



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Cultivo *in vitro* de *Agave potatorum*, especie amenazada  
endémica de México**

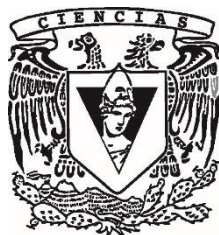
**T E S I S**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGA**

**P R E S E N T A:**

**ANA GABRIELA TÉLLEZ TORRES**



**DIRECTOR DE TESIS:**

**Dr. Víctor Manuel Chávez Ávila**

**2023**

**Ciudad Universitaria, CDMX**



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.

1. Datos del alumno  
Téllez  
Torres  
Ana Gabriela  
55 15 90 65 03  
Universidad Nacional Autónoma de  
México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
314299112

2. Datos del tutor  
Dr  
Víctor Manuel  
Chávez  
Ávila

4. Datos del sinodal 1  
Dra  
Helia Reyna  
Osuna  
Fernández

4. Datos del sinodal 2  
M en C

Octavio  
González Caballero

5. Datos del sinodal 3  
Dr  
Víctor Manuel  
Chávez  
Ávila

6. Datos del sinodal 4  
Dr  
Sol Cristians  
Niizawa

7. Datos del sinodal 5  
M en C  
Wendy Rocío  
Juárez  
Pérez

8. Datos del trabajo escrito  
Cultivo *in vitro* de *Agave potatorum*,  
especie amenazada endémica de México  
74 p  
2023

“Hay tanta humanidad en esta capacidad de amar los árboles, tanta nostalgia de nuestros embelesos primeros, tanta fuerza en este sentirse tan insignificante en el seno de la naturaleza... Sí, eso es: la evocación de los árboles, de su majestuosidad indiferente y del amor que por ellos sentimos nos enseña cuán irrisorios somos, viles parásitos que pululamos en la superficie de la tierra, y al mismo tiempo nos hace dignos de vivir pues somos capaces de reconocer una belleza que no nos debe nada”

Muriel Barbery



Karla

*Agave potatorum*

Esta investigación se llevóa cabo en Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Jardín Botánico del Instituto de Biología de la UNAM, bajo la dirección del Dr. Víctor Manuel Chávez Ávila.

Agradezco el apoyo otorgado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) DGAPA, UNAM por el financiamiento al proyecto PAPIIT IT201020 “Cultivo *in vitro* de agaves de interés comercial como alternativa para su conservación y aprovechamiento”. Con los recursos aportados fue posible adquirir diversos materiales, reactivos y servicios necesarios para el desarrollo de la presente investigación.

## Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por ser gratuita, por darme la oportunidad y el honor de formar parte de ella; gracias por acogerme en sus hermosas instalaciones por casi 10 años, por tantas oportunidades, por las experiencias, conocimiento y por formarme como científica y como persona.

A la Facultad de Ciencias por ser mi hogar, por alimentar mi curiosidad y amor hacia el estudio de la vida. Gracias por ser el lugar donde conocí a personas que marcaron mi alma y que me ayudaron a construir lo que soy.

Al Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Jardín Botánico, lugar que me dio la oportunidad de realizar esta investigación. Gracias por permitirme usar sus instalaciones, el equipo y material que requerí.

Al Dr. Víctor Chávez por darme la oportunidad de formar parte del laboratorio de CTV. Le agradezco todo lo aprendido, por su disposición a resolver dudas, por apoyarnos y motivarnos a hacer ciencia y conservación. Gracias por creer en mí, por ser tan comprensivo, por las oportunidades que me brindó, por su paciencia, amabilidad, interés y su tiempo.

A Octavio González, gracias por formar parte de mi primer acercamiento al CTV y por transmitir a tus alumnos tu pasión él. Gracias por tu paciencia, sinceridad y dedicación a la docencia y a la ciencia. Sin duda has sido de los mejores profesores que he tenido.

A Wendy Juárez, te agradezco por también despertar mi interés por el CTV. Gracias por compartir tus conocimientos conmigo y con tus alumnos, por tu amabilidad, tu interés y tu tiempo para orientarme y aconsejarme cuando tuve muchas dudas.

A Ángel Jiménez, gracias por tu orientación, por compartir tu enorme experiencia conmigo y con el resto del laboratorio. Te agradezco mucho por tu tiempo, por las oportunidades brindadas, la confianza y por enseñarnos a siempre cuestionarnos las cosas.

A Bárbara Estrada, por siempre estar atenta a los alumnos que visitamos el laboratorio, por brindarnos tu apoyo para realizar nuestros experimentos, por tu amabilidad y gentileza.

A mis sinodales (Dr. Chávez, la Dra. Helia Osuna, Octavio, Wendy y el Dr. Sol), gracias por tomarse el tiempo de revisar mi tesis, por sus valiosos comentarios y por aconsejarme para poder enriquecer esta investigación. De igual manera, muchas gracias por día a día trabajar para seguir construyendo conocimiento. Me siento muy honrada de que hayan aceptado formar parte de mi comité sinodal.

Gracias a todos mis compañeros del laboratorio de CTV, por su apoyo para realizar mi tesis, por darme consejos, por su interés, por creer en mí y por su amistad. Deseo que cumplan sus metas.

Y gracias también al *Agave potatorum*, qué honor poder haber realizado mi investigación con un ser tan hermoso e interesante. Sin duda eres *noble* y *admirable*.

## Dedicatoria

A mi papá y mi mamá, les agradezco profundamente por los esfuerzos y sacrificios que hicieron para que mi hermana y yo pudiéramos concluir nuestros estudios, gracias por su paciencia y por creer en mí. Les agradezco también por darme todo lo que he necesitado, porque han estado para mí, por respetar, aceptar y apoyar mis decisiones. Gracias porque su amor y cariño han hecho que sea la persona que soy.

Este trabajo va en especial para mi mamá. Gracias por madrugar cuando iba a la escuela temprano, por esperarme despierta cuando llegaba tarde de las clases, por decirme que descansara cuando me desvelaba, por cuidar de mí... en fin, gracias por hacer tanto por mí y por mi hermana. Gracias por ser tan fuerte.

A mi hermana, gracias por su valentía y esfuerzo al ser un sostén muy importante de mi familia. Por la paciencia, por tu cariño (aunque me lo muestres de formas raras jaja), por los detalles, por creer en mí. Mucho de esto se lo debo a tu apoyo.

A mi abuelita Lupita. Recuerdo con mucho cariño cuando me iba de práctica de campo y a escondidas me dabas un dinerito “para comprarme al menos un dulce”, o cuando me dabas la bendición cada que salía de casa. Gracias por ser una mujer tan fuerte y cariñosa. Todos en la familia te extrañamos y te recordamos con mucho amor.

A mi prima María. Eres de mis mayores ejemplos de determinación, valentía, fuerza y amor a la vida. Te extrañamos y te queremos, a la casa de le hace falta tu alegría, tu voz, tu risa y tu presencia.

A Dafne, gracias por tantas horas hablando, por ayudarme a pensar, a cuestionar el mundo y la vida misma. Gracias por siempre impulsarme a soñar y jamás dudar de que obtendré lo que deseo. Gracias por escuchar y apoyar mis ideas y sueños por más alocados que sean. Por ser mi compañera de aventuras, por ser tan soñadora y valiente, por confiar y cuidar de mí.

A todas las Montañeras, quienes me han enseñado a ver todo lo que soy capaz de hacer. Gracias por compartir sus historias con las demás, cada una de ellas me ha llenado de inspiración, valor y aprendizajes. Gracias por ayudarme a ser consciente de mi valentía y fuerza, por alimentar mi amor por la naturaleza, por hacerme sentir que formo parte de algo lleno de calidez, apoyo, solidaridad, amor y confianza, mucho de eso me ha sostenido. Gracias por todas las aventuras. Todas ustedes son mujeres inspiradoras, inteligentes, valientes e increíbles.

A Karla. Te agradezco por haber hecho el hermoso dibujo de *Agave potatorum* que ilustra el inicio de esta tesis. También me siento muy agradecida y honrada por la amistad tan bella y sincera que me has ofrecido desde hace ya varios años. Gracias por permitirme verte crecer y hacer cosas increíbles, eres una de las personas a las que más admiro. Gracias por abrirme tu corazón. Quiero verte cumplir tus sueños y poder vivir los míos contigo.

A Daniel, he vivido mucho de este proceso a tu lado. Gracias por emocionarte genuinamente de cada uno de mis logros, incluso de los más pequeños, mucho de ese entusiasmo me ayuda a recordar que lo que hago es importante. Gracias por escucharme, por tu interés, por ser mi compañero de aventuras y mi mejor amigo. Gracias por las enseñanzas, por ser un refugio, por tu amor y paciencia.

Gracias a los amigos que hice a lo largo de la carrera: Kevin, Gustavo, Chora, Wendy, Pedro, Bryan, Natalia, Vania, Mariana, Yessica, Gabriel, Uriel... no lo habría logrado sin su compañía y apoyo.

Y también me agradezco a mí misma, por confiar en mis capacidades, por siempre sacar fuerzas de donde menos me lo espero, por mi determinación, por no rendirme y por serme fiel a mí misma.

Gracias a la vida, que siempre me resultará ser lo más interesante, hermoso y mágico que puede existir.



## ÍNDICE

1	FIGURAS .....	III
2	TABLAS.....	IV
3	ABREVIATURAS .....	V
4	RESUMEN .....	1
5	INTRODUCCIÓN.....	2
6	ANTECEDENTES .....	3
6.1	Generalidades del género <i>Agave</i> .....	3
6.2	Importancia ambiental, económica y social del género <i>Agave</i> .....	6
6.3	Importancia económica y social del mezcal.....	9
6.4	<i>Agave potatorum</i> Zucc. ....	12
6.5	Amenazas del género <i>Agave</i> .....	13
6.6	Métodos convencionales de propagación del género <i>Agave</i> .....	15
6.7	Biotecnología como alternativa para la propagación del género <i>Agave</i> .....	16
6.8	Vías morfogénicas <i>in vitro</i> .....	17
6.8.1	Organogénesis.....	18
6.8.2	Embriogénesis somática.....	20
6.9	Explante y establecimiento aséptico del material vegetal.....	20
6.10	Medio de cultivo.....	21
6.11	Reguladores de crecimiento vegetal.....	22
6.11.1	Auxinas .....	22
6.11.2	Citocininas .....	23
6.12	Oxidación .....	23
6.13	Enraizamiento y aclimatización .....	24
6.14	Propagación <i>in vitro</i> de agaves.....	25
7	JUSTIFICACIÓN.....	28
8	OBJETIVOS.....	29
9	MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
9.1	Material vegetal.....	30
9.1.1	Caracterización de semillas.....	30
9.2	Establecimiento aséptico <i>in vitro</i> y germinación de semillas de <i>Agave potatorum</i> ..	30
9.2.1	Desinfección .....	30
9.2.2	Germinación <i>in vitro</i> .....	30

9.2.3	Germinación <i>ex vitro</i> .....	31
9.2.4	Inducción de morfogénesis en tallos, bases de hojas y de cotiledones de <i>Agave potatorum</i> .....	31
9.3	Aclimatización .....	32
9.4	Análisis estadístico .....	32
10	RESULTADOS.....	33
10.1	Desinfección de las semillas de <i>Agave potatorum</i> .....	33
10.2	Germinación de semillas de <i>Agave potatorum</i> .....	33
10.2.1	Germinación.....	33
10.2.2	<i>In vitro</i> .....	34
10.2.3	<i>Ex vitro</i> .....	36
10.3	Oxidación .....	36
10.4	Crecimiento de callo y organogénesis directa e indirecta .....	38
10.5	Aclimatización .....	44
11	DISCUSIÓN .....	45
11.1	Desinfección y germinación de las semillas .....	45
11.2	Oxidación .....	46
11.3	Inducción a la morfogénesis.....	48
11.4	Enraízamiento y aclimatización .....	51
12	CONCLUSIONES .....	54
13	PERSPECTIVAS.....	55
14	REFERENCIAS.....	56
15	ANEXOS .....	67

## 1 FIGURAS

Figura 1. Individuo del género <i>Agave</i> .....	4
Figura 2. Estructuras reproductoras del género <i>Agave</i> .....	5
Figura 3. <i>Agave potatorum</i> .....	13
Figura 4. Semillas de <i>Agave potatorum</i> .....	33
Figura 5. Número de semillas germinadas en condiciones <i>in vitro</i> y <i>ex vitro</i> . .....	34
Figura 6. Semillas en diferentes etapas de germinación <i>in vitro</i> y desarrollo de la plántula a los 27 días de la siembra .....	35
Figura 7. Planta cultivada <i>in vitro</i> a 12 meses de la germinación de semillas .....	35
Figura 8. Plántulas de <i>Agave potatorum</i> en condiciones <i>ex vitro</i> a 12 meses de la siembra.....	36
Figura 9. Número y tipo de explantes oxidados a los 6 meses después de la siembra.....	37
Figura 10. Número de explantes oxidados por tratamiento a 6 meses de la siembra.....	38
Figura 11. Respuestas organogénicas y crecimiento de callo a 30 días después del periodo de inducción.....	39
Figura 12. Organogénesis en explantes de <i>Agave potatorum</i> a 10 meses después del periodo de inducción.....	41
Figura 13. Formación de brotes por explante y tratamiento. ....	43
Figura 14. Plantas de <i>A. potatorum</i> propagadas <i>in vitro</i> a 2 meses de ser plantadas en suelo.....	44

## 2 TABLAS

Tabla 1. Principales servicios ambientales brindados por los agaves. ....	7
Tabla 2. Principales usos atribuidos a las diferentes partes de las plantas de agave.....	8
Tabla 3. Rendimiento de producción de mezcal respecto al nivel tecnológico de producción.....	10
Tabla 4. Producción de mezcal por especie de agave en el 2019 a nivel nacional. ....	11
Tabla 5. Especies de agave cultivadas por medio de organogénesis. ....	26
Tabla 6. Tratamientos con reguladores de crecimiento vegetal para el cultivo <i>in vitro</i> de tallos, bases de hojas y de cotiledones de <i>Agave potatorum</i> . ....	31
Tabla 7. Número de brotes por tratamiento. ....	40
Tabla 8. Número de brotes obtenidos por el tipo de explante.....	40
Tabla 9. Brotes por explante y tratamiento .....	42
Anexo 1. Componentes del medio de cultivo Murashige & Skoog .....	67

### 3 ABREVIATURAS

ABA	Ácido abscísico	m	Metros
ADP	Adenosín difosfato	mg/L	Miligramos por litro
AIA	Ácido indol-3-acético	mm	Milímetros
AIB	Ácido indol 3 butírico	msnm	Metros sobre el nivel del mar
ANA	Ácido 1-naftalenacético	MS	Murashige & Skoog
ATP	Adenosín trifosfato	MS50	Murashige & Skoog a la mitad de su concentración de componentes inorgánicos
BAP	6-Bencilaminopurina		
CAM	Metabolismo ácido de las crasuláceas	NOM	Norma Oficial Mexicana
		PVP	Polivinilpirrolidona
cm	Centímetros	RCV	Reguladores de crecimiento vegetal
CONABIO	Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad	RNA	Ácido ribonucleico
CTV	Cultivo de tejidos vegetales	SADER	Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural
DIC	Dicamba	SLA	San Luis Atolotitlán
DNA	Ácido desoxirribonucleico	SEMARNAT	Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales
g	Gramos	TDZ	Tidiazurón
GA <sub>3</sub>	Ácido giberélico	UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México
KIN	Kinetina o 6 furfurilaminopurina		
LS	Linsmaier & Skoog		

Z Zeatina

2,4-D Ácido 2,4-diclorofenoxiacético

2iP 2-isopenteniladenina

% v/v Porcentaje volumen a volumen

$\mu\text{M}$  Micromol

#### 4 RESUMEN

*Agave potatorum* Zucc. es una especie endémica de los estados de Puebla y Oaxaca que cumple con un importante papel ecológico y cultural. Sin embargo, su uso principal es para la elaboración de mezcal, actividad que genera importantes ingresos al país, lo que la hace una especie de gran interés. La situación de la especie resulta ser preocupante ya que es sobreexplotada, aunado a que para la elaboración de mezcal se interrumpe su ciclo de vida puesto que se corta el pedúnculo floral inmaduro, impidiendo el desarrollo de semillas, de las cuales *A. potatorum* depende para sobrevivir ya que se considera que no se propaga vegetativamente. Gracias a estudios previos se ha observado que el cultivo de tejidos vegetales resulta ser una alternativa viable para la propagación masiva de individuos del género *Agave*. El objetivo de la presente investigación fue inducir la regeneración de brotes de *A. potatorum* a través de secciones obtenidas de plántulas germinadas *in vitro*. Para ello se sembraron 91 semillas previamente desinfectadas en medio de cultivo MS con 50% de la concentración de sus componentes inorgánicos y 30 g/L de sacarosa (MS50). A su vez se sembraron 91 semillas en un sustrato de tepojal, tierra negra y lombricomposta. Las plántulas se disectaron en tres tipos de explantes: tallo, base del cotiledón y base de las hojas, que fueron sembrados en MS50, adicionado de 100 mg/L de ácido cítrico, 100 mg/L de ácido ascórbico y suplementado con los reguladores de crecimiento vegetal (RCV): BAP 0, 1, 1.5 y 2 mg/L con 2,4-D 0 y 0.5 mg/L. El tiempo de inducción fue de 30 días, posteriormente los cultivos fueron transferidos a medio MS50 sin RCV, a ca. 2 meses de iniciados los cultivos se obtuvo la germinación *in vitro* (56.04%) y *ex vitro* (31.87%). A 10 meses después del período de inducción, la suma de brotes y plántulas de todos los tratamientos fue de 228, la mayor cantidad de brotes y plántulas (206) fue con BAP 1.5-2 mg/L con 2,4-D 0.5 mg/L en donde se regeneraron 8.1-12.5 brotes por explante a partir de tejido de tallo y de hoja. En todos los tratamientos y tipos de explante se observó algún grado de oxidación, sin embargo, ésta se registró mayormente en los explantes de cotiledón. Se obtuvo un porcentaje de aclimatización mayor al 70%. Esta investigación puede permitir la conservación, mantener los servicios ecosistémicos y potenciar la economía a través de un aprovechamiento sustentable de ésta y otras especies de agave amenazadas.

## 5 INTRODUCCIÓN

El género *Agave* L. pertenece a la familia Asparagaceae y es endémico del continente americano. Su distribución abarca desde el sur de Estados Unidos hasta Colombia y Venezuela (García, 2002; 2007). Está conformado por aproximadamente 210 especies, de las cuales 75% se distribuyen en México y un 61% son endémicas del país (García *et al.*, 2004; García *et al.*, 2019).

Los miembros de este género brindan múltiples servicios ambientales puesto que diversos animales se alimentan de diferentes partes de la planta; sus raíces impiden la erosión del suelo y la pérdida de nutrientes además de que favorecen la filtración del agua; atrapan carbono, entre otros servicios (García *et al.*, 2010; García *et al.*, 2011; Leirana *et al.*, 2018; Medina-van Berkum *et al.*, 2016; Rocha *et al.*, 2006; Romero *et al.*, 2007).

Al mismo tiempo representan un recurso natural fundamental para la población del país puesto que los agaves se emplean para la elaboración de diferentes productos como papel y fibras, son fuente de alimento y además diferentes partes de la planta se utilizan como material de construcción. Sin embargo, es la producción de tequila, pulque y mezcal la actividad que aporta un ingreso relevante a la economía de diferentes comunidades. El mezcal en el año 2019 fue exportado a 68 países y en el 2016 los productores de esta bebida comercializaron 2 713 000 litros en los diferentes mercados internacionales (Consejo Regulador de Mezcal, 2020; García *et al.*, 2010; De Vega, 2019; Negrete, 2010; SADER, 2017; Suárez *et al.*, 2016; Valenzuela, 2006).

No obstante, la gran demanda de mezcal ha ocasionado una sobreexplotación e interrupción del ciclo de vida de las especies de maguey mezcalero, siendo *A. potatorum* Zucc. de las mayormente empleadas en la elaboración de dicha bebida. Aunado a esta problemática, se ha documentado que en la naturaleza no presenta reproducción asexual, por lo que depende de la generación de semillas para subsistir (Delgado *et al.*, 2014; Velasco *et al.*, 2009).

Es por ello que la finalidad de esta investigación es emplear el cultivo de tejidos vegetales para llevar a cabo la propagación de la especie *A. potatorum*, ya que de esta forma se podría tener una fuente de individuos en caso de que las poblaciones silvestres disminuyan y además, para hacer un uso comercial de las mismas.



### **6.1 Generalidades del género *Agave***

*Agave* L. (Asparagaceae) es un género de plantas monocotiledóneas, endémico del continente americano que se distribuye desde el sur de Estados Unidos hasta Colombia y Venezuela (incluyendo a las islas del Caribe). México, Estados Unidos, Cuba y Guatemala poseen el mayor número de especies de dicho continente (García, 2002, 2007).

El género comprende aproximadamente 210 especies, 159 están presentes en México (75% del total) y 129 son endémicas del territorio mexicano, cifra que representa el 61% (79 especies) de las especies de agavaceas del mundo y 81% (104 especies) de las que se distribuyen en México. Oaxaca es el estado con más diversidad de agaváceas de México, cuenta con 58 especies, 13 de las cuales son endémicas (García *et al.*, 2004; García *et al.*, 2019).

En México, las poblaciones de agaves habitan prácticamente en todo el territorio nacional, son más frecuentes en zonas áridas y semiáridas con características de escasa precipitación, suelos pedregosos y terrenos abiertos, siendo algunos de estos ambientes los matorrales xerófilos. Sin embargo, también pueden encontrarse en bosque templado de montañas y ambientes tropicales costeros, en altitudes que van desde el nivel del mar hasta por encima de los 3400 metros (Scheinvar, 2008).

Estas poblaciones son numerosas en las provincias florísticas de las serranías meridionales del centro de México, Sierra Madre Occidental, Altiplano mexicano, península de Baja California y Sierra Madre Oriental (García, 2007).

Los agaves presentan diferentes rasgos relacionados con su adaptación a ambientes áridos, siendo algunos la presencia de raíces superficiales, fotosíntesis tipo CAM (llevan a cabo la apertura de los estomas en la noche y acumulación de ácidos orgánicos en forma de ácido málico), la forma alargada de las hojas disminuye el área expuesta a la radiación y además su disposición en roseta hace que el agua se dirija hacia la zona radical de la planta (García, 2007; Geydan & Melgarejo, 2005).

Asimismo, las hojas terminan en una espina y sus márgenes presentan pequeñas espinas en forma recta o de gancho; son gruesas y suculentas dispuestas en espiral sobre un tallo corto (solo en unas pocas especies los troncos son de tamaño significativo) (Ayala, 2012;

Giraldo, 2017). Es importante señalar que la mayoría de las especies presentan una cutícula dura que evita la pérdida de agua y cuyo grosor puede modificar el color de las hojas, el cual varía de verde brillante a gris-azulado intenso. Las raíces suelen ser duras y fibrosas (Guillot *et al.*, 2008; Vázquez, 2015)

De igual modo, las distintas especies del género presentan una inflorescencia (comúnmente llamado quiote), que puede medir de 1.8 m a más de 12 m de longitud. Ocasionalmente las inflorescencias presentan bulbillos, que son hijuelos pequeños que emergen junto a las flores no fecundadas que caen posteriormente sin formar frutos. Los hijuelos también pueden formarse a partir del tallo o las raíces (Figura 1) (Valenzuela, 2006; Vázquez, 2015).

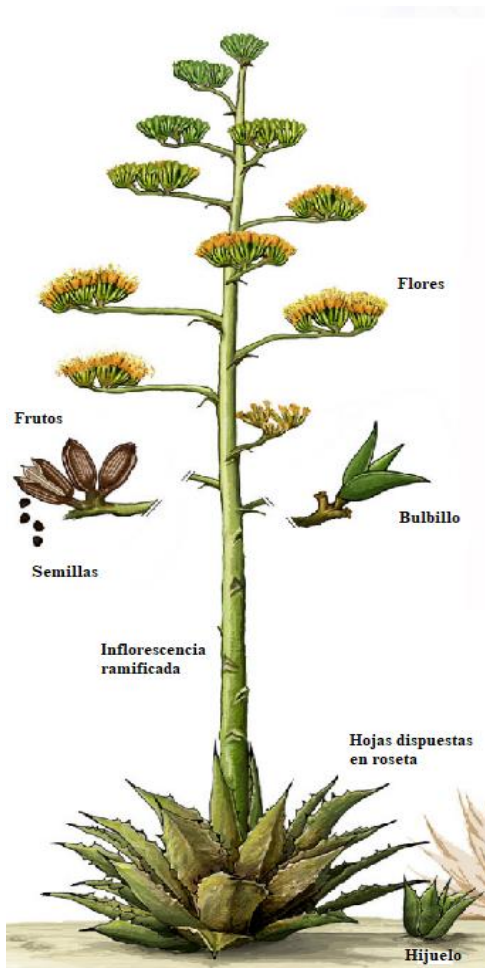


Figura 1. Individuo del género *Agave* con inflorescencia ramificada, flores, bulbillito, hijuelo, fruto y semillas. Modificado de CONABIO (2006).

Las flores son bisexuales de color verdoso, amarillento o purpúreo con perigonio tubular con seis estambres exertos tipo filiforme y estigma trilobado. Los frutos son cápsulas leñosas y las semillas son negras y aplanadas (Figura 2) (Vázquez, 2015).

La edad de estos individuos puede variar: algunas especies alcanzan su madurez entre los 15 y 25 años, mientras que las especies pequeñas lo hacen entre los cuatro y cinco años (García, 2007).

La mayoría de las especies del género *Agave* se caracterizan por ser monocárpicas (también denominadas semélparas), es decir, tienen un solo evento reproductivo y posteriormente mueren, esto debido al cambio en la asignación de recursos del crecimiento vegetativo continuo al crecimiento reproductivo, combinado con una extracción de nutrientes de las hojas y la transferencia de estos nutrientes a las semillas en desarrollo (Davies & Gan, 2012; Good *et al.*, 2006).

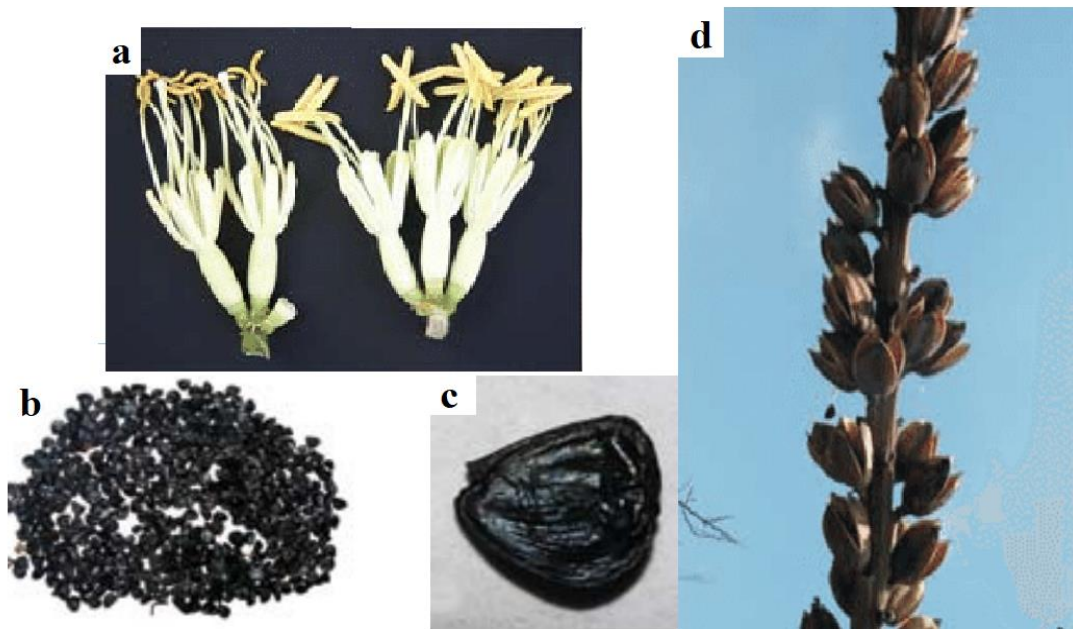


Figura 2. Estructuras reproductoras del género *Agave*. **a)** Flores de *A. victoriae-reginae* T. Moore; **b)** Semillas de *A. celsii* Hook; **c)** Semilla de *Agave* sp; **d)** Frutos de *A. victoriae-reginae*. (a y d: modificado de González *et al.*, 2011; b y c: modificado de Reyes (2009).

Los magueyes son polinizados principalmente durante la noche por murciélagos nectarívoros, siendo en México las especies *Leptonycteris yerbabuena*, *L. nivalis* y *Choeronycteris mexicana* las más importantes. Algunos otros de sus visitantes nocturnos son palomillas, ratones de campo, cacomixtles, tlacuaches y otros pequeños animales que trepan por la inflorescencia para alcanzar las flores. Sin embargo, éstas también son visitadas durante el día por una gran variedad de animales como abejorros, abejas y varias especies de aves como colibríes y calandrias (Illsley, 2004; Trejo, 2016).

## **6.2 Importancia ambiental, económica y social del género *Agave***

Se sabe que los magueyes proporcionan valiosos servicios ambientales (Tabla 1): diversos animales se alimentan del néctar, polen y de las flores, además de que la planta representa el hogar de algunos de ellos, los cuales forman parte importante de la cadena trófica. Los agaves también son plantas nodrizas para otros agaves y plantas suculentas lo cual es crucial para la recuperación de toda la comunidad biótica; constituyen una cerca viva que protege del viento a los cultivos; sus raíces impiden la erosión del suelo y la pérdida de nutrientes al retener la materia orgánica, además de que estas estructuras favorecen la filtración del agua; los cultivos de maguey son usados para desviar el agua de lluvia hacia las regiones con menos humedad; sus individuos captan carbono en ambientes áridos con suelos pobres y además pueden eliminar metales pesados de soluciones acuosas, como puede ocurrir alrededor de minas (García *et al.*, 2010; García *et al.*, 2011; Delgado *et al.*, 2014; Leirana *et al.*, 2018; Medina-van Berkum *et al.*, 2016; Rocha *et al.*, 2006; Romero *et al.*, 2007).

Tabla 1. Principales servicios ambientales brindados por los agaves.

<p><b>Conservación de la biodiversidad.</b></p>	<p>Murciélagos, polillas, colibríes, abejas y mariposas se alimentan del néctar y polen.</p> <p>Las flores son ingeridas por cenizotes, matracas y otras aves.</p> <p>Las semillas son consumidas por hormigas y aves.</p> <p>Actúan como plantas nodrizas.</p> <p>La planta es huésped de animales.</p> <p>En el suelo adyacente a los magueyes pueden encontrarse ratoncitos, cacomixtles, liebres, armadillos, tejones, tuzas, víboras, lagartijas y hormigas.</p>
<p><b>Retención y control del agua.</b></p>	<p>Los cultivos generan un microclima que favorece la retención de humedad.</p> <p>Las raíces ayudan a la filtración de agua a los mantos acuíferos.</p> <p>Las hileras de maguey ayudan a desviar el agua de lluvia hacia aquellas partes que retienen menos humedad.</p>
<p><b>Retención y formación de suelo.</b></p>	<p>Los cultivos generan un microclima que favorece la retención de suelo.</p> <p>Las raíces impiden la erosión de los suelos aún en condiciones de pendiente o terrenos pedregosos.</p> <p>Las raíces evitan que se pierdan importantes nutrientes de las zonas áridas y retienen la materia orgánica.</p>
<p><b>Cercas vivas.</b></p>	<p>Constituyen por sí mismos una cerca viva que protege del viento a los cultivos que se siembran entre las hileras de maguey.</p>

En México, se les ha atribuido múltiples usos a los agaves (Tabla 2) encontrándose entre los más comunes la producción de papel, el uso de las hojas como tejas, los tallos de las inflorescencias como vigas, obtención de fibras para tejidos, espigas como clavos y agujas. También se emplean comúnmente para la construcción de barreras vivas y además se le atribuye la elaboración de mezcal, tequila y pulque, aunque también se pueden obtener concentrados de aguamiel, mieles, jarabe, vinagre, jabones, shampoos, inulinas, etc. Es de resaltar que a algunas de estas bebidas y concentrados se les atribuyen propiedades

medicinales, además de que fueron usadas en rituales y sacrificios como fermentos bebidos sólo por una élite de sacerdotes y nobles (García *et al.*, 2010; De Vega, 2019; Negrete, 2010; Suárez *et al.*, 2016; Valenzuela, 2006).

Tabla 2. Principales usos atribuidos a las diferentes partes de las plantas de agave.

<b>Tipo de uso.</b>	<b>Usos.</b>	<b>Parte empleada de la planta.</b>
Doméstico.	Jabón o detergente para trastes y ropa. Shampoos.	Hojas, tallos y raíces.
	Macetas o recipientes para agua.	Hojas y tallos.
	Palillos para la extracción de gusanos comestibles. Aguja para coser ropa. Clavos.	Espina terminal.
	Tapas para cazuelas, ollas y barriles. Platos. Para la preparación de barbacoa. Forraje. Para la elaboración de mixiotes.	Hojas.
	Combustible para calentar comida.	Hojas secas.
Medicinal.	Para la curación de golpes. Prevención de escorbuto. Antiinflamatorio.	Hojas.
Alimentos.	Obtención de aguamiel y fructosa. Elaboración de pulque, con el cual se elaboran diferentes alimentos (tamales, atole, pan, dulces). Mezcal. Tequila. Sotol. Jarabe que se utiliza para la elaboración de dulces y postres.	Tallo.
	Gusano rojo ( <i>Chinicuil</i> ).	Se extraen de la raíz.
	Elaboración de diversos platillos.	Escapo floral, flores y frutos.

Ornamental.	Adornos corporales (aretes, collares).	Semillas.
	Arcos.	Fibras de las hojas
	En jardines y camellones.	Planta completa.
Industrial.	Industria química y farmacéutica para la producción de medicamentos y productos esteroides (saponinas).	Hojas, raíces y tallos.
	Productos de celulosa para papel, ropa Producción de etanol y glucósidos.	Hojas.
	Jarabe utilizado en la industria cosmética.	Tallo.
Fibras.	Canastos. Lazos. Estropajos. Hilo para coser. Tejidos y vestuarios.	Fibras de hojas.
	Escobetillas, escobas, cepillos para limpieza.	Fibras de raíces.
Construcción.	Cercas, casas ( <i>jacales</i> ), corrales.	Escapo floral.
	Tejas para cubrir techos de casas. Canales para colectar agua de lluvia.	Hojas.

Actualmente muchos de los usos ya mencionados siguen vigentes en numerosas comunidades rurales de nuestro país; sin embargo, es la elaboración de mezcal la actividad que aporta un ingreso relevante a la economía de estas sociedades, y es también la que causa la disminución de las poblaciones silvestres de agave (Illsle *et al.*, 2004).

### 6.3 Importancia económica y social del mezcal

El origen de esta bebida data del México prehispánico cuando los antiguos zapotecas extraían un aguamiel del agave para ser utilizado en ceremonias religiosas. Después de la llegada de los españoles en el siglo XVI, el proceso de obtención fue modificado por los conquistadores, iniciándose así la producción de mezcal. Hoy en día, en Oaxaca el mezcal tiene una marcada connotación mágica-religiosa y se ha ubicado entre las mejores bebidas del mundo (Morales, 2008).

Palma y colaboradores (2016) reportaron que, en Oaxaca, para obtener un aproximado de 15 398 900 litros de mezcal, fueron procesadas 153 989 toneladas de piñas (tallos de agave) que representan un total de 3 849 725 agaves, sin embargo, esto depende del equipo de destilación utilizado (Tabla 3) y la especie de agave empleada.

Al mismo tiempo Delgado *et al.*, 2014 refieren que para producir un litro de mezcal se necesitan en promedio dos individuos adultos de *A. potatorum* dependiendo del tamaño de las plantas y las condiciones en las que creció el agave (clima, suelo, orientación de exposición de la pendiente, etc.). Por ejemplo, 200 agaves pueden producir de 60 a 180 litros de mezcal.

Tabla 3. Rendimiento de producción de mezcal respecto al nivel tecnológico de producción

<b>Método de producción.</b>	<b>Kilogramos de piñas procesadas por litro de mezcal.</b>
Artesanal con actividades manuales.	Desde 11 hasta 35.
Artesanal con sistema tradicional.	De 6 hasta mayores de 20.
Artesanal con innovaciones tecnológicas	Desde 6 a 20.

Por otro lado, la Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (2017) reportó que en el 2016 el principal país al que se exportó mezcal fue Estados Unidos, con un valor de 17.2 millones de dólares americanos; seguido de Francia (757 mil dólares), Reino Unido (619 mil dólares) y España (614 mil dólares). Además, durante el mismo año los productores de mezcal comercializaron dos millones 713 mil litros en los diferentes mercados internacionales.

Asimismo, el Consejo Regulador del Mezcal (2020) reportó en su Informe Estadístico que el mezcal fue exportado a 68 países en el 2019.

Oaxaca, por sus características agroclimáticas, favorece la producción de agave y mezcal (Bautista & Mascha, 2012), lo que lo ha posicionado a nivel nacional como el estado con mayor producción de litros representando en el 2021 el 90.1% de la producción del país. (Consejo Regulador del Mezcal, 2020).



En el citado informe se destaca como valores sociales y culturales relacionados con la producción de mezcal la generación de 23 000 empleos directos y más de 105 000 empleos indirectos, representando una fuente de empleo para hombres y mujeres en donde se carece de fuentes de empleo temporales y permanentes; ha permitido que migrantes regresen a sus comunidades de origen; crea oportunidades de desarrollo, innovación e investigación; evita que poblaciones susceptibles se empleen en actividades ilícitas y promueve el sentido de identidad cultural y orgullo nacional.

Según Colunga *et al.*, 2007 las especies que comúnmente se emplean en la producción de mezcal son *A. tequilana* Weber, *A. angustifolia* Haw., *A. marmorata* Roetzl, *A. americana* L. var. *oaxacensis* Gentry, *A. cupreata* Trel. & Berger, *A. rhodacantha* Trel., *A. salmiana* Otto ssp. *crassispina* (Trel.) Gentry, *A. wocomahi* Gentry, *A. durangensis* Gentry y *A. maximiliana* Baker.

Por otra parte, el Consejo Regulador del Mezcal (2020) reportó que en el año 2019 la especie que más se empleó para la producción de mezcal en el país fue *Agave angustifolia* (85%), seguida de *A. potatorum* Zucc. (2.3%) y *A. durangensis* (2.1%) (Tabla 4).

Tabla 4. Producción de mezcal por especie de agave en el 2019 a nivel nacional.  
Modificado de: Consejo Regulador del Mezcal, 2020.

<b>Nombre común.</b>	<b>Nombre científico.</b>	<b>Producción en 2019.</b>
Maguey espadín.	<i>A. angustifolia.</i>	85.8%
Maguey tobalá,	<i>A. potatorum.</i>	2.3%
Maguey cenizo.	<i>A. durangensis.</i>	2.1%
Maguey verde.	<i>A. cupreata.</i>	2.7%
Maguey tepeztate.	<i>A. marmorata</i>	1.0%
Maguey cuishe.	<i>A. karwinskii</i> Zucc.	1.8%

Magüey azul.	<i>A. tequilana</i> .	0.9%
Otros (54 magüeyes distintos).	--	3.3%

A pesar de lo anterior mencionado, en el estado de Oaxaca uno de los agaves silvestres mayormente empleados en la elaboración de mezcal corresponde a la especie *Agave potatorum* Zucc. (Velasco *et al.*, 2009).

#### 6.4 *Agave potatorum* Zucc.

También es conocido como arroqueño, magüey de cochi, magüey papalome, magüey tobalá, papalome o papalometl (Figura 3) (Colunga, 2006).

García & Franco (2018) señalan que las rosetas pueden presentar de 30-60 hojas, de 15.0-35.0 cm de largo y 8.0-10.0 cm de ancho, son ovadas, oblongas o lanceoladas, glaucas a verde-glaucas, margen con mamilas de 0.4-0.7 cm de alto. Las hojas además presentan una espina terminal.

Su inflorescencia es de tipo panícula, midiendo 3.0-5.0 m de alto. Las flores miden 5.5-7.0 cm de largo, son campanuladas a ligeramente urceoladas, de coloración verde-amarillentas. Los estambres con filamentos 3.0-4.0 cm de largo, el ovario es de 2.5-3.0 cm de largo y de 4.0-6.0 mm de diámetro.

Los frutos son cápsulas que miden 4.0-6.0 cm de largo y 1.5-2.0 cm de diámetro, son oblongos. Las semillas son negras y aplanadas, miden 5.0-6.0 mm de largo y 4.0-5.0 mm de ancho, presentan un ala inconspicua.

Tarda de 8 a 12 años en florecer y lo hace de finales de agosto a noviembre, fructificando de noviembre a marzo.

*A. potatorum* es una especie endémica de México, que se distribuye en los estados de Oaxaca y Puebla en ambientes de bosque tropical caducifolio, matorral xerófilo y en la transición de los mismos. Habita en suelos sobre roca caliza en altitudes de 1300-2400 metros. Este agave se desarrolla en suelos áridos y semiáridos poco fértiles. En el 2011 se estimó que habían 42 ha de dicha especie en las regiones de Valles Centrales y Sierra Sur de Oaxaca, lo

cual representó 0.45% del total de plantas del género *Agave* existentes en el estado (Bautista & Martínez, 2020; García & Franco, 2018).

Además de la elaboración de mezcal, esta especie se emplea de diversas formas, como por ejemplo, sus flores se utilizan en la alimentación al igual que el pedúnculo floral cuando ha comenzado su desarrollo, las hojas se usan para disminuir hinchazones y para el tratamiento de lesiones internas tanto de seres humanos como de animales domésticos (García & Franco, 2018).

Es importante resaltar que, a diferencia de la mayoría de los agaves, su propagación asexual no ha sido reportada y depende de las semillas para sobrevivir (Delgado *et al.*, 2014).

La NOM-059-SEMARNAT-2010 no aplica para esta especie (Diario Oficial de la Federación, 2010).



Figura 3. *Agave potatorum* (Izquierda); Estructuras reproductivas. Inflorescencia (Centro); Flores (Derecha). Modificado de: García/CONABIO

### 6.5 Amenazas del género *Agave*

La alta demanda de mezcal y las grandes cantidades de ejemplares de agaves requeridas para su elaboración (Tabla 3) ha ocasionado una sobreexplotación de las especies nativas del maguey mezcalero y ha conducido a la depredación y peligro de extinción de las especies endémicas. Ejemplo de ellas son *Agave angustifolia*, *A. palmeri* Engelm. y *A. shrevei* Gentry,

de las cuales se tiene documentado que debido a su sobreexplotación se han agotado las poblaciones silvestres ubicadas en Sonora (Burwell, 1995).

Aguirre & Eguiarte (2013) reportaron que la extracción de *Agave cupreata* y *A. potatorum* para la producción de bebidas ha provocado una disminución de las poblaciones silvestres, por lo que dichos autores han expresado preocupación por la conservación de estas especies.

De forma paralela, un estudio llevado a cabo en la comunidad San Luis Atolotitlán (SLA) ubicada en el Valle de Tehuacán-Cuicatlán, resalta que a pesar de que los productores de mezcal reconocen la escasez de *A. potatorum* que enfrenta SLA, éstos no pueden dejar de producir mezcal, razón principal por la que en la última década comenzaron a mezclar tallos de la especie en cuestión con los de otras especies de agave, como *Agave marmorata* para llenar el horno. Incluso recientemente han comenzado a comprar *Agave angustifolia* y *A. tequilana* en plantaciones cercanas, lo que puede afectar a las poblaciones de agave de otras regiones. Los pobladores de SLA mencionan que hoy en día se requiere ir cada vez más lejos para extraer agave mezcalero. Los campesinos afirman que hace 30 o 40 años, en diversos parajes cercanos al pueblo existía una gran abundancia de esta especie y que ahora han desaparecido debido a la actividad mezcalera, es decir se documentaron casos de extinción de poblaciones locales. Cabe mencionar que la producción anual de mezcal en SLA requiere de casi 11,975 plantas de agave (Delgado *et al.*, 2014; Torres *et al.*, 2016).

A su vez, el director de la Reserva de la Biósfera Tehuacán-Cuicatlán, Fernando Reyes Flores, señaló que el saqueo de agaves ha aumentado hasta 300% en la zona y que esto puede estar asociado a la producción de mezcal. Entre las especies más afectadas se encuentran *Agave marmorata*, *Agave potatorum* y *Agave karwinskii* (Hernández, 2021).

Es importante resaltar que, para hacer el mezcal, cuando un maguey ha iniciado el desarrollo de su inflorescencia, esta estructura se corta y la planta se deja así durante varios meses, acumulando azúcares que posteriormente serán utilizados para la elaboración de alguna bebida. Esto representa uno de los mayores problemas para la conservación de los agaves mezcaleros ya que a causa de esta actividad no se desarrollan flores que posteriormente podrían ser polinizadas para dar lugar a la formación de frutos con semillas (Illsley *et al.*, 2004; Michel, 2010) y con ello se cancela la posibilidad de dejar descendencia, siendo éste un factor adicional que puede orillar a las especies a estar en peligro de extinción.

La extracción de agaves puede afectar no solo la capacidad de recuperación de las poblaciones, sino también las interacciones ecológicas con otros organismos en las comunidades vegetales.

## **6.6 Métodos convencionales de propagación del género *Agave***

La propagación de los individuos de este género se puede llevar a cabo mediante dos formas: propagación vía sexual, utilizando las semillas y vía asexual a través de tejido somático. Respecto a la vía sexual a través de la propagación por semillas se obtienen nuevas plantas individuales con las características que presentan los genes propios de los gametos masculinos y femeninos. En la reproducción por semillas puede esperarse que se presente variación genética o segregación entre las plantas hijas (Oronoz *et al.*, 1983).

A pesar de lo antes mencionado, en el género *Agave* esta vía puede presentar problemas, principalmente la falta de disponibilidad de semillas, ya que en el ciclo de vida del género es necesario que transcurran varios años (incluso décadas) para que la planta sea lo suficientemente madura para florecer y producir semillas (Das, 1992).

Es de destacar que a pesar de que cada fruto aloja entre 300 y 2 000 semillas, son muy pocas las que llegan a germinar debido a diferentes factores: algunas no son viables, otras son comidas por diversos animales o bien, por su ligereza son dispersadas por el viento y muchas caen en rocas y otros sitios desfavorables. E incluso una vez que las semillas logran germinar, muchas plántulas mueren por la falta de agua y otras son pisadas o comidas por el ganado (Illsley *et al.*, 2004).

Adicionalmente, no todas las inflorescencias logran formar semillas debido a que muchas se caen con el viento incluso antes de florecer, o bien, hay personas y animales del campo que cortan las flores para comérselas. Otras causas de esta problemática son la falta de polinizadores y los incendios (Illsley *et al.*, 2004).

Como se mencionó anteriormente, para la elaboración de mezcal, es necesario “castrar” a la planta, es decir, se corta la inflorescencia una vez que ésta empieza a crecer. Esto impide el desarrollo y polinización de flores, lo que a su vez imposibilita la formación de semillas (Godínez *et al.*, 2016; Illsley *et al.*, 2004; Michel, 2010).

En contraste, la reproducción asexual o vegetativa es aquella que no implica el proceso sexual. Los individuos obtenidos por este tipo de reproducción constituyen un clon (Oronoz *et al.*, 1983).

Según Vicente & Del Real (2007) los principales procesos de reproducción asexual en agaves son los siguientes:

- Reproducción por bulbillos:

Este proceso se presenta en algunos agaves que desarrollan bulbillos a partir de los meristemas axilares de la inflorescencia en la base de las flores, y que al completar su desarrollo caen al suelo, donde desarrollan raíces y crecen como plantas independientes. Algunas de las desventajas de este método es que los bulbillos se desarrollan después de la floración, es decir, tras la maduración de la planta de maguey, evento que puede tomar varios años. También puede ocurrir que a través de los bulbillos se propaguen enfermedades que pudiera presentar la planta madre. Es debido a lo anterior que este método no es muy común para la propagación de magueyes.

- Rizomas:

Los rizomas son tallos subterráneos que crecen generalmente en un plano horizontal, paralelo a la superficie del suelo. Cada año los rizomas emiten yemas que originan nuevos órganos aéreos. La propagación por rizomas (o hijuelos) es la más utilizada en agaves, no sólo porque conserva las características genéticas de la planta madre, sino porque el desarrollo de las plantas es más rápido y vigoroso que por bulbillos. Mediante este tipo de propagación usualmente se obtienen de 4 a 6 hijuelos por agave (Comunicación Personal, Sres. Del Razo, Tlaxcala). Uno de los inconvenientes de las plantas obtenidas por medio de esta vía es su lento crecimiento, teniendo que esperar varios años para que un hijuelo alcance tallas comercialmente adecuadas (Malda & Ruiz, 2004).

### **6.7 Biotecnología como alternativa para la propagación del género *Agave***

Una alternativa prometedora a los métodos de propagación convencionales ya mencionados es la aplicación de herramientas biotecnológicas como la micropropagación o propagación por cultivo de tejidos vegetales (CTV).

El CTV es una rama de la biotecnología que se refiere al conjunto de técnicas usadas para cultivar células, tejidos u órganos vegetales *in vitro* en un medio artificial, bajo condiciones asépticas, controladas y libres de microorganismos (Calva & Ríos, 1999). Se basa en el principio de totipotencia, es decir, la capacidad que poseen las células para permitir el desarrollo de un nuevo individuo completo, sin que medie ningún tipo de fusión de células sexuales. A través de las técnicas que ofrece, se pueden propagar *in vitro* varios miles de plantas clonales en pocos meses a partir de una sola planta madre una vez superados su establecimiento aséptico *in vitro* y el proceso experimental de multiplicación (Robert *et al.*, 2006).

El cultivo de tejidos vegetales permite la propagación de cualquier especie, siendo algunos ejemplos de plantas de importancia como lo son *Vanilla planifolia* (Lozano *et al.*, 2015), *Carica papaya* (Solis *et al.*, 2011), *Saccharum officinarum* (Rangel *et al.*, 2016), *Rosa hybrida* (Carelli & Echeverrigara, 2002), *Cucurbita pepo* (Sánchez *et al.*, 2009), entre otras especies.

El cultivo *in vitro* de plantas posee grandes ventajas, entre las cuales se encuentran: la conservación e intercambio de germoplasma, la propagación masiva de plantas en un tiempo y espacio reducidos, la generación de plantas libres de patógenos y transformadas genéticamente, la obtención de compuestos útiles y de interés (metabolitos secundarios), puede aplicarse en genotipos en donde la propagación vegetativa es difícil, se requieren únicamente de pequeños fragmentos de tejido para iniciar el cultivo, la multiplicación puede desarrollarse en cualquier época del año y el desarrollo de estudios básicos de fisiología, genética y ciencias afines. Los procesos llevados a cabo pueden ser automatizados, la producción de plantas es de calidad uniforme y a escala comercial, hay un fácil control de las condiciones ambientales y se pueden desarrollar semillas artificiales (Ahloowalia *et al.*, 2004; Bhojwani & Dantu, 2013; Castañeda *et al.*, 2014; Hussain *et al.*, 2012).

### **6.8 Vías morfogénicas *in vitro***

Se le llama morfogénesis a los cambios morfológicos que ocurren como resultado de la diferenciación y desarrollo de un organismo, por lo tanto, la morfogénesis *in vitro* consiste en la obtención de órganos o embriones somáticos a partir de un explante (Villareal, 2015; Zhuravlev & Omelko, 2008).

Las técnicas de cultivo de tejidos vegetales se basan en dos procesos de morfogénesis: organogénesis y embriogénesis somática.

### 6.8.1 Organogénesis

El término organogénesis hace referencia a la formación de órganos vegetales a partir de la dediferenciación de células diferenciadas y estimuladas para llevar a cabo una serie de divisiones celulares que originan un meristemoide, el cual es un agregado de células con características similares a las células meristemáticas (pequeñas, isodiamétricas, pared celular delgada, con vacuolas pequeñas y mucho citoplasma) que en un principio cuentan con plasticidad (son capaces de dediferenciarse y adquirir nuevos destinos) y con la capacidad necesaria para diferenciarse en brotes o raíces (Grafi, 2004; Schwarz *et al.*, 2004).

Se dice que de este proceso se obtienen individuos unipolares, es decir, emiten un solo órgano (aéreo o raíz) y a partir de éstos se regenera una nueva planta completa. Además, estos brotes poseen conexión vascular con el tejido madre (García, 2010).

La organogénesis puede ser directa o indirecta:

- Organogénesis directa

Consiste en la multiplicación de plantas a partir de yemas axilares preexistentes, o bien, también es posible obtener la formación de yemas *de novo* a partir de la formación de meristemoides (que posteriormente darán lugar a brotes), esto ocurre directamente desde las células del explante sin el crecimiento intermedio de células de callo (Villareal, 2015).

- Organogénesis indirecta:

Cuando los meristemoides (de los cuales crecen los nuevos brotes) tienen su origen en células provenientes de callo que crece a partir del explante (Suárez & Salgado, 2008).

Tanto en la organogénesis indirecta como en la directa se reconocen diferentes etapas: 1) dediferenciación o adquisición de competencia; 2) inducción y finalmente 3) determinación hasta la formación de nuevos órganos (organogénesis) (Schwarz *et al.*, 2004; Sugiyama, 1999).

- 1) Dediferenciación o adquisición de competencia

El proceso de dediferenciación implica la reversión de un estado de desarrollo a uno menos comprometido o con mayor plasticidad que puede o no dar lugar a callo. Su característica



distintiva es la reversión de un estado diferenciado dado a un estado similar a una célula madre que otorga pluripotencialidad (Grafi, 2004; Hicks, 1994).

En el caso de la organogénesis directa, se cree que las células competentes que no han producido callo son los progenitores de los órganos, lo que implica que dichas células se someten al proceso de diferenciación e individualmente, o quizás en pequeños grupos, producen un nuevo brote. Lo anterior entendiéndose a la competencia como la capacidad de reconocer señales hormonales o de otro tipo que desencadenan una vía de desarrollo particular) (Hicks, 1994; Schwarz *et al.*, 2004).

## 2) Inducción

La inducción es el proceso por el cual una señal actúa sobre las células competentes para alterar su destino de desarrollo. Esta fase ocurre entre el momento en que el tejido se vuelve competente y el momento en que se determina completamente para la producción de primordios (Hicks, 1994). Mientras que el final del proceso de inducción se define como el momento en el que una célula o grupo de células se determina para la producción de brotes o raíces (Christianson & Warnik, 1988; Wang & Schiefelbein, 2014).

El equilibrio de auxinas y citocininas en el medio juega un papel crítico en la determinación del destino morfológico de las células puesto que se obtienen diferentes tipos de órganos regulando las concentraciones de estos reguladores de crecimiento vegetal (RCV); en otros términos, una proporción relativamente alta de auxinas respecto a las citocininas promueve la regeneración de la raíz. Mientras que una concentración mayor de citocininas conduce a la producción de brotes y cuando se añaden al medio la misma proporción auxina y citocinina las células del explante proliferan para formar callos (Zhao *et al.*, 2008).

A su vez, es en este punto cuando el tejido del explante puede retirarse del medio de inducción de la raíz o del brote y puede transferirse a un medio basal sin RCV (Schwarz *et al.*, 2004).

## 3) Determinación

La determinación puede definirse como el grado de compromiso que tiene la célula en su programación biológica para seguir un proceso morfológico controlado genéticamente sin verse afectada por los estímulos externos (Christianson & Warnik, 1985; Wang &

Schiefelbein, 2014). En otras palabras, cuando las células competentes fueron inducidas previamente y entran en un estado de determinación, éste las fija a una vía de desarrollo particular (Hicks, 1994).

En esta etapa, los respectivos procesos inductivos dan como resultado células o grupos de células determinadas para la formación de raíces o brotes y el proceso se vuelve independiente de los RCV (Christianson & Warnick, 1985).

Entre las ventajas de la regeneración vía organogénesis se encuentran que al emplear meristemos como fuente de explante se obtienen plantas libres de patógenos (incluyendo virus) y con poca variación somaclonal, además de que la organogénesis tiene la ventaja de requerir bajas concentraciones de RCV (Abahmane, 2017; Bhojwani & Dantu, 2013).

#### 6.8.2 Embriogénesis somática

Existen dos vías de embriogénesis: cigótica y somática, siendo la primera el resultado de la polinización, fecundación y de la división meiótica, mientras que la embriogénesis somática consiste en la generación de embriones a partir de células somáticas (las cuales son el resultado de la división mitótica) para posteriormente obtener una planta completa. Estos embriones somáticos no poseen conexión vascular con el tejido madre. Al igual que la organogénesis, la embriogénesis somática puede ser directa o indirecta (Bhatia *et al.*, 2015; García, 2010).

### 6.9 Explante y establecimiento aséptico del material vegetal

Un paso crucial para llevar a cabo los procesos mencionados anteriormente es la elección del explante, el cual es una pequeña porción del tejido vegetal que funciona como generador de nuevas plantas en el cultivo *in vitro* (Ayala, 2012). Es muy frecuente la utilización de ápices, hojas, entrenudos, cotiledones, raíces, anteras e inclusive tejidos altamente diferenciados como los provenientes de frutos (Roca & Mroginski, 1991).

Algunos aspectos a considerar para la selección del explante son la disponibilidad, facilidad de manipulación, baja contaminación y rápida respuesta *in vitro*, en estos casos generalmente se opta por explantes provenientes de plantas jóvenes o incluso provenientes de semillas germinadas (Roca & Mroginski, 1991).

Para que el cultivo sea exitoso es necesario mantenerlo en condiciones asépticas y una de las formas de lograrlo es la desinfección del explante el cual generalmente porta agentes patógenos en su superficie, en su interior, o en ambas partes. La desinfección debe permitir eliminar a los microorganismos con el menor daño posible para los explantes (Roca & Mroginski, 1991).

Existe una gran variedad de compuestos químicos que se pueden utilizar como desinfectantes, siendo los más comunes el etanol y el hipoclorito de sodio. En algunos casos resulta útil emplear algún agente tensoactivo siendo un ejemplo Tween 20 del 0.01% al 0.1% (Roca & Mroginski, 1991).

### **6.10 Medio de cultivo**

Una vez desinfectado, se requiere cultivar el material vegetal en un medio artificial, el cual (George *et al.*, 2007; Ugarte *et al.*, 2016).

Un medio de cultivo puede ser definido como una formulación de sales inorgánicas y compuestos orgánicos que suministran al material vegetal empleado los nutrientes necesarios para su crecimiento. Los medios de cultivo están constituidos principalmente de compuestos que suministran: agua, sales minerales (macro y micronutrientes), compuestos orgánicos (carbohidratos, vitaminas y aminoácidos) y un agente gelificante (para medios semi-sólidos) (Bautista, 2019; Mroginski *et al.*, 2010).

Existen en el mercado medios de cultivo adecuados para la propagación masiva de plantas, para lo cual el más empleado es el MS (Murashige & Skoog, 1962), ya que contiene los requerimientos nutricionales necesarios para la mayoría de las especies vegetales. Murashige & Skoog (1962) estudiaron de forma detallada los requerimientos minerales de cultivos celulares de tabaco, obteniendo una formulación con altas cantidades de sales ( $\text{NO}_3$ ,  $\text{NH}_4$  y K), lo que permitió que los tejidos tuvieran tasas de crecimiento superiores a las obtenidas hasta ese momento con otras formulaciones (Beyl, 1999; Rodríguez *et al.*, 2004; Suárez, 2020). En el Anexo 1 se enlistan los componentes del medio de cultivo MS y sus respectivas concentraciones.

## 6.11 Reguladores de crecimiento vegetal

El crecimiento y el desarrollo de cultivos de plantas normalmente depende de la adición de fitohormonas o también llamadas reguladores del crecimiento vegetal al medio. Dichos reguladores son compuestos que, a muy baja concentración, son capaces de modificar el crecimiento o la morfogénesis de las plantas. Hay varias clases reconocidas, siendo las presentadas a continuación las principales: 1) auxinas; 2) citocininas; 3) giberelinas; 4) etileno y 5) ácido abscísico (George *et al.*, 2007).

A pesar de la gran variedad de RCV, son las auxinas y las citocininas las que más se utilizan en el cultivo *in vitro* de plantas.

### 6.11.1 Auxinas

Las auxinas son reguladores clave de casi todos los procesos de crecimiento y desarrollo de las plantas, incluida la formación de órganos florales y tejidos vasculares, crecimiento de brotes, dominancia apical, fototropismo y gravitropismo. El transporte polar de auxina es fundamental para el establecimiento y mantenimiento de la polaridad de la planta y sus órganos. La eliminación del ápice, la principal fuente de auxina, o la inhibición del transporte de esta hormona vegetal, conduce al crecimiento de yemas axilares (George *et al.*, 2007; Ishihara *et al.*, 2008; Ljung *et al.*, 2001)

A nivel celular, las auxinas controlan procesos básicos como la división y elongación celular (Petrasek *et al.*, 2019).

En el CTV, las auxinas (principalmente en combinación con citocininas) promueven el crecimiento de callos, suspensiones celulares y órganos, además de que casi siempre se requiere una auxina para estimular el crecimiento inicial de meristemos. El proceso de embriogénesis somática es a menudo iniciado en medios que contienen altos niveles de auxinas (principalmente 2,4-D), sin embargo, los embriones somáticos generalmente no se desarrollan hasta que la concentración de auxina sea baja (George *et al.*, 2007; Petrasek *et al.*, 2019).

Las concentraciones de AIA pueden diferir respecto que a parte de la planta se trate puesto que son más altas en los meristemos apicales. Aunque muchos tipos de células parecen capaces de producir auxina, la capacidad en las hojas jóvenes es comparativamente alta (Ljung *et al.*, 2005).

Se ha observado que la auxina con mayor actividad y concentraciones en las plantas es el ácido indol 3 acético (AIA), mientras que el ácido indol 3 butírico (AIB) está presente en pequeñas cantidades y presenta una actividad muy débil (Ludwig *et al.*, 1993).

### 6.11.2 Citocininas

Las citocininas tienen la capacidad de estimular e inducir una alta proliferación y división celular, suelen inducir la iniciación y elongación de las raíces al igual que pueden activar la senescencia de las hojas, permitiendo estimular el desarrollo fotomorfogénico vegetal y jugar un rol importante en el aumento y generación de la producción de brotes (Yong *et al.*, 2009). Además, se ha observado que la 6-Bencilaminopurina (BAP) induce la división celular, incrementa el contenido de clorofila a través de la diferenciación de cloroplastos, aumenta la actividad fotosintética, participa en la pérdida de dominancia apical y retrasa la senescencia (Davies, 1995).

Respecto al CTV, un alto nivel de citocininas vs. auxinas provoca la formación de brotes, mientras que con niveles bajos de citocininas y/o conjuntamente niveles altos de auxina, se observaba la formación de callos y la formación de raíces. Asimismo, la aplicación de citocininas estimula el desarrollo de las yemas laterales ya que, como se mencionó anteriormente, de esta forma se disminuye la dominancia apical (Kamínek, 1992; Skoog & Miller, 1965).

### 6.12 Oxidación

Un problema frecuentemente encontrado durante el cultivo *in vitro* es la oxidación; es decir, cuando los tejidos son dañados y se liberan especies reactivas de oxígeno y compuestos fenólicos, esto se manifiesta con un oscurecimiento del tejido vegetal, generando daño, inhibición del crecimiento y en los casos más graves incluso la necrosis y muerte del tejido. Los productos de la oxidación son tóxicos para el explante y se difunden en el medio de cultivo oscureciéndolo. Este problema es particularmente serio en explantes de especies leñosas (Nikoloff, 2015; Villarroel & Cadima, 2016).

La aparición de la oxidación se relaciona principalmente con el efecto abrasivo causado por los agentes empleados en la desinfección del explante, los cortes realizados en el mismo, los cambios en el pH o la composición del medio de cultivo (Nikoloff, 2015).

Entre las estrategias para reducir este problema se incluyen: el uso de sustancias antioxidantes como ácido ascórbico y ácido cítrico, o adsorbentes como PVP (polivinilpirrolidona) y carbón activado, ya sea en el medio de cultivo o en el último enjuague del proceso de desinfección; la incubación inicial de los explantes en oscuridad o bajo intensidad luminosa reducida; disminuir la temperatura de cultivo; realizar subcultivos con frecuencia; cultivar el explante en medio líquido; cambiar el agente desinfectante del explante o bien, disminuir los tiempos en el proceso de desinfección siempre que se mantenga la asepsia (Nikoloff, 2015; Villarroel & Cadima, 2016).

### **6.13 Enraizamiento y aclimatización**

La práctica de enraizamiento de los brotes propagadas *in vitro* resulta de gran relevancia debido a que al originar raíces, los brotes tienen mayor capacidad de absorber nutrientes, lo que favorece un mayor crecimiento y desarrollo. De igual manera, el desarrollo del sistema radicular es de gran importancia para lograr la transferencia y supervivencia de las plantas a condiciones de invernadero (Aguilar & Rodríguez, 2018; Quintero *et al.*, 2003).

Para llevar a cabo dicho proceso generalmente se requiere trasplantar a los brotes a un medio de cultivo modificado, esto es, cambiando el balance hormonal en donde las citocininas están en concentraciones bajas respecto a las auxinas como el ácido indol-acético (AIA), el ácido naftalenacético (ANA) y ácido indol-3-butírico (AIB), ya que se sabe que entre sus los efectos fisiológicos se encuentra la formación de raíces (Quintero *et al.*, 2003).

Sin embargo, diversas investigaciones con algunas especies del género *Agave* han mostrado que no es necesaria la aplicación de auxinas ni algún otro RCV para llevar a cabo el enraizamiento de brotes de dicho género como la llevada a cabo con *A. parrasana* (Santacruz *et al.*, 1999) y *A. victoriae-reginae* (Martínez *et al.*, 2003), que mostraron altas tasas de enraizamiento sin necesidad de auxinas.

Por otro lado, durante la incubación *in vitro*, los cultivos son expuestos a condiciones ambientales como humedad elevada, temperatura constante e intensidad lumínica baja. Al mismo tiempo, el medio de cultivo compuesto por concentraciones elevadas de azúcares, sales y RCV además de la ausencia de microorganismos generan anomalías morfológicas, anatómicas y fisiológicas (escasa funcionalidad de los estomas y del mecanismo fotosintético, ceras cuticulares poco desarrolladas, etc.) que pueden ser letales para las plantas cuando éstas son transferidas al ambiente externo, por lo que deben adaptarse gradualmente a las condiciones *ex vitro*. Este período de adaptación al nuevo hábitat es llamado etapa de aclimatización (Mroginski *et al.*, 2010).

Para llevar a cabo una aclimatización exitosa se debe contemplar el control de las condiciones ambientales (humedad, temperatura y luz) de tal manera que permita disminuir la deshidratación y, al mismo tiempo, estimular la fotosíntesis con el objeto de asegurar que sobreviva la mayor cantidad de plantas posibles, además de estimular su rápido crecimiento (Mroginski *et al.*, 2010).

#### **6.14 Propagación *in vitro* de agaves**

La propagación por medio del cultivo de tejidos vegetales ha sido previamente reportada en el género *Agave*.

En relación con la vía morfogénica de organogénesis (Tabla 5) Hazra *et al.* (2002) utilizaron como explante hojas de *A. sisalana* Perrine para la obtención de callo en el cual posteriormente se indujo la regeneración de brotes, mientras que Nikam (1997) regeneró brotes de la misma especie por medio de explantes de tallo y rizoma.

Valenzuela *et al.* (2006) utilizó explantes de tallo para la propagación de *A. tequilana*; Rivera (2015) registró la organogénesis indirecta y directa de *A. victoriae-reginae* a partir de explantes de hoja y tallo respectivamente. Kancab (2016) propagó a la especie *A. parviflora* Torr. por medio de organogénesis a través de explantes de tallo.

Aguilar & Rodríguez (2018) llevaron a cabo la organogénesis de *A. marmorata* Roezl a partir de ápices. Mosqueda *et al.*, 2022 y Bautista (2019) obtuvieron brotes de *Agave potatorum* vía organogénesis empleando tallos como fuente de explantes. Domínguez *et al.*, 2008 obtuvieron brotes de las especies *A. potatorum*, *A. karwinskii*, *A. cupreata*, *A. difformis*

A. Berger y *A. obscura* Schiede ex Schldl. a partir de tejido de tallo extraído de plántulas germinadas *in vitro*, mientras que para *A. potatorum*, Enríquez y colaboradores (2016) obtuvieron brotes adventicios a partir de tejidos de tallo.

En los estudios previamente citados se utilizó medio de cultivo MS y diferentes concentraciones de auxinas y/o citocininas.

Tabla 5. Especies de agave cultivadas por medio de organogénesis.

<b>Especie.</b>	<b>Explante.</b>	<b>Medio de cultivo y reguladores de crecimiento vegetal.</b>	<b>Respuesta</b>	<b>Referencia.</b>
<i>A. sisalana.</i>	Hoja.	MS con 26.6 $\mu$ M de BAP.	25.3 brotes por explante.	Hazra <i>et al.</i> , 2002.
<i>A. sisalana.</i>	Rizoma y tallo.	MS con 0.5 mg/L de KIN.	Rizoma: 5 brotes por explante.  Tallo: 5.7 brotes por explante.	Nikam, 1997.
<i>A. tequilana</i>	Tallo.	MS modificado con 11 $\mu$ M de 2,4-D y 44 $\mu$ M de BAP.	19.5 brotes por explante.	Valenzuela <i>et al.</i> , 2006.
<i>A. victoriae-reginae.</i>	Hoja y tallo.	MS Hoja: 0.5 mg/L de BAP y 0.5 mg/L de 2,4-D.  Tallo: 4 y 5 mg/L de BAP.	Hoja: organogénesis indirecta.  Tallo: organogénesis directa.	Rivera (2015).
<i>A. parviflora.</i>	Tallo.	MS con 15 mg/L de IBA.	18-24 brotes por explante.	Kancab (2016).
<i>A. marmorata.</i>	Ápice.	MS con AIA 10 mg/L de AIA y 10 mg/L de BAP.	41 brotes por explante.	Aguilar & Rodríguez (2018).
<i>A. potatorum.</i>	Tallo.	MS con 3 mg/L de BAP y 3 mg/L de AIA.	9.87 brotes por explante.	Mosqueda <i>et al.</i> 2022.



<i>A. potatorum</i> .	Tallo.	MS con 3 mg/L de BAP.	15.3 brotes por explante.	Bautista (2019).
<i>A. potatorum</i> , <i>A. karwinskii</i> , <i>A. cupreata</i> , <i>A. difformis</i> y <i>A. obscura</i> .	Tallo.	MS <i>A. cupreata</i> : 1.5mg/L de BAP. <i>A. difformis</i> : 0.2 m/L de TDZ. <i>A. karwinskii</i> : 1.0 mg/L de BAP. <i>A. obscura</i> : 0.2 mg/L de TDZ. <i>A. potatorum</i> : 2.0 mg/L de KIN.	<i>A. cupreata</i> : 10.5 brotes por explante. <i>A. difformis</i> : 8.5 brotes por explante. <i>A. karwinskii</i> : 6.1 brotes por explante. <i>A. obscura</i> : 11 brotes por explante. <i>A. potatorum</i> : 6.9 brotes por explante.	Domínguez <i>et al.</i> , 2008.
<i>A. potatorum</i>	Tallo.	MS con 1 mg/L de BAP.	De 6 a 12 brotes por explante.	Enríquez <i>et al.</i> , 2016.

**MS)** Murashige & Skoog (1962); **BAP)** 6-Bencilaminopurina; **2,4-D)** Ácido 2,4-diclorofenoxiacético; **TDZ)** Thidiazuron; **2iP)** 2-Isopenteniladenina; **KIN)** Kinetina; **IBA)** ácido indol-3- butírico; **AIA)** ácido indol-3-acético.

## 7 JUSTIFICACIÓN

*Agave potatorum* Zucc., con una distribución en Oaxaca y Puebla, es una especie endémica de México, importante ecológica, cultural y económicamente puesto que brinda múltiples servicios ambientales, es un valioso recurso que se emplea como fuente de alimento, como forraje, con fines medicinales y en la elaboración de diversos productos incluyendo el mezcal, cuya comercialización aporta un ingreso relevante a la economía de diferentes comunidades. Sin embargo, esto ha ocasionado la sobreexplotación de la especie y su situación se agrava debido a su largo ciclo de vida, por no presentar reproducción asexual y su reducida propagación por semillas, puesto que para la producción de mezcal las plantas son cortadas antes de su floración.

Una alternativa a los métodos convencionales de propagación es el cultivo de tejidos vegetales que ha hecho posible la propagación masiva y conservación a partir de pequeños fragmentos de múltiples especies, entre ellas algunos agaves, para hacer un uso sustentable de éstas.

El objetivo de esta investigación fue lograr la germinación de semillas y la regeneración de plantas a partir del cultivo de tallos, secciones de hojas y cotiledones. Con esta investigación se facilitará el establecimiento de un protocolo para la producción en masa de especies del género que puedan estar amenazadas o en las cuales haya un alto interés económico. Igualmente, la propagación de la especie *A. potatorum* representaría una fuente de individuos en caso de que las poblaciones silvestres disminuyan y además, para su uso comercial.

## 8 OBJETIVOS

### **Objetivo general:**

Realizar el establecimiento aséptico y la propagación *in vitro* de la especie *Agave potatorum*.

### **Objetivos particulares:**

- Establecer un protocolo de desinfección y establecimiento *in vitro* y *ex vitro* de semillas.
- Obtener plántulas para emplearlas como fuente de explantes (tallos, hojas y cotiledones) y a partir de ellos promover su multiplicación.
- Explorar las concentraciones de auxinas y citocininas (2,4-D y BAP respectivamente) para inducir la formación de regenerantes a partir de explantes somáticos.
- Llevar a cabo la aclimatización de las plantas regeneradas.

## 9 MATERIALES Y MÉTODOS

### 9.1 Material vegetal

Las 182 semillas empleadas para el desarrollo de esta investigación fueron donadas por el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Jardín Botánico del Instituto de Biología de la UNAM. Dicho material biológico fue colectado en el año 2019 en el municipio de Santa María Sola de Vega, perteneciente al estado de Oaxaca. Una vez colectadas, las semillas fueron almacenadas en bolsas de papel estraza y colocadas en un refrigerador con una temperatura de 5 °C, permanecieron en estas condiciones alrededor de un año.

#### 9.1.1 Caracterización de semillas.

Se pesó un lote de 100 semillas utilizando una balanza analítica, posteriormente se determinaron las medidas (largo y ancho) empleando una regla y finalmente se obtuvo un promedio de todos los datos obtenidos.

### 9.2 Establecimiento aséptico *in vitro* y germinación de semillas de *Agave potatorum*

#### 9.2.1 Desinfección

Se desinfectaron 182 semillas mediante un enjuague con agua destilada esterilizada, inmediatamente se lavaron durante 10 minutos con agitación constante empleando una solución de jabón antibacterial al 10% v/v para después sumergirlas en Soluvet ® por 30 minutos, posterior a esto se desinfectaron en una solución de etanol 70% v/v por 1 minuto y enseguida las semillas se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio 30% v/v con dos gotas de Tween 20 durante 30 minutos. Finalmente se realizaron tres enjuagues con agua destilada esterilizada.

#### 9.2.2 Germinación *in vitro*

Para la germinación, se colocaron 91 semillas ya desinfectadas en tubos de ensayo (una semilla por tubo) que contenían medio de cultivo MS al 50% de la concentración sus componentes inorgánicos y 100% de sus componentes orgánicos, 30 g/l de sacarosa, 8.5 g/l de agar bacteriológico como gelificante y pH ajustado a 5.7 (MS50). Todos los tubos se

incubaron a una temperatura de  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$  en un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8h de oscuridad.

### 9.2.3 Germinación *ex vitro*

Se sembraron 91 semillas previamente desinfectadas en un sustrato de tepojal, tierra negra y lombricomposta en proporciones 2:1:1 respectivamente, contenido en dos charolas de plástico de 24 cm de ancho, 11 cm de alto y 30 cm de largo. El riego se llevó a cabo de manera semanal. Las semillas permanecieron en condiciones de invernadero bajo luz natural.

La germinación para las condiciones *in vitro* y *ex vitro* se evaluó a los 8, 27 y 54 días después de la siembra.

### 9.2.4 Inducción de morfogénesis en tallos, bases de hojas y de cotiledones de *Agave potatorum*

Cuando las plántulas *in vitro* presentaron una altura entre 1-5 cm (parte aérea), éstas se disectaron para obtener tres tipos de explantes (3-7 mm de longitud): tallo, base del cotiledón y de las hojas.

Posteriormente dichos explantes se sembraron en medio MS50, adicionado 100 mg/L de ácido cítrico y 100 mg/L de ácido ascórbico.

Los tratamientos con RCV para cada tipo de explante fueron los mostrados en la Tabla 6:

Tabla 6. Tratamientos con reguladores de crecimiento vegetal para el cultivo *in vitro* de tallos, bases de hojas y de cotiledones de *Agave potatorum*.

<b>Tratamiento</b>	<b>BAP (mg/L)</b>	<b>2,4-D (mg/L)</b>
<b>T1</b>	1	0.5
<b>T2</b>	1.5	0.5
<b>T3</b>	2	0.5
<b>T4</b>	0	0.5
<b>T5</b>	1	0
<b>T6 Control</b>	0	0

Para cada tratamiento se realizaron 10 repeticiones, a excepción de los tratamientos 4 y 5, los cuales consistieron en 5 repeticiones cada uno. Cada explante se consideró como una repetición y se colocó uno por frasco.

El tiempo de inducción fue de 30 días, posteriormente los cultivos fueron transferidos a medio MS50 sin RCV cada 30 días. En dichos subcultivos se llevó a cabo la individualización y enraizamiento de los brotes regenerados.

Para llevar a cabo la evaluación de la oxidación, se contabilizaron los explantes que presentaban algún grado oscurecimiento, fuera leve o moderado.

Todos los cultivos *in vitro* fueron incubados a una temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  en un fotoperiodo de 16 horas de luz fluorescente blanca fría,  $50 \mu\text{mol m}^{-1}\text{seg}^{-2}$ .

A su vez, los medios de cultivo, agua y cristalería necesarios fueron esterilizados en autoclave a  $1.5 \text{ kg/cm}^2$ , 15 minutos a  $121^\circ\text{C}$ .

### **9.3 Aclimatización**

A 12 meses de iniciados los cultivos, se extrajeron de los frascos 45 plantas que presentaron más de 3 raíces y 3 hojas cuya longitud fue de 1-3 cm. Para llevar a cabo la aclimatización los frascos permanecieron destapados durante 24 horas. Posteriormente se sacaron las plantas, se lavaron las raíces con agua corriente con el fin de retirar el medio de cultivo y se dejaron secar durante 24 horas sobre papel periódico. Luego de esto se plantaron en un sustrato de tepojal, tierra negra y lombricomposta en proporciones 2:1:1 respectivamente en macetas de 10 cm de diámetro (3 plantas por maceta), éstas se colocaron dentro de bolsas de plástico transparentes durante 2 semanas y posteriormente se retiraron. Los riegos se realizaron cada 3 días las primeras 2 semanas, después el riego se realizó de manera semanal. Durante este proceso las plantas permanecieron en condiciones de invernadero bajo luz natural.

### **9.4 Análisis estadístico**

Por medio del programa Rstudio se aplicó la prueba de Shapiro Wilk para determinar si los datos se comportaban de manera no paramétrica. Posteriormente se realizó una prueba de Kruskal Wallis, la cual indicó que existen diferencias significativas entre los grupos

evaluados. Después se llevó a cabo una prueba de U de Mann con la finalidad de conocer dónde se encontraban dichas diferencias.

## 10 RESULTADOS

### 10.1 Desinfección de las semillas de *Agave potatorum*

Las semillas de *Agave potatorum* se caracterizaron por presentar un tamaño promedio de 0.7 - 0.8 cm de largo y 0.4 - 0.5 cm de ancho y un peso promedio de 0.008 g (Figura 4).



Figura 4. Semillas de *Agave potatorum*

El método de desinfección superficial fue efectivo ya que el 100% de las semillas se establecieron *in vitro* asépticamente, no se manifestaron contaminantes sistémicos.

### 10.2 Germinación de semillas de *Agave potatorum*

#### 10.2.1 Germinación

Para las condiciones *in vitro* y *ex vitro*, las primeras semillas germinaron dentro de los primeros 4 días. Se consideró que la germinación había ocurrido cuando de la testa emergió el cotiledón, el cual fue una estructura ( $\leq 1$ mm) blanquecina que pronto se elongó y adquirió color verde (Figuras 6.1 y 6.2). La radícula emergió después de que lo hiciera el cotiledón, ésta fue una estructura delgada, blanca.

### 10.2.2 *In vitro*

Las 91 semillas se establecieron asépticamente *in vitro*, germinaron de manera asincrónica. Los registros a los 8, 27, 54 días después de la siembra, indicaron respectivamente que habían germinado 23 (25.28 %); 45 (49.46 %); en total 51 semillas (56.04 %) (Figura 5); 12 meses después no había germinado ninguna otra. En el día 27 después de la siembra, las plántulas más desarrolladas, presentaron un cotiledón (1-5cm), una hoja (0.5-4 cm) aún sin expandir su lámina y una raíz (1-3 cm) (Figura 6).

Debido a que las semillas germinaron de manera asincrónica, en el día 27 después de la siembra se observaron diferentes etapas del cotiledón, el cual para ese entonces se caracterizó por alcanzar un tamaño aproximado de entre 1 a 5 cm de longitud, así como la emergencia de las primeras hojas verdaderas que llegaron a presentar un tamaño de 0.5 a 4 cm. En cuanto a las raíces, éstas medían entre 1 a 3 cm de longitud (Figura 6).

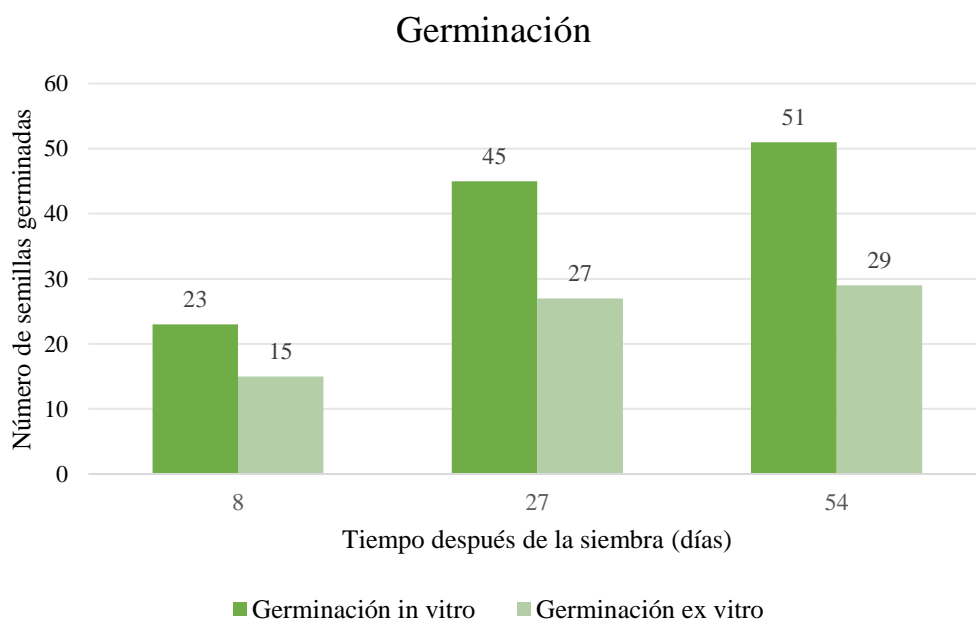


Figura 5. Número de semillas germinadas en condiciones *in vitro* y *ex vitro*.



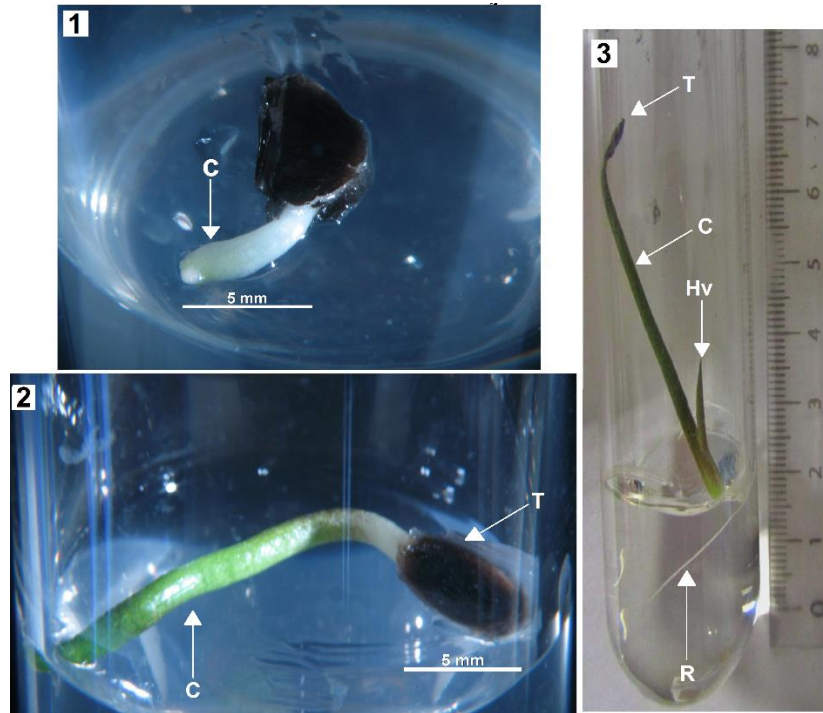


Figura 6. Semillas en diferentes etapas de germinación *in vitro* y desarrollo de la plántula a los 27 días de la siembra. 1) Cotiledón, fue la estructura que emergió primero y pronto se volvió verde; 2) Cotiledón elongado; 3) Plántula con cotiledón, raíz y la primera hoja verdadera. **T**: testa; **C**: cotiledón; **R**: raíz; **Hv**: hoja verdadera.

A 12 meses de iniciar la germinación, las plantas presentaron raíces de 4-5 cm de largo, de 2-4 hojas expandidas de una longitud de 4-5 cm y cuya coloración fue verde; en los márgenes de las hojas se observaron espinas (Figura 7).

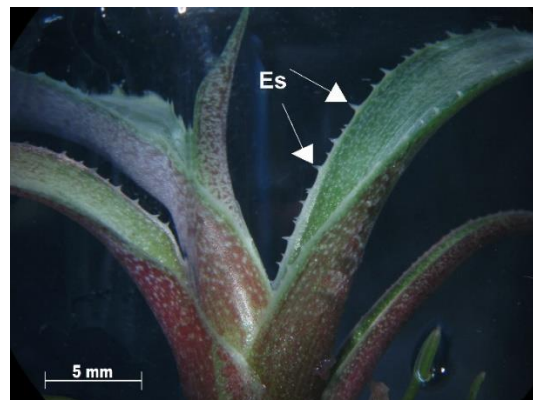


Figura 7. Planta cultivada *in vitro* a 12 meses de la germinación de semillas, fue notoria la presencia de espinas y con pequeñas “manchas” en las hojas, más abundante en las hojas centrales. **Es**) espinas.

### 10.2.3 *Ex vitro*

Después de 8 días de la siembra se observó que habían germinado 15 semillas (16.49%); a los 27 días habían germinado 27 (29.68%) y 29 (31.87%) a los 54 días (Figura 5).

Una vez transcurridos aproximadamente 9 meses desde la siembra, cada una de las plántulas cultivadas bajo condiciones *ex vitro* presentó un cotiledón de 3 cm (Figura 8.1) y desarrollaron entre 2 y 3 hojas, las cuales se caracterizaron por lo siguiente: un tamaño aproximado de 1-4 cm de largo; en la base del envés se observó una coloración rojiza-púrpura que disminuía de manera gradual hasta llegar al ápice y espinas en los bordes de las hojas más antiguas (Figuras 8.2 y 8.3).



Figura 8. Plántulas de *Agave potatorum* en condiciones *ex vitro* a 12 meses de la siembra. **1)** El cotiledón permanece verde como un órgano fotosintético; **2)** Hojas verdaderas sin la presencia del cotiledón, el cual se degradó; **3)** Espinas en los bordes de una lámina. **C:** cotiledón y **Hv:** hoja.

Por otro lado, el análisis estadístico llevado a cabo indicó que existen diferencias significativas entre la germinación en condiciones *in vitro* y *ex vitro* (valor de  $P = 0.0029$ ).

### 10.3 Oxidación

Después de aproximadamente 6 meses de la siembra de los tres diferentes tipos de explantes en medio de cultivo con RCV, se observó que varios presentaron algún grado de oxidación

que comenzó desde la zona del corte realizado con el bisturí, y otros simplemente se mantuvieron sin cambio alguno.

Considerando el total de los seis tratamientos, el explante con mayor oxidación fue el de cotiledón con un total de 44 explantes oxidados, en contraste con el de tallo que presentó la menor cantidad de explantes oxidados, es decir, 28. Por su parte, 32 explantes de hoja presentaron dicho problema, cantidad que representó el 54% (Figura 9).

Al mismo tiempo, el control fue el tratamiento con mayor número de explantes oxidados (24), esto de manera contraria a los del tratamiento 1 (1 mg/L BAP y 0.5 mg/L 2,4-D) que presentó la menor cantidad de explantes con algún grado de oxidación (Figura 10).

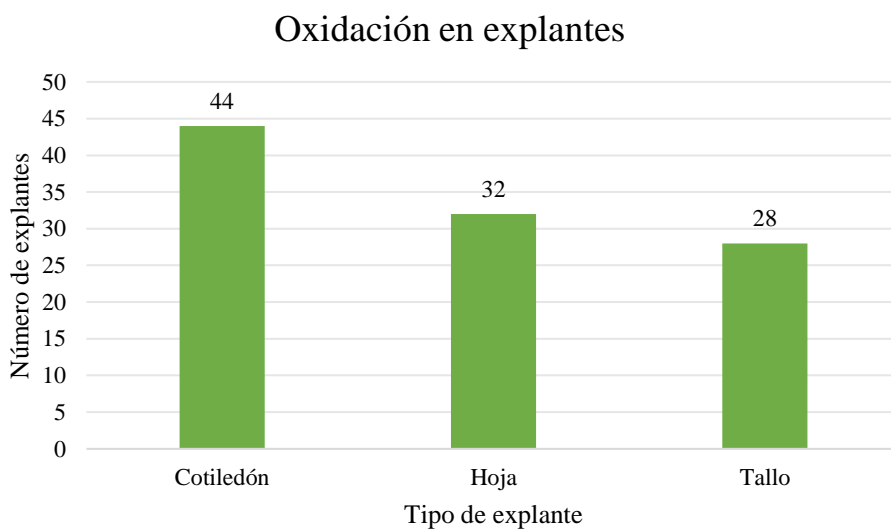


Figura 9. Número y tipo de explantes oxidados a los 6 meses después de la siembra.

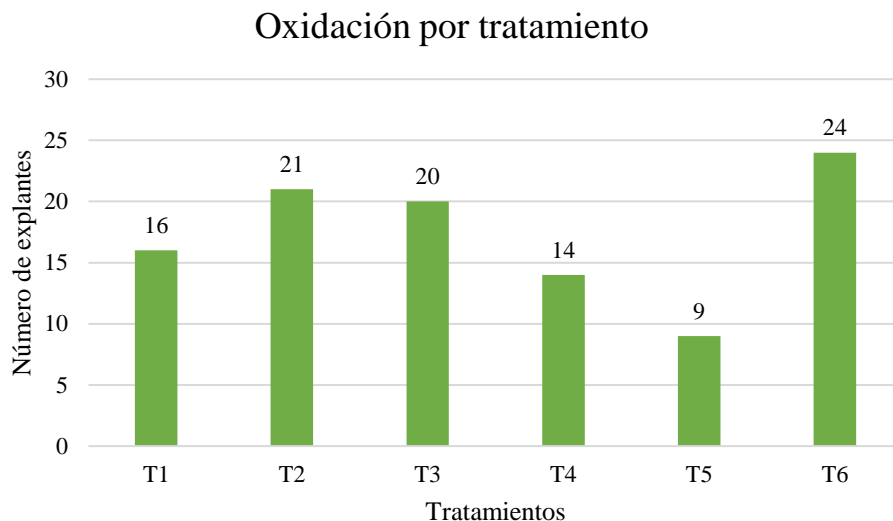


Figura 10. Número de explantes oxidados por tratamiento a 6 meses de la siembra.

De acuerdo al análisis estadístico, los diferentes tratamientos no tuvieron un efecto significativo en la respuesta de oxidación (Valor de  $P = 0,05292$ ).

#### **10.4 Crecimiento de callo y organogénesis directa e indirecta**

Transcurridos 30 días después de la siembra en el medio con RCV, algunos de los explantes de los tratamientos 2 (1.5 mg/L de BAP con 0.5 mg/L de 2,4-D) y tratamiento 3 (2 mg/L de BAP con 0.5 mg/L de 2,4-D) comenzaron a presentar una respuesta organogénica (formación de brotes, hojas y raíces) así como el desarrollo de callo (Figura 11).

El callo que se formó en los diferentes tratamientos y tipos de explantes se caracterizó por ser compacto, de una coloración de hialina a amarillenta y con regiones de color verde. En algunos explantes se percibió callo con zonas de color café debido a oxidación (Figuras 11.1-11.5).

Para la formación de hojas, los nódulos que emergieron del callo adquirieron un color verde, se elongaron como una pequeña lámina foliar que se expandió evidenciando la identidad de una hoja; al paso del tiempo emergieron una segunda y tercera hojas y fue notorio que emergían de un brote oculto entre el callo. Es posible que en el callo, inicialmente se haya desarrollado una zona meristemática con el posterior desarrollo de un tallo y

primordios de hojas (Figura 11.3). A 10 meses después de la inducción se registraron 113 brotes regenerados por medio de organogénesis indirecta, siendo que la mayoría (81) se presentaron en el tratamiento con 2 y 0.5 mg/L de BAP y 2,4-D, respectivamente (Tabla 7). El explante con mayor número de brotes regenerados mediante esta vía fue el de tallo (100 brotes) (Tabla 8).

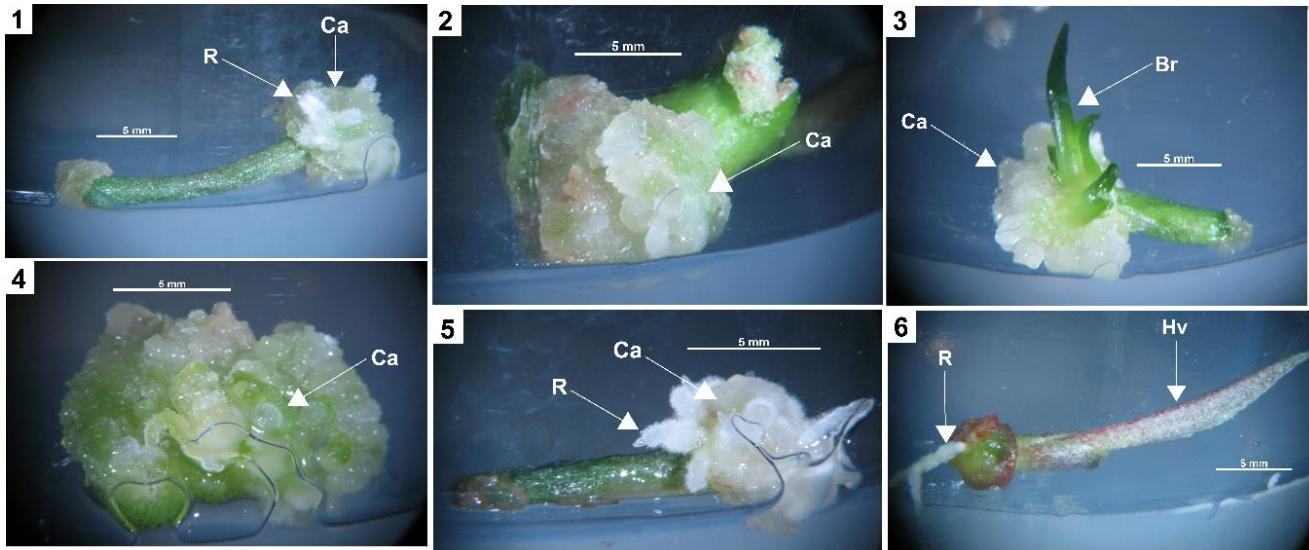


Figura 11. Respuestas organogénicas y crecimiento de callo a 30 días después del periodo de inducción. Tratamiento 2 (BAP 1.5 mg/L con 2,4-D 0.5 mg/L): **1)** Callo y raíces emergiendo de un explante de cotiledón; **2)** explante de tallo con callo; **3)** Explante de tallo con callo y brotes. Tratamiento 3 (BAP 2 mg/L con 2,4-D 0.5 mg/L): **4)** Explante de cotiledón con callo; **5)** Callo y raíces emergiendo de explante de tallo. Tratamiento control: **6)** Explante de tallo con raíces y una hoja. **R:** raíz; **Ca:** callo; **Br:** brote; **Hv:** hojas

Tabla 7. Número de brotes por tratamiento. Resultados al término de 10 meses después del periodo de inducción.

<b>BAP/2,4-D mg/L.</b>	<b>Número de brotes.</b>	<b>Vía indirecta.</b>	<b>Vía directa.</b>
<b>1/ 0.5</b>	17	1	16
<b>1.5/ 0.5</b>	81	31	50
<b>2/ 0.5</b>	125	81	44
<b>0/ 0.5</b>	0	0	0
<b>1/ 0</b>	0	0	0
<b>Control</b>	5	0	5
<b>Total</b>	228	113	115

Tabla 8. Número de brotes obtenidos por el tipo de explante. Resultados al término de 10 meses después del periodo de inducción

<b>Explante</b>	<b>Brotos</b>	<b>Vía indirecta</b>	<b>Vía directa</b>
<b>Hoja</b>	13	13	0
<b>Tallo</b>	215	100	115
<b>Cotiledón</b>	0	0	0
<b>Total</b>	228	113	115

Por otro lado, el desarrollo de órganos vía directa inició con la formación en la superficie de los explantes de estructuras nodulares en forma de domo, que crecieron y gradualmente fueron diferenciándose en raíces, hojas o brotes (Figura 12).

A 10 meses después de la inducción se registraron 115 brotes regenerados por medio de organogénesis directa, todos obtenidos a partir de explantes de tallo (Tabla 8). El tratamiento en el que se registró un mayor número de brotes obtenidos por medio de la vía directa fue el 2 (1.5 y 0.5 mg/L de BAP y 2,4-D, respectivamente) (Tabla 7).

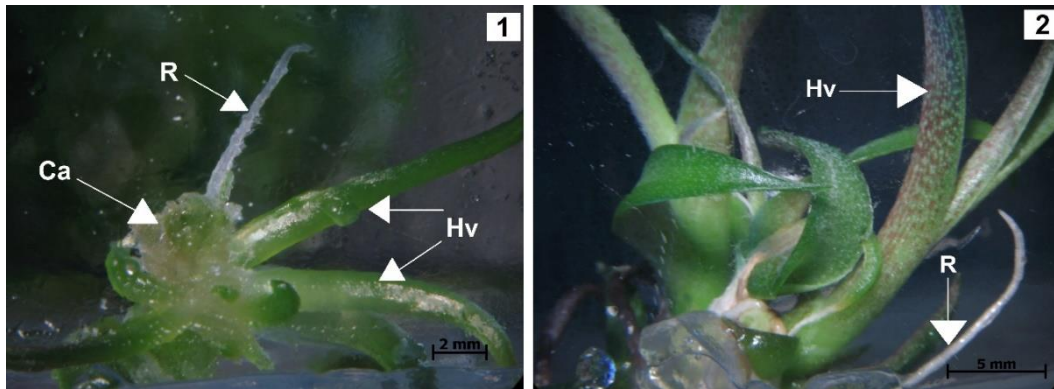


Figura 12. Organogénesis en explantes de *Agave potatorum* a 10 meses después del periodo de inducción. **1)** Organogénesis indirecta en el tratamiento 2 a partir de explante de tallo, formación de raíz y hojas a partir de callo; **2)** Organogénesis directa en el tratamiento 2 a partir de explante de tallo, formación de hojas y raíces. **Ca:** callo; **Hv:** hoja verdadera; **R:** raíz.

En el Control, 5 de los explantes de tallo desarrollaron las hojas y raíces que inicialmente les habían sido disectadas, restableciéndose la condición inicial de las plántulas; no formaron nuevos brotes y ningún tipo de explante formó callo. Las únicas respuestas observadas ocurrieron en el cultivo de tallo.

En los tratamientos 1, 2 y 3 a partir de tallos y solamente en un explante de hoja ocurrió la formación de brotes. En los explantes de tallo, es probable que los brotes se hayan desarrollado por activación de yemas axilares y/o por la formación de yemas adventicias.

En el desarrollo de hojas y brotes a partir de callo, se formaron nódulos que aumentaron de tamaño, adquirieron color verde, y se elongaron como una pequeña lámina foliar que se expandió evidenciando la identidad de una hoja; al paso del tiempo emergieron una segunda y tercera hojas y fue notorio que surgieron de un brote oculto entre el callo. Es posible que en el callo, inicialmente se haya desarrollado una zona meristemática con el posterior desarrollo de un tallo y primordios de hojas (Figura 12.1).

A 10 meses del periodo de inducción, el tratamiento 3 fue el que presentó una mayor regeneración de brotes (125), seguido del tratamiento 2 en donde se registró la formación de

81 brotes, mientras que los tratamientos 4 y 5 en los que incluían respectivamente solo 2,4-D y BAP no hubo formación de órganos (Tabla 7).

En el tratamiento control sólo los explantes de tallo regeneraron hojas y raíces constituyéndose en plántulas individuales (Figura 11.6); los menos regenerativos fueron los tratamientos 4 y 5 que incluían uno de los dos RCV (BAP o 2,4-D) en donde no hubo formación de órganos.

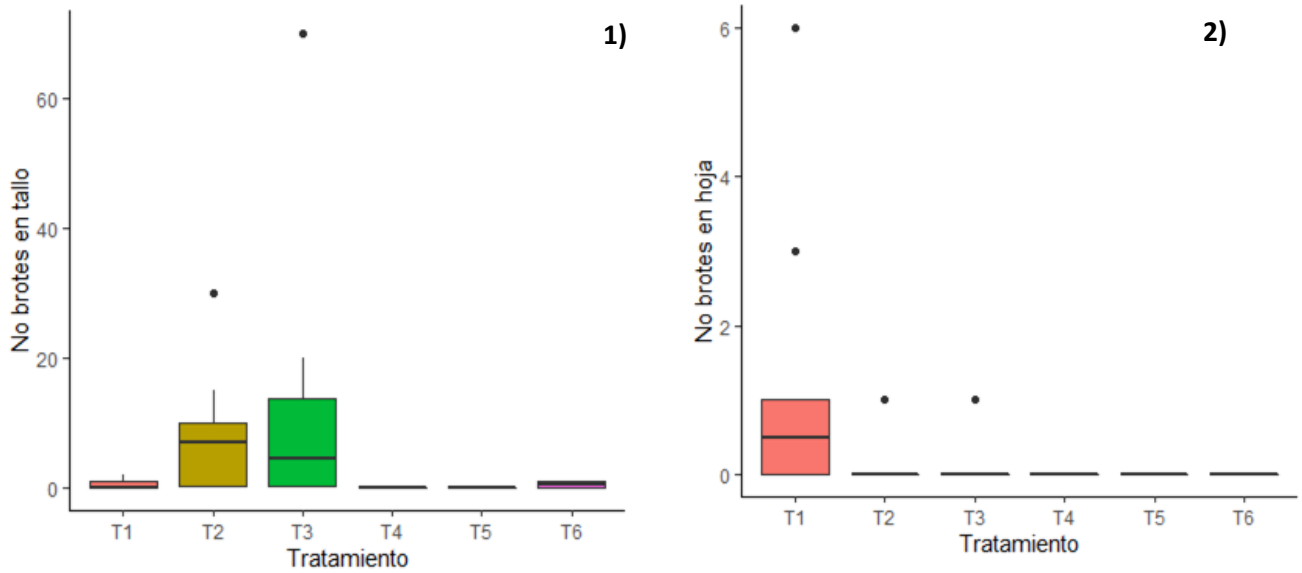
Mientras que entre los tres tipos de explantes empleados en esta investigación, los de tallo fueron los que presentaron el mayor número de respuesta (es decir, formación de brotes y callo), en contraste con los explantes de cotiledones, de los cuales únicamente 7 presentaron formación de callo. De igual forma los explantes de tallo fueron los que mostraron mayor capacidad de regeneración (Tabla 8).

Por otro lado, al analizar el efecto de cada tratamiento en la formación de brotes dependiendo el tipo de explante, se obtuvo que los datos no tienen una distribución normal. A su vez, la prueba de Kruskal Wallis indicó que existen diferencias significativas entre los tratamientos, las cuales fueron evidenciadas a través de la prueba U de Mann que señaló que el tratamiento 3 y el tratamiento 2 fueron significativamente diferentes al resto en los explantes de tallo y hoja respectivamente (Tabla 9, Figura 13).

Tabla 9. Brotes por explante y tratamiento\*

<b>Tratamiento</b>	<b>Tallo</b>	<b>Hoja</b>
<b>T1</b>	0.5 ± 0.670 <sup>a</sup>	1.2 ± 1.932 <sup>a</sup>
<b>T2</b>	8.0 ± 9.333 <sup>b</sup>	0.1 ± 0.316 <sup>b</sup>
<b>T3</b>	12.5 ± 21.417 <sup>c</sup>	0.1 ± 0.316 <sup>b</sup>
<b>T4</b>	0 <sup>ab</sup>	0 <sup>b</sup>
<b>T5</b>	0 <sup>ab</sup>	0 <sup>b</sup>
<b>T6</b>	0.5 ± 0.527 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>





\*Media  $\pm$  SE con superíndice diferente son significativamente diferentes ( $P \leq 0.05$ ).

Figura 13. Formación de brotes por explante y tratamiento. **1)** Número de brotes regenerados a partir de explantes de tallo. Se observa que el tratamiento 3 presentó el mayor número de éstos. **2)** Número de brotes regenerados a partir de explantes de hoja. El tratamiento uno fue el que promovió un mayor número de regenerantes.

## 10.5 Aclimatización

Después de 2 meses de ser plantadas en el suelo, se registró un 71.11% de supervivencia de las plantas extraídas de los frascos. Éstas se caracterizaron por presentar de 2 a 5 hojas cuyo tamaño varió de 2-6 cm de longitud y 1-2 cm de ancho (Figura 14). La apariencia de las hojas era igual que la de las plantas obtenidas a través de germinación de semillas en condiciones *ex vitro*.

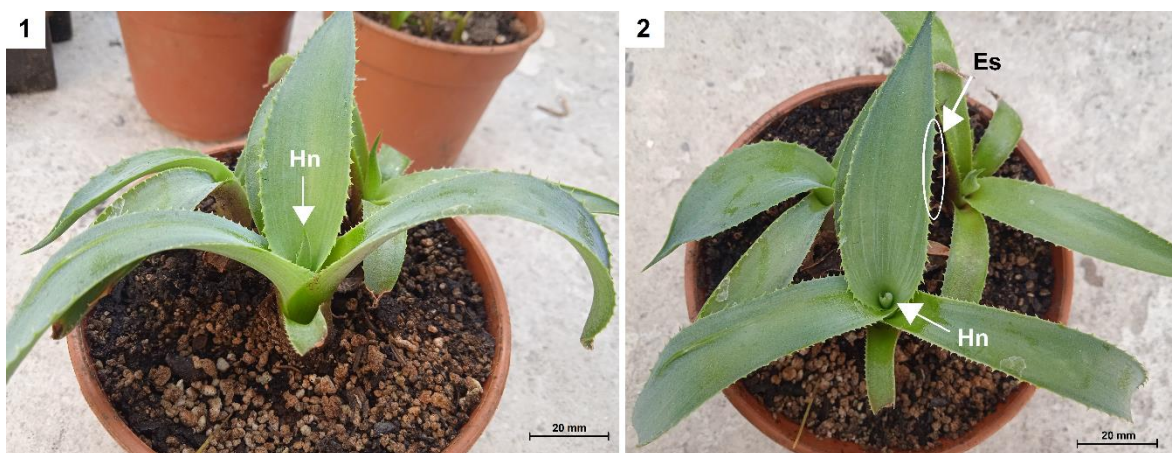


Figura 14. Plantas de *A. potatorum* propagadas *in vitro* a 2 meses de ser plantadas en suelo.

1) Surgieron hojas nuevas desde la parte central de la roseta. 2) Las hojas presentaron una coloración grisácea-azulada y espinas en los bordes. **Hn**: Hojas nuevas; **Es**: espinas.

## 11 DISCUSIÓN

### 11.1 Desinfección y germinación de las semillas

Para la caracterización de las semillas, se registró que éstas tenían un tamaño promedio de 0.7-0.8 cm de largo y 0.4-0.5 cm de ancho, este último dato coincide con lo reportado por García & Franco (2018).

En el presente estudio, a los 54 días de haber iniciado los cultivos, se obtuvo la germinación de 29 (31.87%) semillas bajo condiciones *ex vitro* y 48 (52.75%) *in vitro* en medio MS50 con la mitad de la concentración de las sales minerales. Han sido reportados altos porcentajes de germinación en otras especies (Asparagaceae), bajo condiciones similares *in vitro*, Domínguez y colaboradores (2008) realizaron una desinfección de las semillas de diferentes especies del género *Agave*; el protocolo consistió en lavados con detergente líquido, etanol y hipoclorito de sodio, dichos autores reportaron una contaminación inferior al 20% y una germinación del 68, 66, 63, 100 y 60% para las especies *Agave cupreata*, *A. difformis*, *A. karwinskii*, *A. obscura* y *A. potatorum* respectivamente, en medio MS, incubadas a una temperatura de 25°C y con un fotoperiodo de 24 horas de luz.

A su vez, Arzate & Mejía (2011) establecieron asépticamente semillas de *Agave angustifolia*, las cuales fueron lavadas con jabón, etanol, hipoclorito de sodio. Dichas semillas fueron establecidas *in vitro* en medio de cultivo MS a una temperatura de 25°C. No se reportó el porcentaje de germinación.

Mientras que Martínez *et al.*, 2003 desinfectaron semillas de *A. victoriae-reginae* para lo cual emplearon etanol e hipoclorito de sodio. Dichos autores reportaron un porcentaje de germinación del 90% después de dos semanas de incubación con una temperatura de 25°C, fotoperiodo de 16 horas luz y empleando medio de cultivo MS.

Por otro lado, Vargas (2017) llevó a cabo la desinfección de semillas de *A. guiengola* por medio de un lavado con jabón, etanol, SoluVet® e hipoclorito de sodio con Tween®. Después de 12 días de siembra en una temperatura de 25 °C y un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad, se registró el 88.9% de germinación.

Orea *et al.*, 2006 estudiaron la germinación de semillas de *A. durangensis* en condiciones en donde la temperatura oscilaba entre 15°C a 35°C. Los autores observaron que la germinación comenzó antes de los 8 días de siembra y fue del 94% después de 16 días a

una temperatura de 25°C. Las semillas utilizadas fueron previamente desinfectadas en hipoclorito de sodio al 5% v/v.

Por su parte, Ayala (2012), estableció asépticamente semillas de *A. atrovirens* por medio de un lavado con detergente, hipoclorito de sodio y etanol. Las semillas fueron sembradas en medio MS y a una temperatura de 25°C con fotoperiodo de 16 horas de luz, obteniendo un 50% de germinación.

Los resultados apuntan a que un mayor número de semillas de agaves germinan desde la segunda semana y antes de concluir la cuarta semana de cultivo, asimismo, ha sido reconocido que la germinación asincrónica, es una adaptación al hábitat donde podrían mantenerse en el suelo las semillas que eventualmente podrían germinar y con ello no se pondría en riesgo la sobrevivencia de todas las plántulas. Se observó que para la germinación de las semillas de *A. potatorum* no se requirió aplicar RCV, y posiblemente no todas las semillas germinaron debido a que los embriones pudieron presentar daños o heridas en la testa (Dávila *et al.*, 2005; Rabenda, 1990; Rosas *et al.*, 2001).

Además, se puede inferir que respecto a la diferencia de porcentajes de germinación *in vitro* y *ex vitro*, un factor a considerar es que dentro de los frascos de los cultivos *in vitro* se puede acumular etileno, que es una hormona que entre sus diferentes efectos fisiológicos estimula la germinación. Esta resulta ser una ventaja sobre las condiciones *ex vitro*, además de otros factores como podrían ser la humedad, la temperatura y los componentes del medio de cultivo (Davies, 1995; Vargas, 2017).

Además, en esta investigación se redujo al 50% la concentración de sales minerales del medio de cultivo para facilitar la imbibición, ya que la presencia de estos compuestos provoca una menor disponibilidad de agua para las semillas, de manera que éstas deben generar suficiente potencial osmótico para permitir el crecimiento de los embriones. El estrés osmótico también podría potenciar la síntesis de ABA que es uno de los principales causantes de la latencia en semillas (Goycokic & Saavedra, 2007; Raghavendra *et al.*, 2010).

## 11.2 Oxidación

Investigaciones previas sugieren que la oxidación es un problema común en el cultivo *in vitro* del género *Agave*. Martínez (1998), quien llevó a cabo el cultivo de *A. victoriae-reginae* por

medio de explantes de hoja de plántulas, reportó porcentajes altos de oxidación en todos los tratamientos, incluso hasta el 100% de los explantes que provocó muerte en varios de los explantes .

Flores *et al.*, 2021 reportaron que todos los explantes de tallo y yemas axilares de *A. salmiana* presentaron oxidación. A su vez Rivera (2015) se enfrentó a la misma problemática con *A. victoriae-reginae*: 66 y 73% de los explantes de hojas (bases y ápices foliares respectivamente) sembrados en medio de cultivo con PVP presentaron oxidación.

Por su parte, Ayala (2012) observó la oxidación del 100% de los embriones cigóticos de *A. atrovirens* en el grupo control, así como en los tratamientos con auxinas y citocininas. A su vez, los callos obtenidos de explantes de hoja no desarrollaron ningún tipo de respuesta en alguno de los tratamientos, observándose una rápida oxidación, así como necrosis del tejido.

En el presente estudio se empleó ácido ascórbico y ácido cítrico como antioxidantes. De manera general, puede definirse a un agente antioxidante como un compuesto que tiene la capacidad de aceptar electrones y reaccionar directamente con especies reactivas de oxígeno, descomponiéndolas o previniendo su formación (Azofeifa, 2009). A pesar del uso de dichos antioxidantes, en esta investigación no fue suficiente para evitar la oxidación ya que este problema se presentó en los tres tipos de explantes, en los seis tratamientos a los pocos días de iniciar la siembra y a los 3 meses de cultivo alcanzó porcentajes entre el 50% (hojas, tallos) hasta 70% (cotiledones) del número de explantes.

La oxidación de tejidos cultivados *in vitro* puede ser activada por mecanismos en respuesta a un tipo de estrés como: intensidad de luz, cortes o lesiones, explantes de tamaños muy pequeños, patógenos, sustancias abrasivas pueden desencadenar el estrés oxidativo y que son aplicadas durante la desinfección del explante, etc. A su vez, la oxidación está relacionada con el estado fisiológico de los tejidos el cual puede variar según la edad de la planta madre, ya que se sabe que tejidos juveniles son menos propensos a la fenolización que aquellos tejidos más viejos (Azofeifa, 2009, Concepción *et al.*, 2005).

Según lo anterior, en esta investigación el factor que principalmente pudo influir para que se presentara la oxidación en algunos de los explantes fueron los cortes realizados a las plántulas para obtener los tejidos, ya que se realizaron dos cortes en los extremos de los

explantes de tallo (para quitar raíces y hojas), base de la hoja (para retirar tallo y ápice) y cotiledón (para extraerlo del tallo y retirar la testa del ápice). A su vez, el tamaño pequeño de los explantes (3-7mm de longitud) también pudo haber sido un factor importante para que se presentara la oxidación.

### 11.3 Inducción a la morfogénesis

Bajo las condiciones de cultivo ensayadas (con BAP 1-2 y 2,4-D 0.5 mg/L) se promovió el desarrollo de órganos sólo de los explantes de hoja y de tallo, tanto a partir de callo como por vía directa. Los explantes de cotiledones, no fueron regenerativos. Por vía indirecta las células del callo adquirieron y expresaron su capacidad morfogenética; y por vía directa puede sugerirse que células competentes, presentes en los explantes, se desarrollaron en órganos en respuesta a los tratamientos con RCV; al mismo tiempo, debieron tener participación en esta respuesta el estado fisiológico de los explantes y la variabilidad genética de las semillas. El empleo de estructuras procedentes de semillas germinadas ha sido una útil herramienta en la multiplicación de especies amenazadas no solo por su potencial regenerativo sino por la conservación de variabilidad genética (Dávila *et al.*, 2005).

En el presente estudio, a partir de tallos y hojas con un tiempo de 10 meses después del periodo de inducción se obtuvieron de 8.1 a 12.5 brotes por explante, dando un total de 223 brotes, los cuales, una vez individualizados, enraizaron en medio de cultivo sin RCV constituyéndose en plántulas completas en *ca.* 20-30 días (Tablas 18 y 19). A partir de secciones de hoja se obtuvieron 13 brotes, esta respuesta observada es el primer reporte para la especie; no obstante, resultados similares han sido reportados para otras especies (Hazra *et al.*, 2002; Rodríguez *et al.*, 1996; Rodríguez *et al.*, 2011; Tejavathi *et al.*, 2007)

Domínguez *et al.*, 2008 utilizaron tallos de *A. cupreata*, *A. difformis*, *A. karwinskii*, *A. obscura* y *A. potatorum* y los sembraron en medio de cultivo MS suplementado con diferentes citocininas en varias concentraciones. Los resultados indicaron que las eficiencias más altas en producción de brotes en *A. cupreata* y *A. karwinskii* se obtuvieron con 1.5 y 1 mg/L de BAP; en *A. difformis* y *A. obscura* con 0.2 mg/L de TDZ, mientras que en *A. potatorum* la mejor respuesta ocurrió con 3 mg/L de KIN.

En el estudio realizado con *Agave tequilana*, Valenzuela *et al.*, 2006 emplearon explantes de hoja y tallo, siendo estos últimos los únicos que presentaron formación de callo

en diferentes concentraciones de BAP y 2,4-D. Según los autores, esto podría atribuirse al tipo de células que conforman al tejido y a su especialización.

Vargas (2017) disectó plántulas de *A. guiengola* provenientes de semillas para obtener diferentes tipos de explantes, los cuales se sembraron en medio MS suplementado con diferentes concentraciones y combinaciones de BAP, ANA y 2,4-D. El autor observó que la mejor respuesta se obtuvo con los explantes de base de tallo en el tratamiento con 0.5 mg/L de ANA y 1.5 mg/L de BAP, presentando una respuesta morfogénica en el 100% de los explantes transcurridos 60 días.

Mientras que Chávez *et al.*, 2021 emplearon segmentos de tallo de *A. guiengola* los cuales fueron sembrados en medio MS adicionado con BAP y 2iP. Los autores observaron que el mejor tratamiento para inducir la regeneración de brotes fue aquel con únicamente 2 mg/L BAP, obteniendo aproximadamente 3.7 brotes por explante.

Bautista (2019) utilizó tallos de plántulas provenientes de semillas de *A. potatorum* colectadas en dos diferentes comunidades de Oaxaca (San Pedro Totolapan y Sola de Vega). Los explantes se colocaron en medio MS con dos diferentes concentraciones de sales minerales, es decir, 75 y 100%, y de kinetina y BAP. La autora se percató de que la proliferación de brotes de la procedencia de San Pedro Totolapan fue mayor en el medio de cultivo con únicamente 3 mg/L de BAP ya que formaron en promedio 23.3 brotes, mientras que los cultivos de la procedencia de Sola de Vega, en medio de cultivo con 3 mg/L de BAP y 2 mg/L de kinetina formaron 20.68 brotes; ambos con sales minerales al 75%.

Nikam (1997) comparó el efecto de diferentes medios de cultivo (Murashige & Skoog y Schenk & Hildebrandt) suplementados con diferentes concentraciones de RCV (KIN, BAP, ANA, AIA y 2,4-D) sobre explantes de tallo y rizoma de *Agave sisalana*. Concluyó que con el uso del medio MS se pudo obtener un mayor número de brotes, además de destacar el importante papel de la kinetina ya que el mayor número de brotes en los explantes usados fue observado con 0.5 mg/L de KIN.

A su vez, Das (1992) no obtuvo ninguna respuesta al usar hojas inmaduras de *A. sisalana* con un amplio rango de BAP (0.88 - 44 $\mu$ M).

Se sabe que los explantes deben colocarse en medios de cultivo con mayor proporción de citocininas que de auxinas para promover la proliferación de brotes (razón por la que en esta investigación el 2,4-D se usó en bajas concentraciones respecto al BAP), esto ocurre

porque las citocininas estimulan el transporte de auxinas de los tallos a los brotes laterales (Domínguez, 2009; Enríquez & Castañeda, 2005; Jankiewicz, 1999). Es posible que lo mismo haya ocurrido en esta investigación, es decir, que en los explantes de tallo empleados en los experimentos existiera la presencia de yemas laterales, que con la combinación de BAP y 2,4-D, se diferenciaron en brotes. Esto coincide con lo mencionado por George *et al.* (2007), es decir, que la interacción auxina-citocinina promueve la iniciación de la organogénesis directa o indirecta, estimulando la formación de brotes o raíces como se registró en algunos de los resultados de esta investigación.

Es importante mencionar que los tratamientos implementados fueron diseñados con un tiempo corto de inducción (1 mes) y bajas cantidades de ambos RCV (BAP y 2,4-D), ya que en las altas concentraciones de éstos hace que los regenerantes sean susceptibles a cambios genéticos (Domínguez, 2009), además de que se ha observado que las citocininas en altas concentraciones pueden llegar a inducir hiperhidratación del tejido (Kancab, 2016).

Por otra parte, la regeneración de brotes vía organogénesis directa garantiza una alta estabilidad genética, lo que quiere decir que las plántulas obtenidas a través de esta vía serán idénticas a la planta madre (clones), esto en contraste con los regenerantes obtenidos mediante la formación de callo. Dicha inestabilidad puede incrementar si se emplean explantes de tejido no meristemático. Las semillas son una fuente recomendable de explantes para la conservación de la diversidad genética así como para el rescate de poblaciones que están en peligro de extinción (Ayala, 2010; Martínez *et al.*, 2003).

Haciendo énfasis en el efecto *in vitro* del nitrógeno sobre las plantas de agave, Castro *et al.*, 1990 señalan que este elemento es determinante en los procesos de diferenciación de los tejidos en plantas de maguey y que una alta concentración de estos iones puede producir hiperhidratación.

Paralelamente Santíz *et al.*, 2012 en su estudio con *Agave grijalvensis* B. Ullrich reportan que en el tratamiento de medio MS con 100% de sales ningún brote generó raíces, lo cual podría deberse a la hiperhidratación que presentaron los brotes en dicho tratamiento; al contrario del que estaba compuesto por medio MS con 50% de sales, en el cual se no se observaron problemas de hiperhidratación y en donde el enraizamiento fue adecuado. Mientras que Hazra *et al.*, 2002 indujeron la organogénesis indirecta en *A. sisalana* por medio de explantes de tallo, notaron que un aumento de  $\text{NH}_4$  tuvo un impacto negativo en la



formación de callo. Es por lo anterior que en esta investigación se decidió mantener la concentración del medio del cultivo al 50% de sus componentes inorgánicos.

#### 11.4 Enraizamiento y aclimatización

El enraizamiento es crucial en la aclimatización porque asegura la autotrofia de las plantas obtenidas por CTV, esto a través de la absorción de agua y nutrientes. Enríquez *et al.* (2005), mostraron que brotes de *Agave angustifolia* formaron más raíces adventicias y más largas conforme se disminuyó de 100 a 50% la concentración de sales inorgánicas en el medio de cultivo MS. A su vez, Miguel *et al.* (2013) mencionan que en su investigación con *A. americana* los brotes establecidos en medio de cultivo con las sales minerales a 66% de concentración formaron 15% más raíces adventicias respecto a los cultivos con las sales inorgánicas al 100%.

El efecto sobre la formación de raíces en los brotes se podría interpretar en que, aun cuando la auxina desempeña un papel importante para inducir la formación de raíces adventicias, otros factores ambientales, tales como la concentración de sales en el medio de cultivo, influyen en la capacidad de respuesta del material vegetal. Es de resaltar que en los tejidos vegetales se encuentran auxinas endógenas sintetizadas en las hojas jóvenes y el ápice del tallo (Bautista *et al.*, 2020), lo que sugiere que los brotes de *A. potatorum* que formaron raíces posiblemente sintetizaban endógenamente auxinas.

Por otra parte, al término de 60 días después de sembrar a los individuos de *A. potatorum* obtenidos *in vitro*, el porcentaje de supervivencia de las plantas aclimatizadas fue del 71.11%.

Das (1992) reportó resultados semejantes con plantas de *A. sisalana*: estas fueron colocadas en macetas que permanecieron dentro de bolsas durante 15 días, obteniendo porcentajes de supervivencia del 70 al 80%.

Monja & Robert (2013), llevaron a cabo la aclimatización de *A. fourcroydes* colocando las plantas en macetas bajo condiciones de invernadero. Al término de 30 días reportaron una supervivencia del 80%. Martínez *et al.* (2003) obtuvieron el 92% de supervivencia en plantas aclimatizadas de *A. victoriae-reginae*.

Mientras que Domínguez *et al.* (2008), emplearon un protocolo en el que los frascos permanecieron con la tapa floja durante 15 días para promover la adaptación paulatina de los

brotos a las condiciones de humedad del medio externo, y una vez transferidas las plantas al suelo no se les cubrió con ningún tipo de material. En dicho estudio se reportó 60% de supervivencia en *A. karwinski*, 73% en *A. difformis*, 53% en *A. cupreata* y 100% para *A. obscura*.

Es importante que las plantas obtenidas *in vitro* presenten características morfológicas que les permitan sobrevivir, como cantidad y tamaño de las hojas, diámetro del tallo o volumen de la raíz, que influyen en el porcentaje de plantas que sobreviven *ex vitro* (Bautista *et al.*, 2020). Es lo por antes mencionado que para llevar a cabo el proceso de aclimatización, en este estudio se eligieron únicamente plantas con al menos 3 raíces y 3 hojas.

George *et al.* (2007) y Robert *et al.* (2006) mencionan que el cambio de las condiciones *in vitro* a *ex vitro* debe ser gradual, siendo de gran importancia mantener alta la humedad durante varios días, así como una intensidad lumínica baja. Es por esta razón que el protocolo de aclimatización de esta investigación fue diseñado de tal manera que las plantas no recibieran la luz solar directa y el sustrato se mantuviera siempre húmedo.

Sobre esto último, para obtener un alto porcentaje de supervivencia durante la aclimatización es necesario un sustrato poroso, con buen drenaje, retención de humedad y que favorezca un rápido crecimiento radicular sin desecación de la planta. Por lo que en este estudio se optó por utilizar materia orgánica (tierra negra y lombricomposta) que le brinda al sustrato la capacidad de retención de agua, mientras que los componentes con partículas de tamaño relativamente grandes (tepojal) constituyen un sustrato poroso, lo que garantiza la ventilación de las raíces (Sánchez *et al.*, 2020; Vargas, 2017).

La presente investigación y las ya citadas sugieren que para llevar a cabo la aclimatización exitosa de algún miembro del género *Agave*, resulta ser adecuado que éstas no sean expuestas a la luz solar directa durante los primeros días, además de que deben permanecer en un ambiente donde la humedad sea alta.

Un número de los estudios *in vitro* sobre agaves han sido realizados a partir de semillas, desafortunadamente para la mayoría de los agaves que con mayor urgencia requieren de ser propagados por su interés para conservación y/o producción comercial (*A. cupreata*, *A. karwinski*, *A. lurida*, *A. marmorata*), la disponibilidad de semillas es muy baja para la cantidad de plantas que son requeridas. Por ello el CTV es una útil alternativa para

lograr la propagación vegetativa de individuos seleccionados y para la multiplicación de la variabilidad genética presente en las semillas germinadas.

Al mismo tiempo, con la implementación del CTV puede lograrse la propagación de una amplia variedad de especies comercialmente cultivadas así como de especies silvestres con fines de conservación, para su aprovechamiento sustentable y con fines de reforestación como sería recomendable para el caso de *A. potatorum* y de las distintas especies de agaves, de las que se obtienen diversos productos cuya comercialización diversas comunidades dependen económicamente (*A. durangensis*, *A. angustifolia*, *Agave inaequidens*). Es urgente poder establecer procedimientos de cultivo *in vitro* y conjuntarlos con el cultivo convencional en virtud de que los agaves y otras especies amenazadas tienen la capacidad de subsistir en suelos pobres, ambientes de alta temperatura y escasa disponibilidad de agua; con plantas como éstas podríamos tratar de hacer frente a los efectos del cambio climático.

## 12 CONCLUSIONES

El método de desinfección de semillas empleado en la presente investigación permitió establecer asépticamente el 100% de estas. A su vez, la germinación se vio favorecida en condiciones *in vitro*, con un porcentaje de 56.04%, en contraste con las condiciones *ex vitro* (31.87%).

Se observó la presencia de oxidación en los 3 tipos de explantes así como en los 6 diferentes tratamientos empleados en esta investigación (incluyendo el control), por lo que se puede decir que dicho problema es independiente de la presencia de RCV.

Los explantes sembrados en medio de cultivo con RCV (BAP y 2,4-D) indujeron la formación de callo y la respuesta organogénica.

Las combinaciones de BAP 1.5-2 mg/L con 2,4-D 0.5 mg/L indujeron las mayores cantidades de regenerantes, con la formación de 8.1-12.5 brotes por explante dando un total de 228 brotes a 10 meses después del período de inducción. Mientras que entre los tres tipos de explante usados en este estudio, el tallo fue el más viable para lograr la regeneración de *Agave potatorum*.

Se logró el enraizamiento de los brotes regenerados, esto sin requerir la aplicación de RCV.

Se obtuvo más del 70% de supervivencia de las plantas aclimatizadas. La humedad constante del sustrato y la luz solar indirecta posiblemente fueron factores que favorecieron dicha respuesta.

### 13 PERSPECTIVAS

Es recomendable realizar estudios anatómicos de los brotes *in vitro* para así determinar la vía de regeneración que se presentó en la presente investigación.

También se sugiere hacer una comparativa anatómica entre las plantas aclimatizadas y las que se mantienen en los cultivos *in vitro*, esto con la finalidad de observar y documentar los cambios anatómicos que experimentan las plantas a causa del cambio de las condiciones ambientales.

A su vez, se recomienda llevar a cabo estudios a nivel citogenético para poder definir los posibles cambios genéticos del material vegetal cultivado antes de considerar reintroducir a la vida silvestre las plantas propagadas por medio de CTV.

- Abahmane, L. (2017). Cultivar-dependent direct organogenesis of date palm from shoot tip explants. En Al-Khayri, J., Jain, S., Johnson, D. (eds). *Date Palm Biotechnology Protocols Volume I* (pp. 3-15). Nueva York: Humana Press
- Aguilar, D. & Rodríguez, O. (2018). Micropropagación y aclimatación de maguey pitzometl (*Agave marmorata* Roezl) en la Mixteca Poblana. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 20(2), 124-131.
- Aguirre, D. & Eguiarte, L. (2013). Genetic diversity, conservation and sustainable use of Wilde *Agave cupreata* and *Agave potatorum* extracted for mezcal production in Mexico. *Journal of Arid Environments*, 90, 36-44.
- Ahloowalia, B., Prakash, J., Savangikar, V., Savangikar, C. (2004). Plant tissue culture. En Low cost options for tissue culture technology in developing countries (pp. 3-11). Viena, Austria: International Atomic Energy Agency..
- Arzate, A., & Mejía, R. (2011). Capacidad embriogénica de callos inducidos en ejes embrionarios cigóticos de *Agave angustifolia* Haw. *Revista fitotecnica mexicana*, 34(2), 101-106.
- Ayala, L. (2012). Inducción de embriogénesis somática en cultivo *in vitro* de *Agave atrovirens* Karw. Ex Salm-Dyck (Tesis de maestría). Instituto Politécnico Nacional.
- Azofeifa, Á. (2009). Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. *Agronomía mesoamericana*, 20(1), 153-175.
- Bautista, I. (2019). Propagación *in vitro*, aclimatización y desarrollo en vivero de *Agave potatorum* Zucc. (Tesis de maestría). Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca
- Bautista, A., Enríquez, J., Velasco, V., Rodríguez, G. (2020). Enraizado de brotes *in vitro* y aclimatación de plantas de *Agave potatorum* Zucc. *Ecosistemas y recursos agropecuarios*, 7(3).
- Bautista, A. & Martínez, V. (2020). Promoción del crecimiento de *Agave potatorum* Zucc. por bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre. *Terra Latinoamericana*, 38(3), 555-567.
- Bautista, J. & Mascha, A. (2012). Sustentabilidad y agricultura en la región del mezcal de Oaxaca. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 3(1) enero-febrero. 5-20.
- Beyl, C. (1999). Getting started with tissue culture: media preparation sterile technique, and laboratory equipment. En Trigiano, R., & Gray, D. (ed), *Plant tissue culture concepts and laboratory exercises* (pp. 21-38). Estados Unidos: CRC Press.
- Bhatia, S., Sharma, K., Dahiya, R., Bera, T. (2015). Modern applications of plant biotechnology in pharmaceutical sciences. Academic Press. pp:452

- Bhojwani, S. & Dantu, P. (2013). Production of virus-free plants. En *Plant Tissue Culture: An Introductory Text* (pp. 227-243). Springer, India.
- Burwell, T. (1995). Bootlegging on a desert mountain: the political ecology of Agave (*Agave* spp.) demographic change in the Sonora River Valley, Sonora, Mexico. *Human Ecology*, 23: 407–432.
- Calva, C. & Ríos, E. (1999). Cultivo de callos y acumulación de metabolitos secundarios. En: Rodríguez V., Calva C., Ramos R., Salazar M. (Ed.) *Aspectos aplicados de la biotecnología* (pp. 267-301). México: Instituto Politécnico Nacional.
- Carelli, B., & Echeverrigaray, S. (2002). An improved system for the *in vitro* propagation of rose cultivars. *Scientia Horticulturae*, 92(1), 69-74.
- Castañeda, O., Gómez, F., Trejo, L., Morales, V., González, M., Martínez, Y., Pastelín, M. (2014). Aplicaciones del cultivo de tejidos vegetales en caña de azúcar. *Agroproductividad*, 7(2), 18-23.
- Castro, L., Loyola, V., Chan, J., Robert, M. (1990). Glutamate dehydrogenase activity in normal and vitrified plants of *Agave tequilana* Weber propagated *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 22(2), 147-151.
- Chávez, L., Morales, J., Rodríguez, A., Pérez, E. (2021). Propagación *in vitro* de *Agave guiengola* Gentry utilizando medio semisólido y biorreactores de inmersión temporal. *Phyton*, 90 (3), 1003.
- Christianson, M. & Warnik, D. (1988). Organogénesis *in vitro* as a developmental process. *HortScience*. 23(3), 515-519.
- Christianson, M. & Warnick, D. (1985). Temporal requirement for phytohormone balance in the control of organogenesis *in vitro*. *Developmental Biology*, 112(2), 494-497.
- Colunga, S. (2006). Base de datos de nombres técnicos o de uso común en el aprovechamiento de los agaves en México: Anexo 4. Nombres comunes registrados en la BADANAM de los 11 taxa usados en la producción de bebidas destiladas incluidos en el proyecto V029. CS007. Centro de Investigación Científica de Yucatán AC. Informe final SNIB-CONABIO proyecto No. CS007. México.
- Colunga, S., Zizumbo, D., Martínez, J. (2007). Tradiciones en el aprovechamiento de los agaves mexicanos: una aportación a la protección legal y conservación de su diversidad biológica y cultural. En *lo ancestral hay futuro: del tequila, los mezcales y otros agaves*, 248, 229-248
- Concepción, O., Nápoles, L., Pérez, A. T., Peralta, N., Hernández, M., Trujillo, R. (2005). Efecto de tres antioxidantes en el cultivo *in vitro* de ápices de guayaba (*Psidium guajava* L.). Relación

entre el origen del explante y el contenido de compuestos fenólicos. *Cultivos tropicales*, 26(1), 33-39.

CONABIO (2006). Mezcales y Diversidad. Recuperado el 10 de abril del 2020 de [https://www.conabio.gob.mx/v\\_ingles/use/mezcales/mMapa\\_ingles.html](https://www.conabio.gob.mx/v_ingles/use/mezcales/mMapa_ingles.html)

Consejo Regulador del Mezcal (2020). Informe Estadístico 2020. Recuperado el 25 de abril del 2020, de [http://www.crm.org.mx/PDF/INF\\_ACTIVIDADES/INFORME2019.pdf](http://www.crm.org.mx/PDF/INF_ACTIVIDADES/INFORME2019.pdf)

Das, T. (1992). Micropropagation of *Agave sisalana*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 31, 253-255.

Davies, P. & Gan, S. (2012). Towards an integrated view of monocarpic plant senescence. *Russian Journal of Plant Physiology*, 59(4), 467-478.

Davies, P. (1995). The plant hormones: their nature, occurrence and factors in plant physiology, biochemistry and molecular biology. (2a ed). Estados Unidos: Kluwer Academic Publishers

Dávila, C., de la Rosa, L., Pérez, E. (2005). *In vitro* propagation of eight species or subspecies of *Turbincarpus* (Cactaceae). *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 41(4), 540-545.

De Vega, M. (2019). Agaves silvestres y cultivados empleados en la elaboración de mezcal en Sola de Vega, Oaxaca, México. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 22, 477-485.

Delgado, A., Casas, A., Téllez, O. (2014) Distribution, abundance and traditional management of *Agave potatorum* in the Tehuacán Valley, Mexico: bases for sustainable use of non-timber forest products. *Journal Ethnobiology Ethnomedicine* 10: 1-12.

Diario Oficial de la Federación (23 de febrero del 2017). NORMA Oficial Mexicana NOM-070-SCFI-2016, Bebidas alcohólicas-Mezcal-Especificaciones. Recuperado el 25 de abril del 2020, de [https://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5472787&fecha=23/02/2017](https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5472787&fecha=23/02/2017)

Diario Oficial de la Federación (30 de diciembre del 2010). NORMA Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. Recuperado el 28 de abril del 2020 de [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/134778/35.-\\_NORMA\\_OFICIAL\\_MEXICANA\\_NOM-059-SEMARNAT-2010.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/134778/35.-_NORMA_OFICIAL_MEXICANA_NOM-059-SEMARNAT-2010.pdf)

Domínguez, M., Alpuche, A., Vasco, N., Molphe, E. (2008). Efecto de citocininas en la propagación *in vitro* de agaves mexicanos. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 31(4), 317-322.

Enríquez, J. & Castañeda, G. (2005). Sales inorgánicas y ácido indolbutírico en el enraizado *in vitro* de brotes de *Agave angustifolia*. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 28(2), 175-178.



- Enríquez, J., Antonio, K., Rodríguez, G., Campos, G. (2016). Efecto del medio de cultivo y la incubación en las características de plantas de agave micropropagadas. *Ciencia e investigación agraria*, 43(2), 263-272.
- Esparza, E., Violante, J., Monks, S., Cadena, J., Araujo, C., Rössel, E. (2015). Los agaves mezcaleros del altiplano Potosino y Zacatecano. En: Pulido, G, Monks, S., López, M. (ed). Estudios en biodiversidad (pp. 227-245). Nebraska, Estados Unidos: Universidad de Nebraska, Lincon.
- Farwa, N., Hanif, M. A., Majeed, M. I., & Zahid, M. (2018). Role of macronutrients and micronutrients in the growth and development of plants and prevention of deleterious plant diseases-a comprehensive review. *International Journal of Chemical and Biochemical Sciences*, 14, 1-22.
- Flores, A., Chávez, V., Jiménez, M. (2021). Evaluación de una alternativa de propagación de maguey pulquero (*Agave salmiana*) variedad púa larga. *Revista Mexicana de Agroecosistemas*, 8(1) 46-58, 2021
- García, A. (2002). Distribution of agave (Agavaceae) in México. *Cactus and Succulent Journal*, 74(4), 177-188.
- García, A, Ordóñez, M., Briones, M., (2004). Biodiversidad de Oaxaca. Instituto de Biología, UNAM. Fondo Oaxaqueño para la Conservación de la Naturaleza-World Wild Life Fund, México
- García, A. & Franco, I. (2018). Actualización de la información de las especies y subespecies de magueyes de Oaxaca, con énfasis en las especies mezcaleras: Fichas técnicas de los agaves de Oaxaca. UNAM. Instituto de Biología. Informe final SNIB-CONABIO proyecto No. NE012. Ciudad de México
- García, A. (2007). Los agaves de México. *Ciencias* 87, julio-septiembre, 14-23.
- García, A., Franco, I., Sandoval, D. (2019). Cuatro especies nuevas de *Agave* (Asparagaceae, Agavoideae) del sur de México. *Acta botánica mexicana*, (126), 1-18.
- García, E., Méndez, S., Talavera, D. (2010). El género *Agave* spp. en México: principales usos de importancia socioeconómica y agroecológica. *Revista Salud Pública y Nutrición*, 5, 109-129.
- García, E., Romero, A., Nobel, P. (2011). Highlights for *Agave* productivity. *Gcb Bioenergy*, 3(1), 4-14.
- García, R., Quiroz, K., Carrasco, B., Caligari, P. (2010). Cultivo de tejidos vegetales: estado actual, oportunidades y desafíos. *Ciencia e investigación agraria*, 37(3), 5-30.
- George, E., Hall, M., De Klerk, G. (2007). Plant propagation by tissue culture (3a ed.). Estados Unidos: Springer Science & Business Media.

- Geydan, T. & Melgarejo, L. (2005). Metabolismo ácido de las crasuláceas. *Acta Biológica Colombiana*, 10(2), 3-15.
- Giraldo, D. (2017). Una nueva especie de *Agave* (Asparagaceae) de Colombia y una clave taxonómica para las especies sudamericanas. *Caldasia*, 39(1), 33-49.
- Godínez, C., Aguirre, J., Juárez, B., Ortiz, M., Becerra, J. (2016). Extracción y caracterización de fructanos de *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck. *Revista Chapingo serie ciencias forestales y del ambiente*, 22 (1), 59-72.
- Goycokic, V. & Saavedra, G. (2007). Algunos efectos de la salinidad en el cultivo del tomate y prácticas agronómicas de su manejo. *IDESIA*. 25(3): 47-58.
- González, M., González, M., López, I., Reséndiz, L., Tena, J., Retana, F. (2011). El complejo *Agave victoriae-reginae* (Agavaceae). *Acta botánica mexicana*, (95), 65-94.
- Good, S., Souza, V., Gaut, B., Eguiarte, L. (2006). Timing and rate of speciation in *Agave* (Agavaceae). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(24), 9124-9129.
- Grafi, G. (2004). How cells differentiate: a lesson from plants. *Developmental biology*, 268(1), 1-6.
- Guillot, D., Van Der Meer, P., Laguna, E., Rosselló, J. (2008). El género *Agave* L. en la flora alóctona valenciana. *Monografías de la revista Bouteloua*, 3, 1-94.
- Hazra, S., Das, S., Das, A. (2002). Sisal plant regeneration via organogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 70(3), 235-240.
- Hernández, E. (2021). Aumenta saqueo de agaves en la Reserva de la Biósfera Tehuacán-Cuicatlán. Municipios. Recuperado el 27 de Septiembre del 2021 de: <https://municipiospuebla.mx/nota/2021-09-26/tehuac%C3%A1n/aumenta-saqueo-de-agaves-en-la-reserva-de-la-bi%C3%B3sfera-tehuac%C3%A1n-cuicatl%C3%A1n>
- Hicks, G. (1994). Shoot induction and organogenesis *in vitro*: a developmental perspective. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 30(1), 10-15.
- Hussain, A., Qarshi, I., Nazir, H., Ullah, I. (2012). Plant tissue culture: current status and opportunities. *Recent advances in plant in vitro culture*, 37 (3), 5-30.
- Illsley, G., Rivera, G., Albino, T., Morales, P., García, J., Gómez, T. (2004). Biología de los magueyes mezcaleros silvestres. En: Illsley, G. (ed.) Manual de Manejo Campesino de Magueyes Mezcaleros Silvestres (pp. 15-22). Ciudad de México: México. CONABIO, Grupo de Estudios Ambientales AC.

- Ishihara, A., Hashimoto, Y., Tanaka, C., Dubouzet, J., Nakao, T., Matsuda, F., Wakasa, K. (2008). The tryptophan pathway is involved in the defense responses of rice against pathogenic infection via serotonin production. *The Plant Journal*, 54(3), 481-495.
- Kamínek, M. (1992). Progress in cytokinin research. *Trends in Biotechnology*, 10, 159-164.
- Kancab, R. (2016). Diseño de un protocolo para la propagación *in vitro* de *Agave parviflora* Torr. mediante organogénesis directa. (Tesis de Maestría). Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C.
- Leirana, J., Cervera, J., Navarro, J. (2018). Magueyes silvestres de Yucatán. *Ecofronteras*, 22(63), 1-33.
- Ljung, K., Bhalerao, R., Sandberg, G. (2001). Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* during vegetative growth. *The plant journal*, 28(4), 465-474.
- Ljung, K., Hull, A., Celenza, J., Yamada, M., Estelle, M., Normanly, J., Sandberg, G. (2005). Sites and regulation of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* roots. *The Plant Cell*, 17(4), 1090-1104.
- Lozano, M., Menchaca, R., Alanís, J., Pech, J. (2015). Cultivo *in vitro* de yemas axilares de *Vanilla planifolia* Andrews con diferentes citocininas. *Revista Científica Biológico Agropecuaria Tuxpan*, 4(6), 1153-1165.
- Ludwig, J., Sass, S., Sutter, E., Wodner, M., Epstein, E. (1993). Indole-3-butyric acid in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Growth Regulation*, 13(2), 179-187.
- Malda, G. & Ruiz, M. (2004) Comparación del 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.
- Martínez, A. (1998). Evaluación genética y demográfica de *Agave victoriae-reginae* T. Moore y aplicación del cultivo de tejidos para su conservación (Tesis de Doctorado) Universidad Nacional Autónoma de México.
- Martínez, A., Ortega, M., Chávez, V., Bye, R. (2003). Somatic embryogenesis and organogenesis of *Agave victoriae-reginae*: Considerations for its conservation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 74(2), 135-142.
- Medina-van, P., Parra, V., Leirana, J. (2016). Recursos florales y colibríes durante la época seca en la Reserva de la Biosfera Ría Lagartos, Yucatán, México. *Huitzil*, 17(2), 244-250.
- Michel, C. (2010). Caracterización cuantitativa de los carbohidratos no estructurales del maguey mezcalero potosino (*Agave salmiana*). (Tesis de Maestría). Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

- Miguel, M., Enríquez, J., Velasco, V., Villegas, Y., Carrillo, J., Rodríguez, G. (2013). Composición del medio de cultivo y la incubación para enraizar brotes de *Agave*. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 4(SPE6), 1151-1159.
- Monja, K. & Robert, M. (2013) Direct somatic embryogenesis of *Agave fourcroydes* Lem. through thin cell layer culture. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 49(5), 541–549.
- Morales, R. (2008). Ingeniería básica de una planta para la industria del Mezcal en Mitla, Tlacolula, Oaxaca (Tesis de maestría). Instituto Politécnico Nacional.
- Mosqueda M, Cárcamo R, Aguilar D, Bello J. 2022. Micropropagation of *Agave (Agave potatorum* Zucc.) through Direct Organogenesis. *Agrociencia*, 56(6), 1-10.
- Mroginski, L., Sansberro, P., Flaschland, E. (2010). Capítulo 1: Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales. En Levitus, G., Echenique, V., Rubinstein, C., Hopp, E., Mroginski, L. (eds), *Biotecnología y mejoramiento vegetal II*. (pp. 17-25). Argentina: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.
- Murashige, T. & Skoog, F., (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant*, 15(3), 473–497.
- Negrete, L., del Villar, P., Rodríguez, A. (2010). Extracción de fibras de agave para elaborar papel y artesanías. *Acta universitaria*, 20(3), 77-83.
- Nikam, T. (1997). High frequency shoot regeneration in *Agave sisalana*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 51(3), 225-228.
- Nikoloff, N. (2015). No siempre sale todo bien... problemas de Cultivo de Tejidos Vegetales. En Sharry, S., Adema, M., & Abedini, W. (ed), *Plantas de probeta: Manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos in vitro* (pp. 102-112). La Plata, Argentina: Editorial de la Universidad Nacional de La Plata.
- Orea, G., Cifuentes, A., Gómez, S., Hernández Vargas, V. (2006). Germinación de semillas (*Agave durangensis*) a diferentes temperaturas y efecto de la fertilización en el desarrollo de las plántulas. *Vidsupra*, 1(2), 51-56.
- Oronoz, M., Roaro, D., Rodriguez, I. (1983). *Tratado elemental de Botánica*. México: Editorial Científica Latino Americana Laríos.
- Palma, F., Pérez, P., Meza, V. (2016). Diagnóstico de la Cadena de Valor Mezcal en las Regiones de Oaxaca. COPLADE Oaxaca. 83 pp.
- Petrasek, J., Hoyerova, K., Motyka, V., Hejatko, J., Dobrev, P., Kaminek, M., Vankova, R. (2019). Auxins and cytokinins in plant development. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(4), 909.

- Quintero, I., Polo, J., Jarma, A., Espitia, A. (2003). Enraizamiento *in vitro* de *Dioscoreas* sp. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 5(2), 51-56.
- Rabenda, I. (1990). Breaking dormancy in cactus seed. Part 1 *Cact. & Succ. J. (U.S.)* 62(2):86±94.
- Rangel, S., Hernández, E., Hernández, M. (2016). Micropropagación de variedades de caña de azúcar cultivadas en México. *Revista fitotecnia mexicana*, 39(3), 225-231.
- Raghavendra, A., Gonugunta, V., Christmann, A., Grill, E. (2010). ABA perception and signalling. *Trends in Plant Science* 15(7): 395-401.
- Reyes, S. (2009). Conservación y restauración de cactáceas y otras plantas suculentas mexicanas: Manual práctico. México: SEMARNAT, CONAFOR.
- Rivera, B. (2015). Cultivo *in vitro* con fines de conservación de *Agave victoriae-reginae* T. Moore (Agavaceae), (Tesis de Licenciatura), Universidad Nacional Autónoma de México.
- Robert, M., Herrera, J., Castillo, E., Ojeda, G., Herrera, M. (2006). An efficient method for the micropropagation of *Agave* species. En: Loyola, V. & Vázquez, F. (ed). *Plant Cell Culture Protocols* (318) (2a ed.) (pp. 165-178). Nueva Jersey, Estados Unidos: Humana Press Inc.
- Roca, W. & Mroginski, L. (1991). Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales *in vitro*. En Roca, W., & Mroginski, L. (ed.). *Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones* (pp.19-40). Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical
- Rocha, M., Good, S, Molina, F., Arita, H., Castillo, A., García, A., Eguiarte, L. E. (2006). Pollination biology and adaptive radiation of Agavaceae, with special emphasis on the genus *Agave*. *Aliso: A Journal of Systematic and Evolutionary Botany*, 22(1), 329-344.
- Rodríguez B., Gutiérrez, A., Acosta, B. (1996). Somatic embryogenesis of *Agave victoria-reginae* Moore. *Plant Cell, tissue and organ culture*, 46(1), 85-87.
- Rodríguez, A., Acevedo, G., Rodríguez, J., Rodríguez, B., Cervantes, J., Castellanos, O. (2011). Effect of light quality and culture medium on somatic embryogenesis of *Agave tequilana* Weber var. Azul. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 104(2), 271-275.
- Rodríguez, A., Rodríguez, A., Quintero, S., Torres, M., Fundora, Z. (2004). Influencia de los medios de cultivo en la micropropagación de plátano (*Musa* spp.) y malanga (*Xanthosoma sagittifolium* Schott.). *Cultivos Tropicales*, 25(1), 23-26.
- Romero, J., Parra, F., Cano, I., Rodríguez, E., Rios, J., Fuentes, R., Ramirez, J. (2007). Biosorción de Pb (II) por biomasa de *Agave tequilana* Weber (agave azul). *Revista mexicana de ingeniería química*, 6 (3), 295-300.

- Rosas, M., la Rosa, D., Monroy, M., Goldammer, K., Chávez, V. (2001). Micropropagation of *Turbnicarpus laui* Glass et Foster, an endemic and endangered species. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 37(3), 400-404.
- Sánchez, M., Sánchez, C., Villanueva, C., Gil, I., Jiménez, M., Sánchez, I. (2009). Multiplicación *in vitro* vía organogénesis en calabaza. *Agronomía mesoamericana*, 20(1), 11-22.
- Sánchez, A., Coronel-Lara, Z., Gutiérrez, A., Vargas, G., Coronado, M. L., & Esqueda, M. (2020). Aclimatación y trasplante de vitroplantas de *Agave angustifolia* Haw. en condiciones silvestres. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 11(7), 1593-1605.
- Santacruz, F., Gutiérrez, H., Rodríguez, B. (1999) Efficient *in vitro* propagation of *Agave parrasana* Berger. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 56:163–167.
- Santíz, J., Rincón, R., Gutiérrez, F. (2012). Propagación *in vitro* de *Agave grijalvensis* B. Ullrich, una especie endémica de Chiapas bajo protección especial. *Gayana Botánica*, 69(especial), 23-30.
- Scheinvar, G. (2008). Genética de poblaciones silvestres y cultivadas de dos especies mezcaleras: *Agave cupreata* y *Agave potatorum* (Tesis de Maestría). Universidad Nacional Autónoma de México.
- Schwarz, O., Sharma, M., Beaty, R. (2004). Propagation from nonmeristematic tissues: organogenesis. En: Trigiano, R & Gray, D. (Ed.) *Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises* (pp: 95-104). Nueva York: CRC Press.
- Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (25 de marzo del 2017). Aumenta 35 por ciento la exportación de mezcal “Hecho en México”. Recuperado en : 25 de abril del 2020 de <https://www.gob.mx/agricultura/prensa/aumenta-35-por-ciento-la-exportacion-de-mezcal-hecho-en-mexico>
- Skoog, F. & Miller, C. (1965). Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. En: Bell, E. (ed.). *Molecular and cellular aspects of development* (pp. 481-494). Nueva York, Estados Unidos: Harper and Row.
- Solis, L., Olivera, S., La Rosa, L., Rafael, S. (2011). Propagación *in vitro* de *Carica papaya* var. PTM-331 a partir de meristemos apicales. *Revista peruana de biología*, 18(3), 343-348.
- Suárez, A., Saldaña, T., Velázquez, M. (2016). El cultivo de maguey pulquero: opción para el desarrollo de comunidades rurales del altiplano mexicano. *Revista de Geografía Agrícola*, (56), 33-44.
- Suárez, I. & Salgado, J. (2008). Propagación *in vitro* de *Stevia rebaudiana* Bert. (Asteraceae-Eupatoriaceae) a través de organogénesis. *Temas Agrarios* 13(1):33-40.
- Suárez, I. (2020). Cultivo de Tejidos Vegetales. Colombia: Fondo Editorial Universidad de Córdoba

- Sugiyama, M. (1999). Organogenesis *in vitro*. *Current opinion in plant biology*, 2(1), 61-64.
- Tejavathi, D., Rajanna, M., Sowmya, R., Gayathamma, K. (2007). Induction of somatic embryos from cultures of *Agave vera-cruz* Mill. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 43(5), 423-428.
- Trejo, R., Eguiarte, L., Suro, D., Medellin, R. (2016). Save our bats, save our tequila: industry and science join forces to help bats and agaves. *Natural Areas Journal*, 36(4), 523-530.
- Torres, I., Casas, A., Delgado A., Rangel-Landa, S. (2016). Aprovechamiento, demografía y establecimiento de *Agave potatorum* en el Valle de Tehuacán, México: Aportes ecológicos y etnobiológicos para su manejo sustentable. *Zonas Áridas*, 15(1), 92-109.
- Ugarte, C., Villarroel, C., Aguirre, G., State, M. (2016). Medios de Cultivo. Aplicación del cultivo de tejido en la multiplicación y conservación de los recursos fitogenéticos. Aguirre Villarroel, G., Baudoin, J. P., & Leigue Arnéz, L. (ed). Universidad Mayor de San Simón, Facultad de Ciencias Agrícolas, Pecuarias, Forestales y Veterinarias, Bolivia. pp: 77-88.
- Valenzuela, K. (2006). Desarrollo de tecnologías para la regeneración *in vitro* y transformación genética de maguey (*Agave tequilana* Weber, var. azul) (Tesis de doctorado). Instituto Politécnico Nacional.
- Valenzuela, K., Juárez, R., Cruz, A., Olalde, V., Valverde, M, Paredes, O. (2006). Plant regeneration of *Agave tequilana* by indirect organogenesis. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 42(4), 336-340.
- Vargas, A. (2017). Micropropagación de *Agave guiengola* Gentry, especie endémica amenazada del estado de Oaxaca, México. (Tesis de licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México.
- Vázquez, N. (2015). Variación morfológica y genética de *Agave karwinskii* (Agavaceae) en los estados de Oaxaca y Puebla (Tesis de maestría). Universidad Nacional Autónoma de México.
- Velasco, E., Zamora, H., Espinosa, C., Sampayo, F., Moreno, S. (2009). Modelos Predictivos para la Producción de Productos Forestales No Maderables: Agaves Mezcaleros: Manual Técnico Núm. 3. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias.
- Vicente, R. & Del Real, J. (2007). Métodos de propagación del *Agave tequilana* Weber var. Azul. En Vicente, R. & Del Real, J. (ed). Conocimiento y prácticas agronómicas para la producción de *Agave tequilana* Weber, en la zona de denominación de origen del tequila. (pp: 59-67). Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional del Pacífico Centro.
- Villareal, B (2015). ¿Cómo se forman los nuevos órganos *in vitro*? Morfogénesis *in vitro*. Organogénesis. Embriogénesis somática. En Sharry, S., Adema, M., Abedini, W. (ed.)

Plantas de probeta: manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos in vitro. Argentina: Editorial de la Universidad de La Plata.

Villarroel, C. & Cadima, X. (2016). Micropropagación de plantas. Aguirre Villarroel, G., Baudoin, J. P., & Leigue Arnéz, L. (ed). Universidad Mayor de San Simón, Facultad de Ciencias Agrícolas, Pecuarias, Forestales y Veterinarias, Bolivia. pp: 89-104.

Wang, S., & Schiefelbein, J. (2014). Regulation of cell fate determination in plants. *Frontiers in plant science*, 5, 368.

Yong, J., Ge, L., Ng, Y., Tan, S. (2009). The chemical composition and biological properties of coconut (*Cocos nucifera* L.) water. *Molecules*, 14(12), 5144-5164.

Zhao, Y. (2008). The role of local biosynthesis of auxin and cytokinin in plant development. *Current opinion in plant biology*, 11(1), 16-22.

Zhuravlev, Y. & Omelko, A. (2008). Plant morphogenesis *in vitro*. *Russian journal of plant physiology*, 55(5), 579.



**Anexo 1.** Componentes del medio de cultivo Murashige & Skoog

<b>Componente</b>	<b>Nombre/fórmula química</b>	<b>Concentración (g/l)</b>
Macronutrientes	$(\text{NH}_4) \text{NO}_3$	1.65
	$\text{KNO}_3$	1.9
	$\text{MgSO}_4 * 7\text{H}_2\text{O}$	0.37
	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.17
	$\text{CaCl}_2 * 2\text{H}_2\text{O}$	0.44
Micronutrientes	$\text{MnSO}_4 * \text{H}_2\text{O}$	0.01689
	$\text{ZnSO}_4 * 7\text{H}_2\text{O}$	0.0086
	$\text{H}_3\text{BO}_3$	0.0062
	$\text{KI}$	0.00083
	$\text{NaMoO}_4 * 2\text{H}_2\text{O}$	0.00025
	$\text{CuSO}_4 * 5\text{H}_2\text{O}$	0.000025
	$\text{CoCl}_2 * 6\text{H}_2\text{O}$	0.000025
FeEDTA	$\text{FeSO}_4 * 7\text{H}_2\text{O}$	0.0278

	Na <sub>2</sub> EDTA	0.0373
Vitaminas	Tiamina	0.0001
	Ácido nicotínico	0.0005
	Piridoxina * HCl	0.0005
Inositol	-	0.10
Glicina	-	0.002
Sacarosa	C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	30
Agente gelificante	Agar bacteriológico	8.5