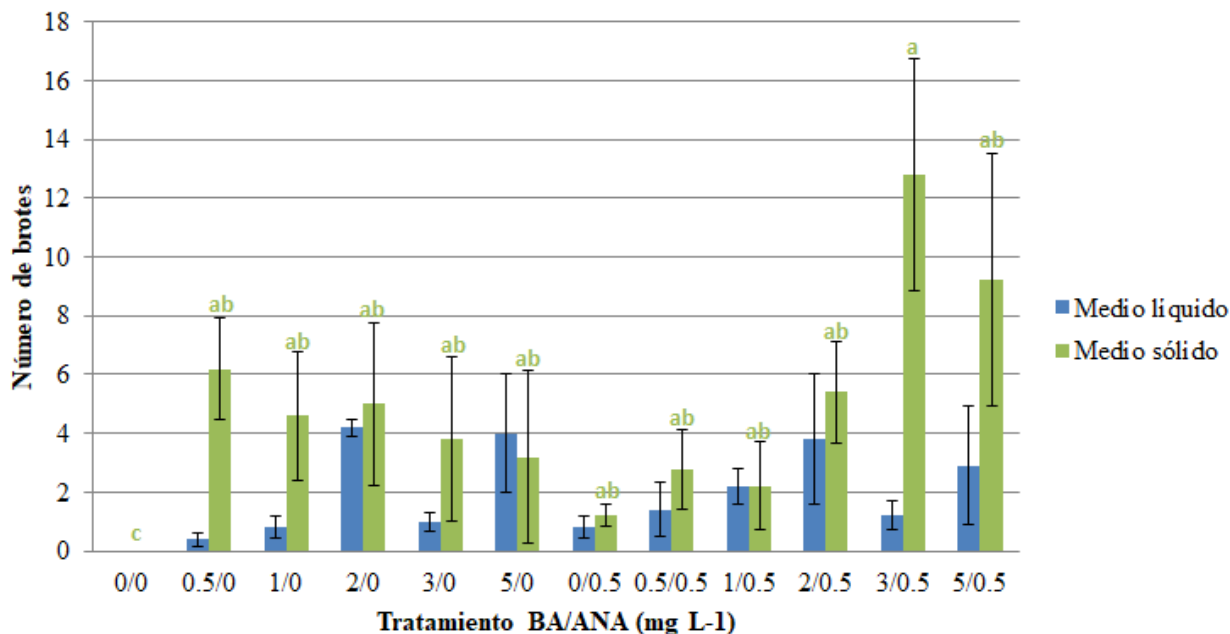
**Figura 14.** Brotes de *A. obscura* en medio MS sólido. Formación de brotes mediante organogénesis directa a partir de explante de tallo con BA/ANA 0.5/0.5 mg L<sup>-1</sup> (a) y 5/0.5 mg L<sup>-1</sup> (b), después de dos meses de cultivo (Barra= 0.5 cm).

En esta especie, en ambos medios de cultivo el explante de tallo produjo brotes en todos los tratamientos con reguladores de crecimiento, en el grupo control no se observó respuesta. En general, ambos explantes generaron mayor número de brotes en el medio sólido que en el medio líquido.

En el medio sólido se observó que las bajas concentraciones de BA ensayadas generaron mayor cantidad de brotes BA 0.5 (6.2) que las altas concentraciones de BA 3 y 5 mg L<sup>-1</sup> (3.8 y 3.2 respectivamente), y se dio un efecto sumatorio al combinar BA/ANA, debido a que hubo un incremento en el número de brotes al interactuar ambos reguladores, siendo el mejor tratamiento BA/ANA 3/0.5 mg L<sup>-1</sup> (12.8) (Gráfica 6). En medio líquido la formación de brotes

## Propagación *in vitro* de *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck y *Agave obscura* Schiede (Agavaceae)

fue menor, la mejor combinación fue BA/ANA 2/0 mg L<sup>-1</sup> (4.2) seguido de BA/ANA 2/0.5 mg L<sup>-1</sup> (3.8) (Gráfica 6).



**Gráfica 6.** Número de brotes en explantes de tallo de *A. obscura* con BA/ANA, después de cinco meses de cultivo.

En el explante de tallo sembrado en el medio líquido no existieron diferencias significativas ( $F=1.525$ ,  $P>0.05$ ), la mayor cantidad de brotes se presentó con BA 2 mg L<sup>-1</sup> (21 brotes por tratamiento).

El análisis estadístico mostró para el explante de tallo en medio sólido diferencias significativas entre los tratamientos y el número de brotes ( $F= 2.051$ ,  $P<0.05$ ). De acuerdo a la prueba de Tukey, se conformaron tres grupos, diferenciados por *a*, *ab* y *c* (Tabla 3). En el tratamiento 3/0.5 mg L<sup>-1</sup> de BA/ANA se formaron 12.8 brotes promedio por explante (64 brotes por tratamiento).

**Tabla 3.** Número promedio de brotes en explantes de tallo de *A. obscura*, después de 5 meses de inducción.

Concentración (mg L <sup>-1</sup> )		Medio líquido*		Medio sólido	
BA	ANA	Brotos por tratamiento	Brotos por explante (media ± ES)	Brotos por tratamiento	Brotos por explante (media ± ES) *
0	0	0	0.00 ± 0.00	0	0.00 ± 0.00 c
0.5	0	2	0.4 ± 0.25	31	6.2 ± 1.74 ab
1	0	4	0.8 ± 0.37	23	4.6 ± 2.18 ab
<b>2</b>	<b>0</b>	<b>21</b>	<b>4.2 ± 0.30</b>	25	5 ± 2.78 ab
3	0	5	1 ± 0.32	19	3.8 ± 2.78 ab
5	0	20	4 ± 2.03	16	3.2 ± 2.96 ab
0	0.5	4	0.8 ± 0.37	6	1.2 ± 0.37 ab
0.5	0.5	7	1.4 ± 0.93	14	2.8 ± 1.36 ab
1	0.5	11	2.2 ± 0.58	11	2.2 ± 1.5 ab
2	0.5	19	3.8 ± 2.22	27	5.4 ± 1.72 ab
3	0.5	6	1.2 ± 0.49	<b>64</b>	<b>12.8 ± 3.93 a</b>
5	0.5	13	2.92 ± 2	46	9.2 ± 4.28 ab

Media ± error estándar

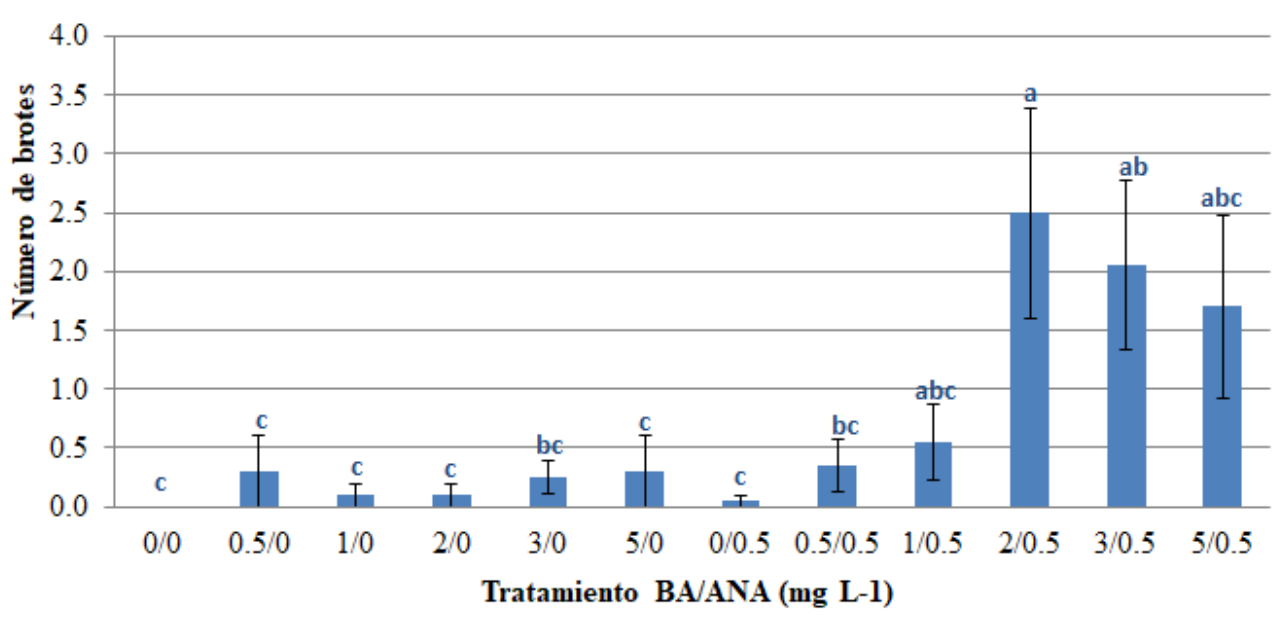
\*En el medio líquido no se encontraron diferencias significativas.

Letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo a la prueba de Tukey ( $\alpha=0.05$ ).

De acuerdo al análisis, en los explantes de Hoja no hubo diferencias significativas entre los tratamientos.

En *A. obscura*, en medio sólido para el explante de hoja existieron diferencias significativas ( $F=0.48$ ,  $P<0.05$ ) mientras que en el medio líquido no. Se observó que en las concentraciones más altas de la combinación de los reguladores de crecimiento se incrementaron el número de brotes (Gráfica 7).

Propagación *in vitro* de *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck y *Agave obscura* Schiede (Agavaceae)



**Gráfica 7.** Número de brotes en explantes de hoja de *A. obscura* en medio MS sólido con BA y ANA, después de cinco meses de cultivo.

De acuerdo a la prueba de Tukey, se conformaron cinco grupos, diferenciados por *a*, *ab*, *abc*, *bc* y *c* (Tabla 4). En el tratamiento BA/ANA 2/0.5 mg L<sup>-1</sup> presentó la mayor cantidad de brotes, con 2.5 brotes promedio por explante (50 brotes por tratamiento).

Propagación *in vitro* de *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck y *Agave obscura* Schiede (Agavaceae)

**Tabla 4.** Número promedio de brotes en explantes de hoja de *A. obscura*, después de 5 meses de inducción en medio sólido.

Concentración (mg L <sup>-1</sup> )		Brotes por tratamiento	Brotes por explante (media ± ES) *		
BA	ANA				
0	0	0	0.00 ± 0.00	c	
0.5	0	6	0.30 ± 0.10	c	
1	0	2	0.10 ± 0.05	c	
2	0	2	0.10 ± 0.05	c	
3	0	5	0.25 ± 0.08	bc	
5	0	6	0.30 ± 0.10	c	
0	0.5	1	0.05 ± 0.03	c	
0.5	0.5	7	0.35 ± 0.10	bc	
1	0.5	11	0.55 ± 0.12	abc	
<b>2</b>	<b>0.5</b>	<b>50</b>	<b>2.50 ± 0.21</b>	<b>a</b>	
<b>3</b>	<b>0.5</b>	<b>41</b>	<b>2.05 ± 0.20</b>	<b>ab</b>	
5	0.5	34	1.70 ± 0.19	abc	

Media ± error estándar

\*Letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo a la prueba de Tukey ( $\alpha=0.05$ ).

En el caso de *A. obscura*, Domínguez (2009) reportó la formación promedio de 11 brotes en tratamientos con 0.2 y 0.1 mg L<sup>-1</sup> de TDZ, al igual que con 0.5 y 2 mg L<sup>-1</sup> de MT, menciona que observó una respuesta positiva ante todas las citocininas probadas (BA, 2iP, KIN, TDZ y MT) y que la única que indujo brotes en las cinco especies de *Agave* que utilizaron fue BA. En la misma investigación se menciona que con el uso de BA en concentración de 1 mg L<sup>-1</sup>, en ausencia de auxinas, obtuvo la formación 4.75 brotes promedio por explante de tallo en *Agave obscura*, como se observa en la Tabla 3, con el explante de tallo en el medio líquido se obtuvieron 0.8 brotes promedio por explante y en el medio sólido 4.6 brotes promedio por explante utilizando BA 1 mg L<sup>-1</sup>. Para la misma especie, Ramírez-Malagón *et al.* (2008) reportaron la formación de 12.8 brotes utilizando BA/AIB 1/0.5mg L<sup>-1</sup> en MS semisólido modificado (KNO<sub>3</sub> y NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 3mg L<sup>-1</sup>). En la presente investigación, la mayor formación de



### Propagación *in vitro* de *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck y *Agave obscura* Schiede (Agavaceae)

brotos con el explante de tallo en medio sólido, se generaron 6.2 brotes promedio por explante con BA 0.5 mg L<sup>-1</sup>, y en medio líquido 4.2 brotes promedio por explante con BA 2 mg L<sup>-1</sup>. De acuerdo a lo registrado en estas investigaciones, el uso de BA en bajas concentraciones es adecuado para la generación de varios brotes, y al combinarla con la auxina en medio sólido se incrementa la formación de estos, como en el mejor tratamiento observado BA/ANA 3/0.5 mg L<sup>-1</sup> con 12.8 brotes promedio por explante de tallo.

En ambas especies, se observó baja respuesta morfogénica a partir del explante de hoja, excepto en *A. obscura* utilizando medio sólido, como ya se discutió anteriormente. El empleo de diferentes explantes en el cultivo *in vitro* de los agaves ha sido reportado, algunos autores consideran que el uso del tallo como explante es la mejor opción (Aureoles-Rodríguez *et al.*, 2008), sin embargo, en varias de las investigaciones el explante de hoja ha sido el único tejido utilizado para la generación de respuestas morfogénicas (producción de brotes y/o embriones somáticos) como lo reportan Powers y Backhaus (1989), Rodríguez-Garay *et al.* (1996), Toribio (2005) y Rodríguez-Sahagún *et al.* (2011). Cabe destacar que en especies de gran importancia económica como *A. tequilana* Weber var. *azul*, el utilizar la parte basal de hojas ha sido importante en la regeneración *in vitro* de la especie (Portillo *et al.*, 2007; Santacruz-Ruvalcaba y Portillo, 2009; Rodríguez-Sahagún *et al.*, 2011). Se puede seguir explorando el potencial regenerativo de los segmentos de hoja para la inducción de respuestas morfogénicas de *A. salmiana* y *A. obscura*.

Sólo se ha reportado el empleo de medio líquido en una investigación de embriogénesis somática indirecta en *A. tequilana* Weber var. *azul*, llevada a cabo por Santacruz-Ruvalcaba y Portillo (2009). De acuerdo a Smith y Spoomer (1995), la disponibilidad de nutrimentos en medio líquido es mayor, sin embargo, una de las desventajas del uso de medios de este tipo,

## Propagación *in vitro* de *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck y *Agave obscura* Schiede (Agavaceae)

es la hiperhidratación que pueden desarrollar los brotes (Debergh, 1983; Etienne y Berthouly, 2002). En algunas investigaciones, la hiperhidratación se ha reducido mediante el aumento de las concentraciones de los solutos y el gel, y también a través de la evaporación de agua de los tejidos si se colocan en contacto con el aire por periodos cortos de tiempo (Thorpe *et al.*, 2008).

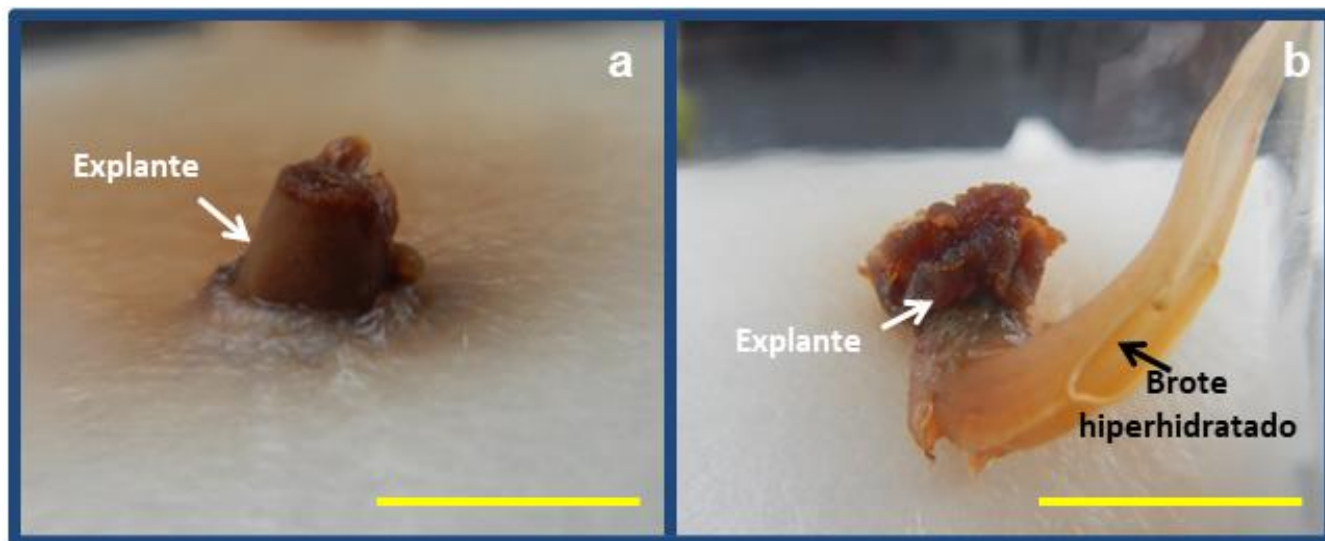
En la presente investigación los brotes hiperhidratados generados directamente sobre los explantes en medio líquido fueron subcultivados en medio sólido (MS 50% con 1.5 g L<sup>-1</sup> de CA), y al cabo de cinco meses estos brotes no presentaban apariencia hiperhidratada de sus tejidos, este último medio de cultivo funcionó como medio de elongación y enraizamiento para estos brotes. Lo anterior, es una de las alternativas para evitar y/o controlar la hiperhidratación, es decir, desarrollar un sistema de cultivo que involucre el uso de medio sólido y líquido en distintas etapas de la inducción de morfogénesis *in vitro* (George y Davies, 2008), como lo reportan Santacruz-Ruvalcaba y Portillo (2009), quienes indujeron la formación de callo embriogénico en medio MS sólido, proliferaron las células embriogénicas en medio MS líquido y subcultivaron la suspensión celular en medio MS sólido para el desarrollo de embriones somáticos. Otra alternativa para evitar este problema en el medio líquido es la agitación constante, ya que permite una mayor aireación del medio de cultivo (Orellana, 1998).

### **Oxidación en cultivos de *Agave obscura***

Así como en el ensayo preliminar, la oxidación de los explantes también se presentó en el cultivo en medio líquido, durante la primera semana se observó un cambio de color de verde a rojizo en la zona de escisión y, posteriormente el papel filtro adquirió color café-rojizo, posiblemente por los exudados de los explantes hacia el medio, y entre la tercera y cuarta

### Propagación *in vitro* de *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck y *Agave obscura* Schiede (Agavaceae)

semana el explante se tornaba de color café por completo (Figura 15a). Algunos explantes que mostraron estos signos de oxidación generaron brotes, sin embargo, provocó la necrosis del explante y por ende los brotes también se oxidaron y necrosaron (Figura 15b).



**Figura 15.** Oxidación de explantes de *A. obscura* en medio MS líquido. Explante de hoja oxidado (a); brote hiperhidratado y oxidado (b), a los 60 días de cultivo (Barra= 1 cm).

Debido a que en el medio líquido los explantes de tallo y hoja presentaron problemas severos de oxidación 33.33% y 38.75% del total de los explantes sembrados (respectivamente), para evitar la pérdida de material biológico destinado para los experimentos en medio sólido con BA/ANA, fue necesario remojar los explantes durante 30 minutos en una mezcla estéril de antioxidantes (ácido ascórbico y ácido cítrico) previo a la siembra. Después de este tratamiento se observó que el porcentaje promedio de explantes que presentaron oxidación disminuyó a 18.33% para los explantes de tallo y 17.08% para los explantes de hoja, lo que refleja la efectividad del tratamiento antioxidante (Tabla 5).

**Propagación *in vitro* de *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck y *Agave obscura* Schiede (Agavaceae)**

**Tabla 5.** Porcentaje de explantes oxidados de *A. obscura*, después de dos meses de inducción sembrados en medio líquido y sólido MS con diferentes concentraciones de BA/ANA.

Concentración (mg L <sup>-1</sup> )		Explantes de tallo sembrados por tratamiento	Explantes de hoja sembrados por tratamiento	Medio líquido				Medio sólido*			
BA	ANA			Explante de tallo		Explante de hoja		Explante de tallo		Explante de hoja	
				Explantes oxidados por tratamiento	Explantes oxidados (%)	Explantes oxidados por tratamiento	Explantes oxidados (%)	Explantes oxidados por tratamiento	Explantes oxidados (%)	Explantes oxidados por tratamiento	Explantes oxidados (%)
0	0	5	20	4	80	10	50	1	20	6	30
0.5	0	5	20	3	60	12	60	1	20	5	25
1	0	5	20	2	40	12	60	1	20	5	25
2	0	5	20	2	40	11	55	1	20	4	20
3	0	5	20	2	40	12	60	1	20	6	30
5	0	5	20	1	20	12	60	1	20	3	15
0	0.5	5	20	1	20	10	50	0	0	2	10
0.5	0.5	5	20	0	0	3	15	1	20	2	10
1	0.5	5	20	1	20	3	15	1	20	3	15
2	0.5	5	20	2	40	2	10	1	20	1	5
3	0.5	5	20	1	20	2	10	1	20	3	15
5	0.5	5	20	1	20	4	20	1	20	1	5
<b>Promedio</b>				1.67	33.33	7.75	38.75	0.92	18.33	3.42	17.08

\*Los explantes se remojaron en un tratamiento antioxidante previo a la siembra en medio MS sólido

Domínguez (2009) no reporta el oscurecimiento de los explantes de *A. obscura*. Una explicación para esta oxidación es el tipo de explante utilizado, respecto a esto el grado de desarrollo de la planta donadora, la incidencia de luz en el explante, la longitud y grosor del mismo pueden influir en la oxidación (Azofeifa, 2009). Posiblemente el tamaño de los explantes fue muy pequeño, siendo más vulnerables a oxidarse.

En el cultivo *in vitro*, uno de los problemas más frecuentes y de difícil manejo es la oxidación, la cual se debe a la presencia de radicales libres de diferentes componentes celulares, así como a la oxidación de algunos compuestos como taninos, fenoles y polifenoles catalizados por la enzima polifenol oxidasa para producir quinonas, las cuales son especies químicas muy reactivas y propensas a reaccionar, lo que inhibe las actividades enzimáticas relacionadas con la síntesis de proteínas y la respuesta de las células vegetales a los diferentes RCV, generando daño e incluso la muerte celular. Por ello, si la oxidación es alta, puede causar la

nula respuesta morfogénica *in vitro* en los explantes, y una posterior necrosis de estos (Mroginski y Roca, 1991; Bray *et al.*, 2000).

Una de las estrategias para evitar los procesos de oxidación *in vitro*, es el uso de medio líquido, debido a que promueve la dilución de sustancias tóxicas (Azofeifa, 2009). Sin embargo, el empleo de los puentes de papel filtro pudo haber impedido la dispersión de los compuestos fenólicos en el medio, y por tanto los explantes fueron más propensos a oxidarse. El uso de tratamientos antioxidantes con ácido ascórbico y ácido cítrico es otra estrategia para evitar este proceso (Azofeifa, 2009; Gómez, 2010, Olguín 2012) como se observó con el tratamiento en *A. obscura*, ya que se registraron menos explantes oxidados en el medio sólido.

### **Organogénesis indirecta**

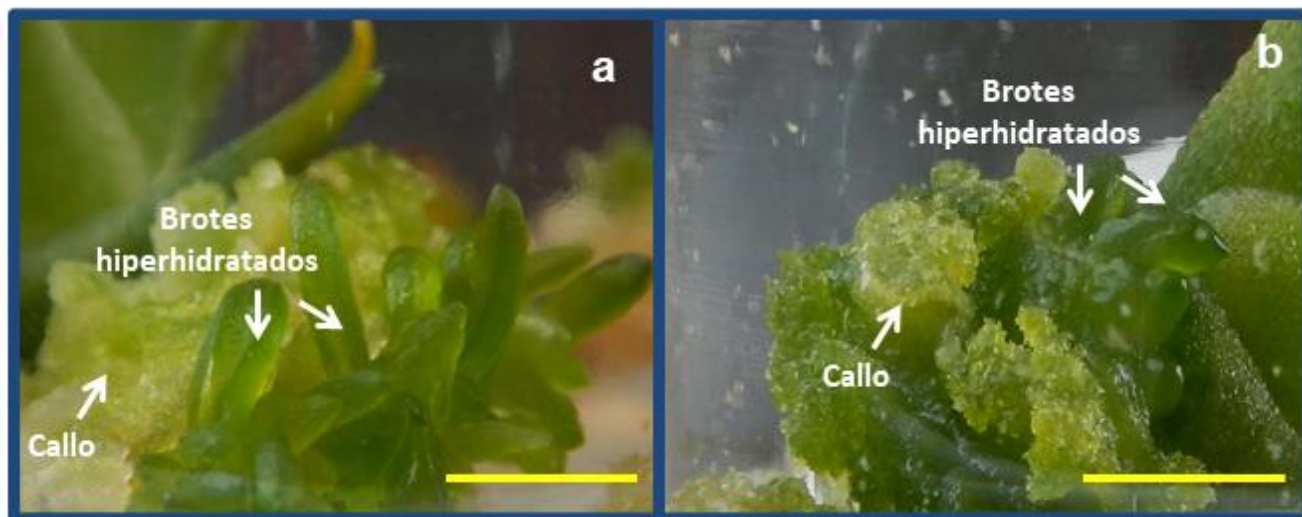
En ambas especies, en todos los tratamientos con auxina se observó la formación de callo, después del primer mes de cultivo, y en algunas concentraciones la formación de brotes por organogénesis indirecta.

En *A. salmiana*, la producción de brotes a partir de callo se originó en los explantes de hoja con las concentraciones BA/ANA 3/1 y 5/1 mg L<sup>-1</sup> en el ensayo preliminar (Figura 16a). En el medio líquido se observó con BA/ANA 1/0.5 y 5/0.5 mg L<sup>-1</sup> (Figura 16b), y en el medio sólido con 0.5/0.5 y 1/0.5 mg L<sup>-1</sup>.

El callo se formó principalmente en los explantes de tallo, este callo tenía un aspecto compacto de color amarillento, y no generó brotes. El segundo tipo de callo, observado en los explantes de hoja, tuvo un aspecto friable (desmenuzable) y color verde, en el cual se generaron brotes vía organogénesis indirecta, sin embargo, el 92% de estos brotes presentó

## Propagación *in vitro* de *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck y *Agave obscura* Schiede (Agavaceae)

hiperhidratación; en promedio midieron 0.5 cm de altura y, al momento de ser subcultivados sólo habían desarrollado dos hojas.



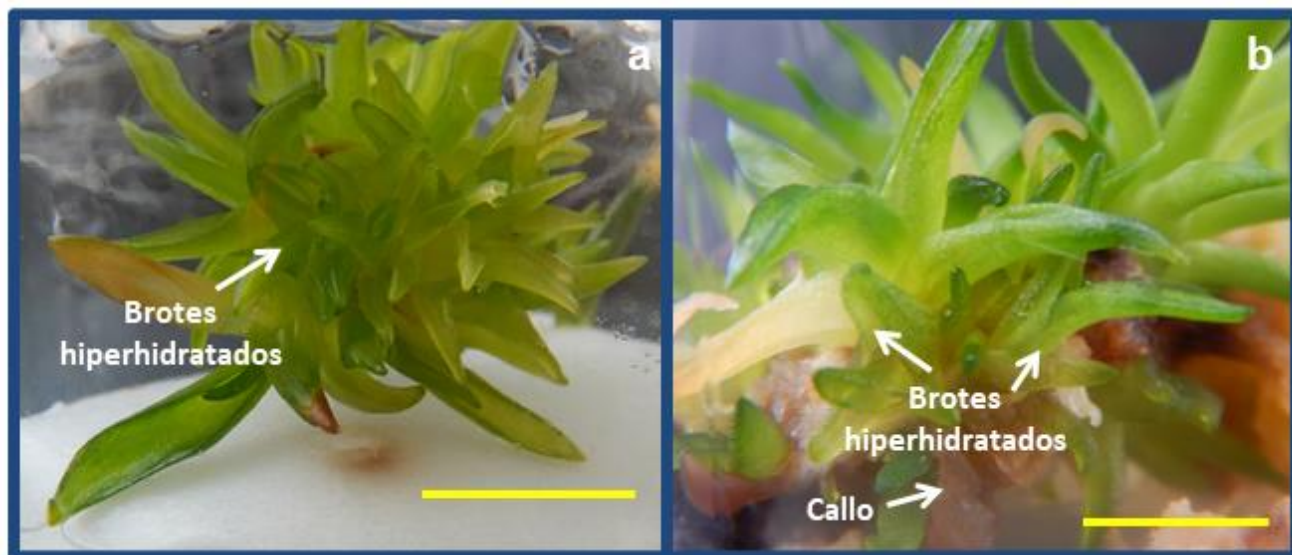
**Figura 16.** Brotos hiperhidratados vía organogénesis indirecta en explantes de hoja de *A. salmiana* con BA/ANA 3/1 mg L<sup>-1</sup> a los tres meses de cultivo en medio sólido en el ensayo preliminar (a), y en 1/0.5 mg L<sup>-1</sup> después de dos meses en medio líquido (b) (Barra=0.5 cm).

En *A. obscura*, la organogénesis indirecta, se observó en explantes de hoja con BA/ANA 5/0.5 mg L<sup>-1</sup> en el medio líquido, y con BA/ANA 2/0.5 y 5/0.5 mg L<sup>-1</sup> en el medio sólido (Figura 17). Este callo tenía aspecto friable y de color verde. Al igual que en *A. salmiana*, la mayoría de estos brotes presentaba hiperhidratación, en promedio median 0.5 cm de altura, al momento de ser subcultivados sólo habían desarrollado dos o tres hojas.

En ambas especies, como se mencionó, los brotes provenientes tanto de medio líquido como sólido generados vía organogénesis indirecta presentaron hiperhidratación, estos brotes de ambos tipos de callo (compacto y friable) fueron individualizados y transferidos a medio sólido MS50% con CA 1.5 g L<sup>-1</sup>, con el objetivo de disminuir la humedad relativa a la que se encontraban expuestos, sin reguladores de crecimiento vegetal y se mantuvieron por tres meses en las mismas condiciones de incubación. El callo no produjo nuevos brotes. Al inicio del subcultivo, los brotes hiperhidratados presentaban color verde, después de dos meses de

## Propagación *in vitro* de *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck y *Agave obscura* Schiede (Agavaceae)

incubación se tornaban de color amarillo o blanco, y no se observó disminución de la hiperhidratación, ni su elongación o desarrollo (formación de más hojas), de acuerdo a Ziv y Chen (2008) los brotes hiperhidratados se dañan fácilmente por la desecación y tienen bajas tasas de sobrevivencia si se subcultivan, o si se transfieren a un entorno *ex vitro*.



**Figura 17.** Brotos hiperhidratados obtenidos por organogénesis indirecta en explantes de hoja de *A. obscura* después de dos meses de cultivo con BA/ANA 5/0.5 mg L<sup>-1</sup> en medio líquido (a) (Barra=1 cm) y en medio sólido (b) (Barra=0.5 cm)

A los tres meses de cultivo, el callo y los brotes hiperhidratados comenzaron a necrosarse. Por otro lado, sólo el 8% y 2% de los brotes generados a partir de callo de *A. salmiana* y *A. obscura*, respectivamente, no presentaron hiperhidratación y, continuaron su elongación, enraizamiento y fueron aclimatizados.

### Enraizamiento y aclimatización

Para la proliferación de brotes, los cultivos se establecen con concentraciones de citocininas, posteriormente, para que los brotes formen raíces se transfieren a medios de cultivo sin RCV o con auxinas, debido a que las citocininas pueden inhibir la formación y crecimiento de las

## Propagación *in vitro* de *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck y *Agave obscura* Schiede (Agavaceae)

raíces, al retirarlas del medio de cultivo se inicia el desarrollo de raíces en los brotes (Enríquez del Valle *et al.*, 2005; Aureoles-Rodríguez *et al.*, 2008).

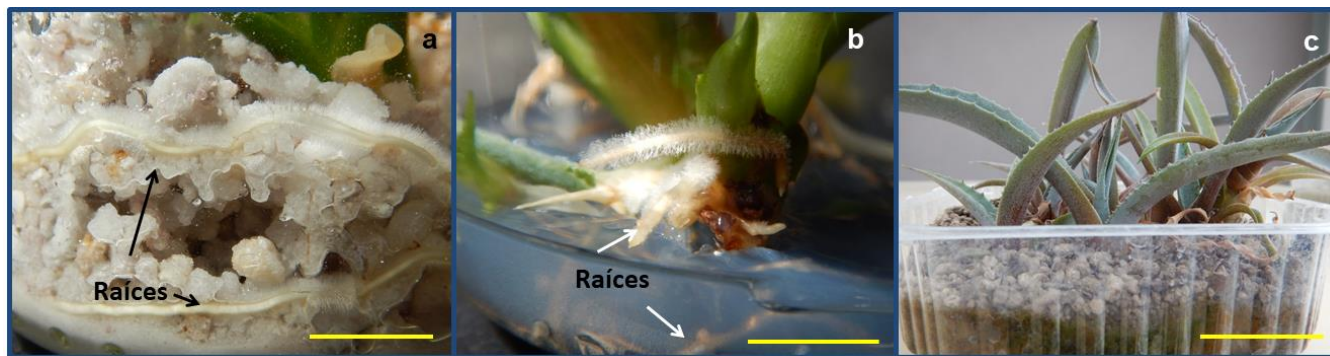
Algunos autores reportan la adición de auxinas como AIA y AIB al medio para la producción de raíces en los brotes de *A. amaniensis*, *A. sisalana*, *A. angustifolia*, *A. salmiana*, *A. warelliana*, *A. grijalvensis* (Andrijany *et al.*, 1999; Hazra *et al.*, 2002; Enríquez del Valle *et al.*, 2005; Silos-Espino *et al.*, 2011; Santos, 2009; Santiz *et al.*, 2012).

En *A. salmiana* y *A. obscura*, los brotes obtenidos en el ensayo preliminar, que fueron enraizados en medio MS, formaron raíces en un 100%; el mismo resultado se obtuvo en los brotes enraizados de ambas especies provenientes de los medios MS50% líquido con agrolita y MS50%+CA sólido, en todos los casos sin la adición de auxinas (Tabla 6). Gómez (2010), para *A. salmiana*, tampoco reporta el uso de RCV para el enraizamiento, lo cual indica que no es necesario el uso de auxinas para inducir la formación *in vitro* de raíces en la especie. Por otra parte, Silos-Espino *et al.* (2011) obtuvieron un mayor número de raíces en MS+AIA 0.2 mg L<sup>-1</sup> (4 raíces primarias con 16.6 cm de longitud) en contraste con lo registrado en MS basal (2 raíces).

### ***Agave salmiana***

En MS50% líquido, el desarrollo de las raíces fue más rápido (dos semanas) que en medio sólido (cuatro semanas), sin embargo, durante el desarrollo las raíces la visibilidad se dificultó debido a la presencia de la agrolita, y las raíces fueron más evidentes hasta el segundo mes (Figura 18a). Las raíces en el medio MS50%+CA sólido fueron visibles hasta las cuatro semanas de cultivo (Figura 18b).





**Figura 18.** Enraizamiento y aclimatización de *Agave salmiana*. Formación de raíces en: medio MS50% líquido con agrolita (a) y en medio MS50% con CA 1.5 g L<sup>-1</sup> (b) (Barra= 1 cm); aclimatización de los brotes a los cinco meses de siembra en sustrato (c) (Barra= 3 cm).

La sobrevivencia *ex vitro* de los brotes enraizados de *A. salmiana* estuvo relacionada con el tiempo de pre-aclimatización: entre mayor fue el tiempo, el porcentaje de sobrevivencia se incrementó. Con cinco meses de permanencia en un cuarto de incubación se obtuvo el 77.77% para las plantas enraizadas en medio MS sólido y el 83.92% para los brotes del medio MS50% líquido con agrolita. Los brotes del medio MS50%+CA sólido que tuvieron sólo un mes, sobrevivieron en un 39.86% (Tabla 6).

En los brotes enraizados en medio sólido (MS y/o MS50%+CA) se registró menor tamaño en su longitud comparados con los obtenidos en medio líquido (MS50% con agrolita). Al momento de ser transferidos a suelo, los brotes provenientes de los medios sólidos de enraizamiento alcanzaron en promedio 4 cm de altura y presentaban 2-3 hojas con 4 raíces de 10 cm de longitud, en contraste en el medio MS50% líquido con agrolita, las plantas midieron 6 cm de altura y presentaban 4-5 hojas, con 6 raíces de 15 cm de longitud.

Para *A. salmiana*, Gómez (2010) reportó un bajo porcentaje de sobrevivencia (44%), mientras que para la misma especie Silos-Espino *et al.* (2011) obtuvieron el 100%. Esta diferencia puede deberse al desarrollo del sistema radical, número de raíces y longitud que los brotes tenían al momento de su transferencia a sustrato, sin embargo, estos datos no fueron

## Propagación *in vitro* de *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck y *Agave obscura* Schiede (Agavaceae)

reportados en ambos trabajos. La eficiencia en el uso de medio líquido como método de enraizamiento se refleja en los porcentajes más altos de sobrevivencia observados (Tabla 6).

### *Agave obscura*

En medio MS50% líquido, el desarrollo de las raíces fue más rápido respecto al desarrollo que se observó en el medio sólido, ya que ocurrió a las dos semanas (Figura 19a). La formación de las raíces en el medio MS50% sólido fue visible a las cuatro semanas de cultivo (Figura 19b). En esta especie se obtuvo el 100% de enraizamiento en todos los medios ensayados. Domínguez (2009) también reportó para *A. obscura* el 100% de éxito en medio MS basal.



**Figura 19.** Enraizamiento y aclimatización de *A. obscura*. Formación de raíces en: medio líquido MS al 50% con agrolita (a) (Barra= 0.5 cm) y en medio sólido MS al 50% con CA 1.5 g L<sup>-1</sup> (b) (Barra= 1 cm); aclimatización de los brotes a los cinco meses de siembra en sustrato (c) (Barra= 2 cm).

Al igual que en *A. salmiana*, el porcentaje de sobrevivencia estuvo relacionado con el tiempo que las plantas permanecieron en un cuarto de incubación *ex vitro* antes de ser transferidas a un invernadero. En *A. obscura*, con cinco meses, los porcentajes alcanzados fueron del 80.62% (MS50% líquido con agrolita) y del 71.69% (MS50%+CA sólido), en cambio, con un mes de pre-aclimatización se obtuvo el más bajo porcentaje (67.56%) (Tabla 6).

Las plantas enraizadas en medio líquido con agrolita alcanzaron, en promedio, mayor talla y número de hojas (5 cm y seis hojas), al igual que raíces más largas y en mayor cantidad (10

Propagación *in vitro* de *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck y *Agave obscura* Schiede (Agavaceae)

cm, seis raíces). Estas últimas, fueron en general más vigorosas que las que provenían de medio sólido, que tuvieron en promedio una longitud de 4 cm y cuatro hojas, y cuatro raíces de 8 cm.

**Tabla 6.** Porcentaje de enraizamiento en distintos medios de los brotes obtenidos en dos especies de *Agave*, y su sobrevivencia *ex vitro*.

Especie	Medio de inducción de brotes con diferentes concentraciones de BA y ANA	Medio de enraizamiento	Enraizamiento <i>in vitro</i> (%)	Pre-aclimatización <i>ex vitro</i> (meses)	# Plantas sembradas en el sustrato	# Plantas aclimatizadas	Sobrevivencia <i>ex vitro</i> (%)
<i>Agave salmiana</i>	MS sólido	MS	100	5	90	70	77.67
	MS líquido	MS50% líquido	100	5	112	94	<b>83.92</b>
	MS sólido	MS50%+CA sólido	100	1	148	59	39.86
<i>Agave obscura</i>	MS sólido	MS	100	1	37	25	67.56
	MS líquido	MS50% líquido	100	5	129	104	<b>80.62</b>
	MS sólido	MS50%+CA sólido	100	5	53	38	71.69

En los medios líquidos la disponibilidad de nutrimentos es mayor, lo cual influye en el mejor desarrollo de las plantas propagadas (Hvoslef-Eide y Preil, 2005), como se pudo constatar para *A. salmiana* y *A. obscura* en este medio, se observó un mayor desarrollo en altura, número de hojas y raíces (Figura 20). Es importante destacar que el uso de medio líquido como método de enraizamiento de brotes en el género *Agave* ha sido poco reportado. Para *A. sisalana*, Nikam (1997) reportó el enraizamiento de brotes en MS50% líquido con arena como material de soporte, sin embargo, no menciona el porcentaje de enraizamiento ni de sobrevivencia.



**Figura 20.** Desarrollo de raíces de *A. salmiana*. a la izquierda con medio MS50% sólido con CA, a la derecha planta en medio MS50% líquido con agrolita (Barra= 1 cm).

### Propagación *in vitro* de *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck y *Agave obscura* Schiede (Agavaceae)

Domínguez (2009) reportó el 100% en la sobrevivencia *ex vitro* de *A. obscura* y, para otras cuatro especies, un promedio del 72% (*A. cupreata*, *A. difformis*, *A. karwinskii* y *A. potatorum*), asimismo menciona que el porcentaje de sobrevivencia *ex vitro* puede incrementarse utilizando otros sustratos ya que los requerimientos de las plantas varían entre especies en función de las condiciones del hábitat natural. En *A. obscura*, Domínguez (2009) utilizó tierra y arena (1:1) y en el presente trabajo se utilizó tierra negra y agrolita (1:1).

La totalidad de las plantas aclimatizadas *ex vitro* (223 de *A. salmiana* y 167 de *A. obscura*) continúan vivas después de dos años en un invernadero y muestran un crecimiento vigoroso (Figura 21).



**Figura 21.** Plantas de *A. salmiana* (arriba) y de *A. obscura* (abajo) sembradas en bolsas negras individuales después de 24 meses en condiciones *ex vitro* en un invernadero.

**Propagación *in vitro* de *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck y *Agave obscura* Schiede (Agavaceae)**



## CONCLUSIONES

- El máximo porcentaje de **germinación** *in vitro* para *Agave salmiana* fue del 96.6% y en *Agave obscura* del 46.1%, ambos en medio MS50%+carbón activado 1.5 g L<sup>-1</sup>.
- En ambas especies, los brotes se formaron **vía organogénesis directa** y el **explante más regenerativo fue el tallo**. La porción basal de la hoja mostró su potencial regenerativo, sin embargo, la respuesta a la formación de brotes fue muy escasa.
- En *A. salmiana*, la mayor cantidad de **brotes** se obtuvo en medio líquido y en *A. obscura* en medio sólido.
- Los mejores tratamientos para *A. salmiana* fueron en MS líquido BA 2 mg L<sup>-1</sup> y en MS sólido BA/ANA 3/0.5 mg L<sup>-1</sup> en el explante de tallo.
- En *A. obscura*, la mejor respuesta fue en MS sólido BA/ANA 3/0.5 mg L<sup>-1</sup> en explante de tallo y BA/ANA 2/0.5 mg L<sup>-1</sup> en explante de hoja.
- En ambas especies, y en los medios con auxina, se formaron brotes por **organogénesis indirecta**, sin embargo, solo sobrevivieron del 2 al 8% hasta la aclimatización.
- En *A. obscura*, la **oxidación** de los explantes y los brotes disminuyó con el uso de una solución antioxidante de ácido ascórbico y ácido cítrico.
- En ambas especies se obtuvo el **100% de los brotes enraizados** en todos los medios ensayados (MS sólido, MS50% líquido con agrolita y MS50%+carbón activado) en ausencia de auxina.

**Propagación *in vitro* de *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck y *Agave obscura* Schiede (Agavaceae)**

- Periodos mayores de **pre-aclimatización** *ex vitro* (5 meses) aumentaron el porcentaje de sobrevivencia en ambas especies.
- El **medio líquido** con agrolita durante la fase de enraizamiento promovió el mayor desarrollo de las plantas en talla, número de hojas y de raíces.
- En *A. salmiana* y en *A. obscura* el mayor **porcentaje de sobrevivencia** se obtuvo en plantas enraizadas en MS50% líquido con agrolita.

## BIBLIOGRAFÍA

- Allsopp P., S. Possemiers, D. Campbell, I. Saldaña, C. Gill e I. Rowland. 2013. An exploratory study into the putative prebiotic activity of fructans isolated from *Agave angustifolia* and associated anticancer activity. *Anaerobe* 22: 38-44.
- Andrijany V. S., G. Indayanto y L. A. Soehono. 1999. Simultaneous effect of calcium, magnesium, copper and cobalt ions on sapogenin steroids content in callus cultures of *Agave amaniensis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 55: 103-108.
- APG II. 2003. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Botanical Journal of Linnean Society* 141: 399-436.
- APG III. 2009. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for orders and families of flowering plants. *Botanical Journal of Linnean Society* 161: 105-121.
- Arizaga J. S. 1998. Biología reproductiva de *Agave macroacantha* Zucc. en Tehuacán, Puebla. Tesis de doctorado (Biología). Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. 154 pp.
- Arizaga J. S. y E. Ezcurra. 2002. Propagation mechanisms in *Agave macroacantha* (Agavaceae), a tropical arid-land succulent rosette. *American Journal of Botany* 89(4): 632-641.
- Arzate K. 2009. Distribución de cinco especies de *Agave* y su relación con algunos parámetros ambientales en Metztlán, Hidalgo. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas (Orientación Biología Ambiental), Posgrado en Ciencias Biológicas, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. 92 pp.
- Aureoles-Rodríguez F., J. L. Rodríguez de la O, J. Sahagún-Castellanos y M. Peña Ortega. 2008. Propagación *in vitro* del “Maguey bruto” (*Agave inaequidens* Koch), una especie amenazada de interés económico. *Revista Chapingo. Serie Horticultura* 14 (3): 263-269.
- Azofeifa A. 2009. Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. *Agronomía mesoamericana* 20(1): 153-175.
- Binh L. T., L. T. Muoi, H. T. K. Oanh, T. D. Thang y D. T. Phong. 1990. Rapid propagation of agave by *in vitro* tissue culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 23: 67-70.
- Bogler D. J. y B. B. Simpson. 1995. A chloroplast DNA study of the Agavaceae. *Systematic Botany* 20: 191-205.



## Propagación *in vitro* de *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck y *Agave obscura* Schiede (Agavaceae)

- Bogler D. J. y B. B. Simpson. 1996. Phylogeny of Agavaceae based on ITS rDNA sequence variation. *Systematic Journal of Botany* 83 (9): 1225-1235.
- Bogler D. J., J. C. Pires y J. Francisco-Ortega. 2006. Phylogeny of Agavaceae based on *ndhF*, *rbcl*, and its sequences: implications of molecular data for classifications. *Aliso* 22:313-328.
- Bray E., J. Bailey-Serres, y E. Weretilnyk. 2000. Responses to abiotic stresses. En: Buchanan B., W. Gruissem, y R. Jones (Eds.). 2000. Biochemistry and molecular biology of plants. Editorial American Society of Plant Physiologists. Maryland, Estados Unidos de América, p: 1158-1203.
- Calva G. y J. Pérez. 2005. Cultivo de células y tejidos vegetales: fuente de alimentos para el futuro. *Revista Digital Universitaria*. 6 (11): 2-16.
- Campbell N. A. y J. B. Reece. 2007. Respuestas de las plantas a las señales internas y externas. En: Campbell N. A. y J. B. Reece. 2007. Biología. Editorial Panamericana, México, p: 788-816.
- Carrillo L. A. 2007. Los destilados de agave en México y su denominación de origen. *Ciencias* 87: 40-49.
- Celestino C., I. Hernández, E. Carneros, D. López-Vela y M. Toribio. 2005. La embriogénesis somática como elemento central de la biotecnología forestal. *Investigación Agraria, Sistemas y Recursos Forestales* 14(3): 345-357.
- Chase M. K., J. L. Reveal y M. F. Fay. 2009. A subfamilial classification for the expanded asparagalean families Amaryllidaceae, Asparagaceae and Xanthorrhoeaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society* 161: 132-136.
- Cházaro M. J. 1989. Agavaceae del centro de Veracruz y zona limítrofe de Puebla. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas* 34 (1): 3-15.
- Chirino Y., J. Silva y L. Yépez. 2017. Desinfección y formación de callos en tres tipos de explantes de *Agave cocui* Trelease. *KOINONIA. Revista Arbitrada Interdisciplinaria de Ciencias de la Educación, Turismo, Ciencias Sociales y Económicas, Ciencias del Agro y Mar y Ciencias Exactas y aplicadas* 2 (4): 194-208.
- Colunga P., J. Coello-Coello, L. E. Eguiarte y D. Piñero. 1999. Isozymatic variation and phylogenetic relationships between henequen (*A. fourcroydes*) and its wild ancestor *A. angustifolia* (Agavaceae). *American Journal of Botany* 86 (1): 115-123.

### Propagación *in vitro* de *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck y *Agave obscura* Schiede (Agavaceae)

- Dahlgren, R. M. T., H. T. Clifford y P. F. Yeo. 1985. The families of the Monocotyledons. Structure, evolution and taxonomy. Springer-Verlag, Berlin. 520 pp.
- Das T. 1992. Micropropagation of *Agave sisalana*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 31: 253-255.
- Debergh, P.C. 1983. Effects of agar brand and concentration on the tissue culture medium. *Physiologia Plantarum* 59: 270-276.
- Delgado-Lemus A., I. Torres, J. Blancas y A. Casas. 2014. Vulnerability and risk management of *Agave* species in the Tehuacán Valley, México. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine* 10: 53.
- Domínguez M. S. 2009. Desarrollo de herramientas biotecnológicas para la propagación masiva y mejoramiento de especies del género *Agave*. Tesis de Doctorado (Ciencias Biológicas) Universidad Autónoma de Aguascalientes, México, Aguascalientes 99 pp.
- Domínguez M. S., M. González, C. Rosales, C. Quiñones, S. Delgadillo, S. J. Mireles, E. Pérez Molphe Balch. 2008. El cultivo *in vitro* como herramienta para el aprovechamiento, mejoramiento y conservación de especies del género *Agave*. *Investigación y ciencia* 41: 53-62.
- Eguiarte L. E. 2007. ¿Qué es un mezcal? Reseña de Larson, J. (Coordinador). 2006. *Agave: Mezcales y diversidad*. Segunda edición. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de las Biodiversidad, México. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas* 52 (1): 25-28.
- Eguiarte L. E. y A. González. 2007. De genes y magueyes, el estudio y conservación de los recursos genéticos del tequila y el mezcal. *Ciencias* 87: 28-35.
- Enríquez del Valle J. R., G. Carrillo y J. L. Rodríguez de la O. 2005. Sales inorgánicas y ácido indolbutírico en el enraizado *in vitro* de brotes de *Agave angustifolia*. *Revista Fitotecnia Mexicana* 28 (2): 175-178.
- Escobar J. C. 1985. Bandas de mixioteros cortan a diario cientos de agaves: CIFMN. *Excelsior* Año LXXIII, Tomo III: 4-6.
- Etienne H. y M. Berthouly. 2002. Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 69:215-231.
- Flores N. E. y H. G. Muñoz. 2017. Micropropagación de *Agave duranguensis* en un sistema de inmersión temporal (SIT). *Jóvenes en la Ciencia. Revista de divulgación científica* 3 (2): 107-111.

## Propagación *in vitro* de *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck y *Agave obscura* Schiede (Agavaceae)

- Flores-Morales A., E. Castañeda-Hidalgo, F. J. Sánchez-Pérez, L. Romero Aguilar y J. Ruiz-Luna. 2009. Mecanismos de conservación y uso del maguey pulquero *Agave salmiana* en el Altiplano mexicano. *Agricultura Sostenible* 6: 349-358.
- Gahan P. B. 2007 Totipotency and the cell cycle. En: Mohan Jain S. y H. Häggman (Eds.) *Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits*. Springer, The Netherlands, p: 3-14.
- Galván R. 1990. El género *Agave* en el Valle de México. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas* 35 (2): 30-34.
- Gaona J. y J. C. Montañez. 2017. Extracción de Pectina a partir de residuos de *Agave lechuguilla*. En: Pérez C. M. (Comp.). *Química Joven*. Universidad Autónoma de Coahuila. México, Coahuila. p: 1-12.
- García-Herrera E., S. J. Méndez-Gallegos y D. Talavera-Magaña. 2010. El género *Agave* spp. en México: principales usos de importancia socioeconómica y agroecológica. *Salud Pública y Nutrición* 5: 109-129.
- García-Mendoza A. J. 1998. Con sabor a maguey. Guía de la colección nacional de Agaváceas y Nolináceas del Jardín Botánico del Instituto de Biología, UNAM. *Ciencias* 52: 87.
- García-Mendoza A. J. 2002. Distribution of *Agave* (Agavaceae) in México. *Cactus and Succulent Journal*. 74: 177-186.
- García-Mendoza A. J. 2004. Agaváceas. En: García-Mendoza A., M. J. Ordoñez y M. Briones-Salas (Eds.). *Biodiversidad de Oaxaca*. Instituto de Biología, UNAM-Fondo Oaxaqueño para la conservación de la naturaleza. México. p: 159-169.
- García-Mendoza A. J. 2007. Los agaves de México. *Ciencias* 87: 14-23.
- García-Mendoza A. J. 2011. Agavaceae. Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Biología Fascículo 88: 52-53.
- García-Mendoza A. J. y C. Chávez-Rendón. 2013. *Agave kavandivi* (Agavaceae: grupo *Striatae*) una especie nueva de Oaxaca, México. *Revista mexicana de biodiversidad* 84(4): 1070-1076.
- Gaspar T., C. Kevers, C. Penel, H. Greppin, D. M. Reid y T. A. Thorpe. 1996. Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 32(4): 272-289.

## Propagación *in vitro* de *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck y *Agave obscura* Schiede (Agavaceae)

- Gentry H. S. 1982. *Agaves of Continental North America*, The University of Arizona Press, Tucson, Estados Unidos de América, 638 pp.
- George E. F. 2008. Plant Tissue Culture Procedure-Background. En: George E. F., M. A. Hall, y G. J. De Klerk (Eds.). *Plant propagation by tissue culture*. Volumen 1. The background. Tercera Edición. Springer. p: 1-28.
- George E. F. y G. J. De Klerk. 2008. The components of plant tissue culture media I: macro- and micro-nutrients. En: George E. F., M. A. Hall, y G. J. De Klerk (Eds.). *Plant propagation by tissue culture*. Volumen 1. The background. Tercera Edición. Springer. p: 65-113.
- George E. F. y P. C. Debergh. 2008. Micropropagation: uses and methods. En: George E. F., M. A. Hall, y G. J. De Klerk (Eds.). *Plant propagation by tissue culture*. Volumen 1. The background. Tercera Edición. Springer. p: 29-64.
- George E. F. y W. Davies. 2008. Effects of the physical environment. En: George E. F., M. A. Hall, y G. J. De Klerk (Eds.). *Plant propagation by tissue culture*. Volumen 1. The background. Tercera Edición. Springer. p: 423-464.
- Gil K., M. González, O. Martínez de la Vega, J. Simpson y G. Vandemark. 2001. Analysis of genetic diversity in *Agave tequilana* var. azul using RAPD markers. *Euphytica* 119: 335-341.
- Gómez R. 2008. Regeneración *in vitro* de *Ariocarpus bravoanus*, Hernández y Anderson (Cactaceae), especie endémica mexicana en peligro de extinción. Tesis de Licenciatura (Biología), Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D. F. 71 pp.
- Gómez R. M. del C. 2010. Inducción morfogénica de las palmas (*Chamaedorea elegans* Mart. y *Chamaedorea sartorii* Liebm) y el agave (*Agave salmiana* Otto.) mediante cultivo *in vitro*. Tesis de Licenciatura (Biología), Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. 118 pp.
- González G., S. Alemán, R. Trujillo, M. Keb, E. Abreu, F. Barredo, M. L. Robert, R. Ortiz y M. T. Cornides. 2004. El cultivo *in vitro* como alternativa en la recuperación henequenera (*Agave fourcroydes*) *Biotecnología Aplicada* 21(1): 44-48.
- Guillot D., P. Van Der Meer, E. Laguna y J. A. Roselló. 2009. El género *Agave* L. en la flora alóctona valenciana. *Monografías de la Revista Bouteloua* 94 pp.
- Hazra S. K., S. Das y A. K. Das. 2002. Sisal plant regeneration via organogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 70: 235-240.

## Propagación *in vitro* de *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck y *Agave obscura* Schiede (Agavaceae)

- Hunter A.F. y L. W. Aarssen. 1988. Plants helping plants. *BioScience* 38: 34-40.
- Hvoslef-Eide A. K. y W. Preil. 2005. Liquid Culture Systems for *in vitro* plant propagation. Springer. Estados Unidos de América. 588 pp.
- Iriondo J. M. 2001. Conservación de germoplasma de especies raras y amenazadas. *Investigación agraria. Producción y protección de vegetales* 16 (1): 5-24.
- Jasso-Padilla I., B. Juárez-Flores, G. Álvarez-Fuentes, A. De la Cruz-Martínez, J. González-Ramírez, M. Mescosa-Santillán, M. González-Chávez, C. Oros-Ovalle, F. Prell, P. Czermak y F. Martínez-Gutiérrez. 2017. Effect of prebiotics of *Agave salmiana* fed to healthy Wistar rats. *Journal of Science of Food and Agriculture* 97 (2): 556-563.
- Jordan P. y P. Nobel. 1979. Infrequent establishment of seedlings of *Agave deserti* (Agavaceae) in the northwestern Sonoran desert. *American Journal of Botany* 66(9): 1079-1084.
- Kevers C., T. Franck, R. J. Strasser, J. Domes y T. Gaspar. 2004. Hyperhydricity of micropropagated shoots: a typically stress-induced change of physiological state. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 77: 181-191.
- Lema-Ruminska J. y D. Kulus. 2014. Micropropagation of cacti-a Review. *Haseltonia* 19: 46-63.
- López A. L., y L. P. Olguín. 2013. El cultivo de tejidos vegetales como un método de propagación. En: Márquez J., M. Collazo, M. Martínez, A. Orozco, y S. Vázquez (Eds.). *Biología de angiospermas*. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D. F. p: 521–527.
- López A. L., L. P. Olguín, J. Márquez, y M. López. 1996. Establecimiento y propagación *in vitro* de cactáceas mexicanas. En: Cátedra Nacional de Biología (2008). Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. p: 55-65.
- López-Escamilla A. L., M. López-Herrera y C. Loaiza-Alanís. 2016. Efecto de diferentes agentes gelificantes en la germinación y desarrollo *in vitro* de plántulas de *Echinocactus platyacanthus* Link Et Otto (Cactaceae). *Polibotánica* 42: 153-166.
- Machakova I., E. Zazimalova y E.F. George. 2008. Plant Growth Regulators I: introduction; Auxins, their analogues and inhibitors. En: George E. F., M. A. Hall, y G. J. De Klerk (Eds.). *Plant propagation by tissue culture. Volume 1. The background*. Tercera Edición. Springer. p: 29-64.

## Propagación *in vitro* de *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck y *Agave obscura* Schiede (Agavaceae)

- Malda G., H. Suzán y R. Backhaus. 1999. *In vitro* culture as a potential method for the conservation of endangered plants possessing Crassulacean Acid Metabolism. *Scientia Horticulturae* 81: 71-87.
- Malda G. y M. L. Ruiz. 2004. Comparación en el crecimiento de magueyes pulqueros (*Agave salmiana* Otto ex Salm y *Agave mapisaga* Trel) bajo esquemas de propagación *in vitro* y condiciones de invernadero. *Biología Scripta* 1(1): 1-6.
- Mandujano M. C. 2007. La clonalidad y sus efectos en la biología de poblaciones. En: Eguiarte L. E., V. Souza y X. Aguirre (Comp.). Ecología molecular. SEMARNAT, Instituto Nacional de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, CONABIO. México, D. F. p: 215-250.
- Martínez-Palacios A., M. P. Ortega-Larrocea, V. M. Chávez y R. Bye. 2003. Somatic embryogenesis and organogenesis of *Agave victoria-reginae*: Considerations for its conservation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 74: 135-142.
- Martínez-Salvador M., R. Mata-González, C. Morales, R. Valdez-Cepeda. 2012. *Agave salmiana* plant communities in central Mexico as affected by commercial use. *Environmental Management* 49: 55-63.
- Moebius-Goldammer K. G., M. Mata-Rosas, y V. M. Chávez-Ávila. 2003. Organogenesis and somatic embryogenesis in *Ariocarpus kotschoubeyanus* (Lem.) K. Schum. (Cactaceae), an endemic and endangered mexican species. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 39 (4): 388–93.
- Monja-Mio K. M. y M. L. Robert. 2013. Direct somatic embryogenesis of *Agave fourcroydes* Lem. Through thin cell layer culture. *In vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 49: 541-549.
- Montejo A. B. y H. G. Núñez. 2016. Utilización de un sistema de inmersión temporal (SIT) para multiplicar plantas ornamentales de *Agave victoria-reginae* (T. Moore). *Jóvenes en la Ciencia. Revista de divulgación científica* 2 (1): 1429-1433.
- Mroginski L. A. y W. M. Roca. 1991. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales *in vitro*. En: Roca W. M. y L. A. Mroginski (Eds.). Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. Centro internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia, p: 19-40.
- Murashige T. y F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15(3): 473–497.

### Propagación *in vitro* de *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck y *Agave obscura* Schiede (Agavaceae)

- Nikam T. D. 1997. High frequency shoot regeneration in *Agave sisalana*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 51: 225-228.
- Nikam T. D., G. M. Bansude y K. C. Aneesh. 2003. Somatic embryogenesis in sisal (*Agave sisalana* Perr. Ex. Engelm). *Plant Cell Reports* 22: 188-194.
- Nobel P. S. 1988. Environmental biology of Agaves and Cacti. Cambridge University Press, Nueva York, Estados Unidos de América, 270 pp.
- Nobel P. S., A. A. Israel y N. Wang. 1996. Growth, CO<sub>2</sub> uptake, and responses of the carboxylating enzymes to inorganic carbon in two highly productive CAM species at current doubled concentrations. *Plant, cell and environment* 19(5): 585-592.
- Olguín S., L. P. 2012. Organogénesis *in vitro* de *Picea chihuahuana* Martínez (Pinaceae). Tesis de Maestría en Ciencias (Biología Vegetal). Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. 126 pp.
- Orellana, P. 1998. Propagación vía organogénesis. En: Pérez J. (Ed.). Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas. 1era edición. Universidad Central de las Villas. Santa Clara, Cuba. p: 151-178.
- Pan M. J. y J. van Staden. 1998. The use of charcoal in *in vitro* culture- A review. *Plant Growth Regulation* 26: 155-163.
- Peña-Valdivia C.B., A.B. Sánchez-Urdaneta, J.R. Aguirre R., C. Trejo, E. Cárdenas y A. Villegas- Monter. 2006. Temperature and mechanical scarification on the germination of 'maguey' (*Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck) seeds. *Seed Science and Technology* 34:47-56.
- Phillips G. C. 2004. *In vitro* morphogenesis in plants: recent advances. *In vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 40 (4): 342-345.
- Pietropaolo P. 1981. Plant tissue culture. *The American Biology Teacher* 43(9):508-512.
- Portillo L., F. Santacruz-Ruvalcaba, A. Gutiérrez-Mora y B. Rodríguez-Garay. 2007. Somatic embryogenesis in *Agave tequilana* Weber Cultivar azul. *In vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 43(6): 569-575.
- Powers D. E. y R. A. Backhaus. 1989. *In vitro* propagation of *Agave arizonica* Genrty & Weber. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 16: 57-60.
- Ramage C. M. y R. R. Williams 2002. Mineral nutrition and plant morphogenesis. *In vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 38 (2): 116-124.

## Propagación *in vitro* de *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck y *Agave obscura* Schiede (Agavaceae)

- Ramírez-Malagón R., A. Borodanenko, L. Pérez-Moreno, M. D. Salas-Araiza, H. G. Núñez-Paleniús y N. Ochoa-Alejo. 2008. *In vitro* propagation of three *Agave* species used for liquor distillation and three for landscape. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 94: 201-207.
- Razdan, M. K. 2003. Introduction to plant tissue culture. Segunda edición. Ed. Science Publishers, Estados Unidos de América, 375 pp.
- Robert M. L., J. L. Herrera-Herrera, E. Castillo, G. Ojeda y M. A. Herrera-Alamillo. 2006. An efficient method for the micropropagation of agave species. En: *Plant Cell Culture Protocols*, Humana Press. p: 165-178.
- Robert M. L., J. L. Herrera, F. Contreras y K. N. Scorer. 1987. *In vitro* propagation of *Agave fourcroydes* Lem. (Henequen). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 8: 37-48.
- Rocha M., S. V. Good-Ávila, F. Molina-Freaner, H. T. Arita, A. Castillo, A. García-Mendoza, A. Silva-Montellano, B. S. Gaut, V. Souza y L. E. Eguiarte. 2006. Pollination biology and adaptive radiation of Agavaceae, with special emphasis on the genus *Agave*. *Aliso* 22: 329-344.
- Rodríguez-Garay B., A. Gutiérrez-Mora y B. Acosta-Dueñas. 1996. Somatic embryogenesis of *Agave victoria-reginae* Moore. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 46: 85-87.
- Rodríguez-Sahagún A., G. Acevedo, J. M. Rodríguez, B. Rodríguez-Garay, J. Cervantes, O. Castellanos. 2011. Effect of light quality and culture medium on somatic embryogenesis of *Agave tequilana* Weber var. Azul. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 104: 271-275.
- Rojas-Aréchiga M. y C. Vázquez-Yanes. 2000. Cactus seed germination: a review. *Journal of Arid Environments* 44: 85-104.
- Rosas R. 2018. Efecto del aguamiel-pulque y auxinas-citocininas en la inducción *in vitro* de PLBs en *Phalaenopsis* sp. Tesis de Licenciatura (Ingeniero agrónomo en floricultura), Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad Autónoma del Estado de México. México, Toluca. 41 pp.
- Rzedowski J. 1968. Las principales zonas áridas de México y su vegetación. *Bios. Revista del Seminario de Estudios Biológicos* 1: 4-24.
- Sánchez-Urdaneta, A.B., C.B. Peña-Valdivia, J.R. Aguirre R. 2002. Caracterización de la germinación de semillas de *Agave salmiana*. Memorias del Congreso Nacional de Citogenética, Saltillo, Coahuila, México. 382 pp.
- Santacruz-Ruvalcaba F., H. Gutiérrez-Pulido y B. Rodríguez-Garay. 1999. Efficient *in vitro* propagation of *Agave parrasana* Berger. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 56: 163-167.



## Propagación *in vitro* de *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck y *Agave obscura* Schiede (Agavaceae)

- Santacruz-Ruvalcaba F. y L. Portillo. 2009. Thin cell suspension layer as a new methodology for somatic embryogenesis in *Agave tequilana* weber cultivar azul. *Industrial crops and products* 29: 609-614.
- Santiz J.A., R. Rincón-Rosales y F.A. Gutiérrez-Miceli. 2012. Propagación *in vitro* de *Agave grijalvensis* B.Ullrich, una especie endémica de Chiapas bajo protección especial. *Gayana Botánica* 69 (Número especial): 23-30.
- Santos J. C. 2009. Micropropagación de *Agave warelliana* (Baker, 1877). Tesis de Licenciatura (Biólogo). Facultad de Biología, Universidad Veracruzana. México, Veracruz. 34 pp.
- Schenck R. U. y A. C. Hildebrandt. 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledoneous and dicotyledoneous plant cell cultures. *Canadian Journal of Botany* 50: 199-204.
- SEMARNAT. 2010. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y Fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones de inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. *Diario oficial de la federación*. Página en red: [www.semarnat.gob.mx](http://www.semarnat.gob.mx) Consultada 17 junio 2018.
- Silos-Espino H., Tovar-Robles C. L., González-Cortés N., Méndez-Gallegos S. J. y D. Rossel-Kipping. 2011. Estudio integral del maguey (*Agave salmiana*) propagación y valor nutricional. *Revista Salud Pública y Nutrición* 5: 75-82.
- Smith, M. y L. Spoomer. 1995. Vessels, gels, liquid media and support systems. En: J. Aitken, Christie, T. Kozai, M.A.L. Smith (Eds.). *Automation and environmental control in plant tissue culture*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. p: 145-163.
- Szabados L., V. M. Núñez, L. M. Tello, G. Mafla, J. Roa y W. M. Roca. 1993. Agentes gelatinizadores en el cultivo de tejidos. En: Roca W. M. y L. A. Mroginski (Eds.). *Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones*. Centro internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia p: 80-93.
- Taiz L. y E. Zeiger. 2006. *Fisiología vegetal*. Tercera edición. Publicaciones de la Universidad de Jaume I, España, 1338 pp.
- Tejavathi D. H., M. D. Rajanna, R. Sowmya y K. Gayathamma. 2007. Induction of somatic embryos from cultures of *Agave vera-cruz*. *In vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 43(5): 423-428.

## Propagación *in vitro* de *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck y *Agave obscura* Schiede (Agavaceae)

- Telo L. F. 2017. Barreras combinadas de piedra y *Agave angustifolia* L. para la retención de suelos en afloramientos rocosos. *CFORES Revista Cubana de Ciencias Forestales* 5(2): 207-225.
- Thomas T. D. 2008. The role of activated charcoal in plant tissue culture. *Biotechnology advances* 26: 618-631.
- Thorpe T., C. Stasolla, E. C. Yeung, G. J. De Klerk, A. Roberts y E. F. George. 2008. The components of plant tissue culture media II: organic additions osmotic and pH effects, and support systems. En: George E. F., M. A. Hall, y G. J. De Klerk (Eds.). *Plant propagation by tissue culture*. Volumen 1. The background. Tercera Edición. Springer. p: 115-173.
- Toribio H. 2005. Comportamiento de explantes de agave pulquero (*Agave atrovirens*) en la interacción de dos reguladores de crecimiento. Tesis de Maestría en Tecnología Avanzada. Posgrado en Tecnología Avanzada, Instituto Politécnico Nacional, Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada. México, Tlaxcala. 39 pp.
- Valencia S., M. J. Martínez, R. Cruz, J. Jiménez y E. T. Rodríguez. 2012. Glosario ilustrado de embriofitas. Las prensas de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D. F., 119 pp.
- Valenzuela-Sánchez K. K., R. E. Juárez-Hernández, A. Cruz-Hernández, V. Olalde-Portugal, M. E. Valverde y O. Paredes-López. 2006. Plant regeneration of *Agave tequilana* by indirect organogenesis. *In vitro Cellular and Developmental Biology – Plant* 42(4): 336-340.
- Vázquez E., J. R. García, C. B. Peña, H. M. Ramírez y V. Morales. 2011. Tamaño de la semilla, emergencia y desarrollo de la plántula de maguey (*Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck). *Revista de Fitotecnia Mexicana* 34(3): 167-173.
- Zimmerman J. L. 1993. A model for early development somatic embryogenesis in higher plants. *The Plant Cell* 5 (10): 1411–1423.
- Ziv M. y J. Chen. 2008. The anatomy and morphology of tissue culture plants. En: George E. F., M. A. Hall, y G. J. De Klerk (Eds.). *Plant propagation by tissue culture*. Volumen 1. The background. Tercera Edición. Springer. p: 465-477.

## ANEXOS

### Anexo 1. Principales usos de importancia socioeconómica y agroecológica del *Agave* spp. (Modificado de García-Herrera *et al.*, 2010)

Uso	Producto	Parte de la planta utilizada
Alimentación	Azúcar, guisos, envolver barbacoa, mixiotes, gusanos blancos, gusanos rojos (“chinicuilés”), pan de pulque, tortillas	Tallo (piña); flores y frutos (cápsulas frescas); escapo floral (quiote); hojas y cutícula de éstas; perianto de flores
Bebidas	Aguamiel, miel, atole de aguamiel, pulque, mezcal, tequila, sotol, bacanora, vinagre, jarabe	Tallo (piña)
Agrícola	Cerca viva, evitar erosión como formadora de suelo, abono orgánico (fertilizante)	Planta completa; composta de hojas
Forraje	De bovinos, caprinos, porcinos	Hojas; escapos florales; flores; bagazo
Construcción	Cercas vivas, casas (“jacales”), corrales, colectores de agua de lluvia, materiales compuestos: resinas termoplásticas + fibras	Escapo floral; hojas; residuos de fibra
Fibras	Cordelería, jarcería y textiles, cepillos para limpieza, estropajos	Fibras de hojas; raíces
Medicinal	Compresas calientes antiinflamatorias, prevención de escorbuto	Hojas
Ornamental	Jardinería, adornos navideños, arcos florales, joyería	Planta completa; fibras de las hojas; semillas y espina terminal de hojas
Doméstico	Jabón, zampo, macetas o recipientes, tapaderas de vasijas, palillos para la extracción de gusanos, aguja, hilo para coser	Hojas, tallos y raíces; espina terminal de hojas; fibras de las hojas
Otros usos	Industria química-farmacéutica (saponinas), producción de etanol, celulosa y glucósidos	Hojas (pulpa y residuos de desfibramiento, bagazo)

**Anexo 2. Formulación de los medios de cultivo MS y MS50% (macronutrientes, micronutrientes y sacarosa), Murashige y Skoog 1962.**

	MS sólido (gL <sup>-1</sup> )	MS líquido (gL <sup>-1</sup> )	MS50% sólido (gL <sup>-1</sup> )	MS50% líquido (gL <sup>-1</sup> )
<b>Macroelementos</b>				
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1.65	1.65	0.825	0.825
KNO <sub>3</sub>	1.9	1.9	0.95	0.95
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.37	0.37	0.185	0.185
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.17	0.17	0.085	0.085
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.44	0.44	0.22	0.22
<b>Microelementos</b>				
KI	0.00083	0.00083	0.000415	0.000415
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.0062	0.0062	0.0031	0.0031
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0.01689	0.01689	0.008445	0.008445
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.0086	0.0086	0.0043	0.0043
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.00025	0.00025	0.000125	0.000125
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.000025	0.000025	0.0000125	0.0000125
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.000025	0.000025	0.0000125	0.0000125
<b>Solución Hierro-EDTA</b>				
Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O	0.0373	0.0373	0.0373	0.0373
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.0278	0.0278	0.0278	0.0278
<b>Vitaminas</b>				
Ácido nicotínico (B3)	0.0005	0.0005	0.0005	0.0005
Piridoxina-HCl (B6)	0.0005	0.0005	0.0005	0.0005
Tiamina-HCl (B1)	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
myo-Inositol	0.1	0.1	0.1	0.1
<b>Aminoácidos</b>				
Glicina	0.002	0.002	0.002	0.002
<b>Sacarosa</b>				
	30	30	15	15
<b>Agar</b>				
	8	0	8	0
<b>pH</b>				
	5.7-5.8	5.7-5.8	5.7-5.8	5.7-5.8