



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“EL AGAVE TOBALÁ, SU IMPORTANCIA EN LA PRODUCCIÓN DEL MEZCAL
Y SU MICROPROPAGACIÓN”.**

TRABAJO MONÓGRAFICO DE ACTUALIZACIÓN

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA

FÁTIMA JARA FILIO

TUTOR

ING. TERESA DE JESÚS OLIVERA FLORES



CDMX

AÑO 2024



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO



**PROTESTA UNIVERSITARIA DE INTEGRIDAD Y
HONESTIDAD ACADÉMICA Y PROFESIONAL
(Titulación o Graduación sin trabajo escrito)**

De conformidad con lo dispuesto en los artículos 87, fracción V, del Estatuto General, 68, primer párrafo, del Reglamento General de Estudios Universitarios y 26, fracción I, y 35 del Reglamento General de Exámenes, me comprometo en todo tiempo a honrar a la Institución y a cumplir con los principios establecidos en el Código de Ética de la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente con los de integridad y honestidad académica.

En consecuencia, acepto que la falta de cumplimiento de las disposiciones reglamentarias y normativas de la Universidad, en particular las ya referidas en el Código de Ética, llevará a la nulidad de los actos de carácter académico administrativo del proceso de titulación/graduación.

Atentamente

Fátima Jara Filio
No. Cuenta 109002286

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **NAVARRO OCAÑA ARTURO**
VOCAL: **OLIVERA FLORES TERESA DE JESÚS**
SECRETARIO: **MONTIEL PACHECO CARMINA**
1er. SUPLENTE: **LEÓN FELIX MARCO ANTONIO**
2° SUPLENTE: **PAZ LEMUS ESMERALDA**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA

LABORATORIO 116- LABORATORIO DE CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES,
DEPTO. DE BIOQUÍMICA, CONJUNTO E, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.

ASESORA DEL TEMA

TERESA DE JESÚS OLIVERA FLORES

SUSTENTANTE

FÁTIMA JARA FILIO

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	4
ÍNDICE DE TABLAS.....	5
ÍNDICE DE GRÁFICAS	5
I. RESUMEN.....	6
II. INTRODUCCIÓN.....	8
III. OBJETIVOS.....	9
Objetivo general	9
Objetivos particulares.....	9
Capítulo 1. El agave tobalá (<i>A. potatorum</i>).....	10
1.1 Aspectos generales del género Agave	10
1.1.1 Características sobresalientes de los agaves	11
1.2 Clasificación taxonómica y descripción botánica.....	11
1.2.1 Presentación del género agave.....	11
1.2.2 Metabolismo de las plantas de agave	12
1.2.3 Importancia de la reserva genética del agave	13
1.3 Centro de origen y distribución geográfica	14
1.3.1 Distribución del género agave en la república mexicana	14
1.3.2 Relevancia cultural y social del agave en México	14
1.4 Importancia alimenticia y económica.....	15
1.4.1 Usos y aplicaciones de las plantas de agave.....	15
1.5 El agave tobalá.....	16
1.5.1 Descripción botánica y distribución geográfica de <i>A. potatorum</i>	16
1.5.2 Principales aspectos de <i>A. potatorum</i> (Agave tobalá).....	17
1.6 Problemática de la explotación de la especie.....	19
1.6.1 La agricultura de <i>A. potatorum</i> y madurez reproductiva de la especie...	19
1.7 Elaboración del mezcal.....	20
1.7.1 Las especies de agave como materia prima para su obtención.....	20
Capítulo 2. El mezcal.....	21
2.1 Definición de Mezcal	21
2.1.1 Proceso de elaboración del mezcal.....	21
2.1.2 Especies de agave empleadas en la elaboración de bebidas alcohólicas	22
2.1.3 Tipos de mezcal.....	23
2.2 La producción de mezcal.....	24
2.2.1 Aseguramiento de la calidad del mezcal	24
2.2.2 Clasificación del mezcal	24
2.2.3 Selección del agave para la producción de mezcal	25
2.2.4 El problema de la extracción de ejemplares silvestres.....	25
2.3 Producción del mezcal en México	26
2.3.1 Denominación de Origen.....	26
2.3.2 Legislación y regulación del mezcal.....	26
2.3.3 La certificación oficial del mezcal	26
2.3.4 La cadena productiva del Maguey-Mezcal	27
2.4 La producción del mezcal y otros destilados	28

2.4.1 Especies de agave utilizadas para producir bebidas alcohólicas.....	28
2.4.2 Presentación de los diferentes destilados de agave en México	29
2.5 Diferencia entre Mezcal y Tequila	39
2.6 El agave y el mezcal.....	39
2.6.1 Diversidad de especies agave para elaborar mezcal	39
2.6.2 La maduración del agave para la producción de mezcal	41
2.6.3 Racionalidad en el sistema de cultivo tradicional	42
2.7 Impacto Económico	42
2.7.1 Las industrias que utilizan plantas de agave	42
2.8 Producción y exportación del Mezcal	44
2.8.1 Principales exportaciones	44
2.8.2 Relevancia en el mercado internacional de bebidas alcohólicas	47
2.8.3 El crecimiento en la producción de mezcal	49
2.9 Proyección a futuro.....	51
2.9.1 Resultados del crecimiento en ventas y exportación.....	51
Capítulo 3. Reproducción de <i>A. potatorum</i> y otros Agaves: Sistema tradicional y por CTV como alternativa	53
3.1 Reproducción y propagación de los Agaves	53
3.1.1 Aspectos generales de la reproducción natural en las especies de agave	53
3.2 Formas de propagación convencional de agaves	54
3.2.1 Mecanismos de reproducción natural.....	54
3.2.2 Propagación sexual en plantas de agave.....	54
3.2.3 Propagación asexual (bulbillos e hijuelos) en plantas de agave	55
3.2.4 Propagación del agave en campo y producción de nuevas plantas.....	56
3.3 Reproducción sexual por semilla del <i>A. potatorum</i>	57
3.3.1 Tipo o vía de reproducción natural de <i>A. potatorum</i>	57
3.3.2 Desventajas de la reproducción sexual (por semilla) para <i>A. potatorum</i>	58
3.3.3 Importancia de la propagación por semillas	58
3.3.4 El concepto de viabilidad de las semillas	59
3.4 Las semillas del agave <i>potatorum</i>	60
3.4.1 Tipos de semillas y su clasificación.....	60
3.4.2 Periodo de vida de las semillas.....	60
3.4.3 El tamaño de las semillas.....	61
3.4.4 Descripción general de las semillas de <i>A. potatorum</i>	61
3.4.5 Importancia de las semillas y otra alternativa para la supervivencia de <i>A. potatorum</i>	63
3.5 El Cultivo de Tejidos como una alternativa para la propagación	63
3.5.1 El concepto del Cultivo de Tejidos Vegetales y sus principios básicos ..	63
3.5.2 La implementación del CTV para la propagación <i>in vitro</i> de agaves.....	65
3.6 Antecedentes sobre la aplicación de la biotecnología en el género Agave ..	65
3.6.1 El concepto de biotecnología y el CTV.....	65
3.6.2 Uso de las herramientas de la biotecnología vegetal en el CTV	65
3.6.3 Etapas de la micropropagación en un laboratorio de CVT	71
3.6.4 Obtención de brotes de agave por medio de la propagación <i>in vitro</i>	71
3.6.5 Proceso de enraizado del agave por medio de la propagación <i>in vitro</i> ..	72
3.6.6 Traslado de una planta de agave micropropagada a un invernadero	73

3.6.7 Aclimatización de las plantas de agave micropropagadas e importancia del sustrato.....	73
3.7 Aplicaciones del cultivo <i>in vitro</i> en plantas	74
3.7.1 Propagación <i>in vitro</i> por CTV	74
3.7.2 Conservación de tejidos vivos y bancos de germoplasma	74
3.7.3 Desarrollo de protocolos de micropropagación para especies silvestres de agave	75
3.8 La micropropagación	76
3.8.1 El principio de la propagación <i>in vitro</i> o micropropagación de plantas...76	
3.8.1 Ventajas del uso de la micropropagación.....	77
3.9 Etapas del proceso de Micropropagación	77
3.9.1 Etapa 0: Preparación de la planta madre (donadora de explantes)	77
3.9.2 Etapa I: Establecimiento aséptico e inducción a la diferenciación morfológica.....	78
3.9.3 Componentes del medio de cultivo	79
3.9.4 Etapa II: Multiplicación de brotes adventicio o embriones somáticos.....	80
3.10 Vías de Regeneración	81
3.10.1 Principio de regeneración celular por medio de la micropropagación ..81	
3.10.2 Organogénesis.....	82
3.10.3 Embriogénesis	83
3.10.4 Etapa III: Alargamiento, acondicionamiento y enraizamiento <i>in vitro</i> ...84	
3.10.5 Etapa IV: enraizamiento <i>ex vitro</i> y aclimatización de las plantas	85
3.11 Innovaciones biotecnológicas de los agaves mezcaleros	86
3.11.1 Sistemas de Inmersión Temporales.....	86
3.11.2 Marcadores moleculares	88
3.11.3 Biotecnología de Alimentos.....	89
Capítulo 4. Costos de producción de la micropropagación del <i>Agave potatorum</i> ..90	
4.1 El análisis de costos como una herramienta para el CTV	90
4.1.1 Costos directos e indirectos	90
4.1.2 Descripción del proceso para la micropropagación de <i>A. potatorum</i>	91
4.2 Etapas de la micropropagación de <i>A. potatorum</i>	91
4.3 Determinación de los costos directos e indirectos.....	95
4.4 Resultados de los costos por unidad y comparación con los precios del mercado	99
IV. CONCLUSIONES.....	103
V. REFERENCIAS	105

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.0. Morfología, composición y estructura de una planta de agave.....	10
Figura 1.1. Esquema metabolismo CAM característico de la familia Agavaceae ..	12
Figura 1.2. Anatomía del agave (Esparza-Ibarra <i>et al.</i> , 2015)	13
Figura 1.3. Distribución de los agaves en México (CONABIO, 2006).....	15
Figura 1.4. Agave potatorum Zucc (Convite Mezcal, 2020).....	17
Figura 1.5. Anatomía de A. potatorum (Biodiversity Heritage Library, 2018).....	18
Figura 2.0. Diagrama de bloques con las operaciones realizadas para la elaboración de mezcal artesanal. Adaptado de: CIATEJ, 2014.....	22
Figura 2.1. Mapa de actores clave del sistema producto maguey-mezcal (artesanal/industrial) (Palma <i>et al.</i> , 2016).....	28
Figura 2.2. Ubicación del sitio de elaboración de los distintos destilados de agave en la república mexicana (Pinterest, 2021).....	39
Figura 2.3 Molecula de inulina (Justo <i>et al.</i> , 2001)	40
Figura 2.4. Producción de mezcal por año del 2011-2022 (COMERCAM, 2023) ..	49
Figura 2.5. Producción de mezcal por categoría (COMERCAM, 2023).....	50
Figura 2.6. Producción nacional de mezcal por clase (COMERCAM, 2023)	50
Figura 2.7. Producción nacional por especie de agave (maguey) (COMERCAM, 2023)	51
Figura 3.0. Morfología de la planta y formas de reproducción natural de algunas especies del género Agave.....	54
Figura 3.1. Forma de reproducción asexual del agave, formación de hijuelos (León, 2014).	57
Figura 3.2. Prueba de viabilidad de semillas (SNICS, 2018)	60
Figura 3.3. Semilla seleccionada, las semillas negras son fértiles y las blancas infértiles	61
Figura 3.4. Germinación de semillas de A. potatorum (Ortiz-Hernández, 2020)....	63
Figura 3.5. Embriogénesis somática de A. salmiana	70
Figura 3.6. Organogénesis directa de Agave maximiliana Baker	71
Figura 3.8. Respuesta de morfogénesis por vías de regeneración en especies de agave, inducidas por explantes como una hoja y tejidos provenientes de meristemas	82
Figura 3.9. Embriogénesis somática indirecta de la especie A. angustifolia Haw..	84
Figura 3.10. SIT SETIS.....	87
Figura 4.0. Esquema de micropropagación del Agave tobalá (Jara, 2020)	92

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.0. Características sobresalientes de <i>Agave tobalá</i>	19
Tabla 2.0. Tipo de destilados Tequila y Mezcal y especies de agaves utilizadas como materia prima	29
Tabla 2.1. Destilados de agave elaborados en México con Denominación de Origen.....	30
Tabla 2.2. Principales diferencias entre el Tequila y el Mezcal.....	39
Tabla 2.3. Estimaciones y crecimiento económico del Mezcal y el Tequila.....	44
Tabla 2.4. Denominación de Origen de Tequila y Mezcal	45
Tabla 2.5. Distribución de la disponibilidad de Tequila y Mezcal en México (miles de litros). Adaptado de SAGARPA, 2017.	45
Tabla 2.6. Destinos de Exportaciones del Mezcal	46
Tabla 2.7. Reconocimiento de países a la denominación de origen de bebidas espirituosas destiladas de agave.....	48
Tabla 3.0. Composición química en promedio de las semillas de <i>A. potatorum</i>	62
Tabla 3.1. Antecedentes sobre el cultivo y propagación <i>in vitro</i> de especies del género agave.....	66
Tabla 3.2. Clasificación de reguladores de crecimiento y su aplicación en el cultivo de tejidos vegetales	80
Tabla 4.0. Etapas y objetivos para la micropropagación de <i>A. potatorum</i>	93
Tabla 4.1. Clasificación de gastos variables y gastos fijos en el proceso de propagación <i>in vitro</i> de <i>A. potatorum</i>	95
Tabla 4.2. Calendarización de acuerdo con el protocolo de micropropagación del <i>Agave potatorum</i>	97
Tabla 4.3. Costo por unidad de planta de <i>A. Potatorum</i> , ventajas y desventajas, en comparación con otros costos del mercado para esta misma especie.....	100

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1.0. Estacionalidad de Exportaciones de Mezcal.....	46
Gráfica 2.0. Principales exportadores mundiales de bebidas espirituosas	47

I. RESUMEN

El mezcal se ha convertido en uno de los productos más representativos de México a nivel internacional, ya que su carácter artesanal y sus diferentes presentaciones lo han convertido en una bebida altamente demandada. De acuerdo con el informe estadístico elaborado por la COMERCAM (2023), la tasa de crecimiento de la producción del 2022 aumento en un 74.89% respecto al año anterior, de igual manera la producción a nivel nacional de mezcal referido a 45% Alc. Vol equivale a 14, 165, 505 litros. En tanto, las exportaciones de mezcal envasado tuvieron un crecimiento del 67.43% respecto al año 2022, con 8, 543, 324 litros exportados, y su demanda sigue en aumento (COMERCAM, 2023).

El mezcal es una bebida alcohólica que se obtiene de la destilación del jugo fermentado de las cabezas o piñas de diferentes especies de agaves, los más utilizados son: *Agave angustifolia* Haw, *Agave semmaniana. Jacobi*, *Agave rhodacantha* Tre, *Agave karwinskii* Zucc. *Agave marmorata*, *Agave americana* var. *americana* Linneo, *Agave americana* var. *oaxacensis* Gentry, *Agave convall* y *Agave potatorum* Zucc. Aun cuando son muchas las especies de donde se puede obtener el mezcal, la alta demanda de este destilado pone en peligro de extinción a las poblaciones silvestres de estas especies ya que no existe una planeación en su cultivo y, por lo tanto, no hay plantaciones a nivel comercial de su explotación (López *et al.*, 2018).

El *Agave potatorum* es una especie de vida silvestre que no es cultivada de manera comercial, pero es sobreexplotada para la producción del mezcal; el cual alcanza altos precios por su sabor y poca disponibilidad, ya que su forma de reproducción es sexual y su distribución se limita a zonas marginales de Oaxaca y Puebla. La especie es extraída de su hábitat y todo esto, hace que la especie se encuentre amenazada. Una alternativa es la utilización de técnicas biotecnológicas para una reproducción intensiva y su conservación, además de evitar la pérdida de la variabilidad genética. El Cultivo de Tejidos Vegetales permite la obtención de clones libres de patógenos y una producción intensiva en menor tiempo, y con mayor

número de plantas que los sistemas tradicionales, además se puede realizar en espacios reducidos y con material biológico (semillas) seleccionado con características sobresalientes y clonarlos sin necesidad de extraer de su hábitat ejemplares. La micropropagación *in vitro* está basada en la propagación asexual de plantas, en la que se toman segmentos de una planta madre (hoja, tallo, semillas, raíces ápices, meristemas, etc.) para la regeneración de plantas completas genéticamente idénticas. En agaves mezcaleros se han reportado algunos casos de éxito utilizando técnicas de cultivo *in vitro* (Espinosa-Leal *et al.*, 2018)

El presente trabajo se plantea como objetivo general, la revisión de literatura sobre la importancia del género agave en México, como la planta *A. potatorum* Zucc o maguey tobalá, la cual pertenece al mismo, para destacar como los agaves o magueyes son la base para la elaboración de mezcal, la bebida destilada de agave más ancestral, por lo que se mencionará su proceso y producción, así como los componentes de la cadena productiva del mezcal, de igual forma se abordará la parte de legislación por la relevancia que tiene el mezcal en cuanto a su denominación de origen y nivel de exportación como bebida espirituosa, ya que, ésta va relacionada con la variedad de destilados que se elaboran a partir de diversas especies de agave empleadas como materia prima en la república mexicana, por otro lado, se analizará como se lleva a cabo la reproducción de plantas de *A. potatorum*, ya sea de forma tradicional (natural) o a través de sistemas biotecnológicos, como lo es el cultivo de tejidos vegetales, y se mostrarán las diferencias significativas entre ambos sistemas. Finalmente, se llevará a cabo un ejercicio sobre los costos de producción para la obtención de nuevas plantas de *A. potatorum* por medio de la propagación *in vitro* en un laboratorio de cultivo de tejidos vegetales, teniendo como base un protocolo especializado para su micropropagación.

II. INTRODUCCIÓN

El género agave pertenece a la familia Agaveceae, y México es el centro de origen y diversidad, por lo mismo, el territorio nacional tiene diversificación y endemismo del género (Gentry, 1982., García-Medoza,1995., Vázquez-García *et al.*, 2007.). Gracias a la antigua y colaborativa relación entre las poblaciones humanas y las plantas de agave, hay especies que tienen una importancia regional, nacional e internacional, debido a sus múltiples usos y aporte económico.

Una de las especies de *agave* mezcalero de mayor importancia económica y cultural es el *Agave potatorum* (conocido como tobalá), endémico de Puebla y Oaxaca, que lamentablemente es extraído de comunidades vegetales silvestres, una particularidad es que esta especie no lleva a cabo una reproducción vegetativa (asexual), además, los ejemplares silvestres de esta especie se extraen de los valles Centrales de Oaxaca, generalmente cuando se encuentran en etapa reproductiva y generan semillas, lo que lo vuelve vulnerable ya que, disminuyen las poblaciones de esta especie, afectando también a la producción de nuevas plantas (Torres *et al.*, 2015).

La biotecnología vegetal y específicamente la técnica de cultivo de tejidos vegetales, actualmente, se presenta como una alternativa para la conservación de agaves (Rubluo *et al.*, 1993., Martínez-Palacios *et al.*, 2003), y la micropropagación de los mismos, la cual consiste en reproducir o propagar plantas silvestres y de interés económico, aplicando las técnicas de cultivo *in vitro*, una de sus mayores ventajas, es la rápida multiplicación a gran escala y la producción de plantas sin enfermedades (Ewaid y Kretzschmar,1996).

III. OBJETIVOS

Objetivo general

Analizar el estado del arte del *Agave potatorum* Zucc. (tobalá), y las posibilidades que se tienen para poder reproducirlo por medio de técnicas biotecnológicas, al igual que, conocer el potencial de esta especie como materia prima para la elaboración de mezcal, el impacto económico que genera la producción de este destilado, y su aplicación en una de las industrias más crecientes de los últimos años, la industria mezcalera en México.

Objetivos particulares

- Implementar una búsqueda sistemática para abarcar de manera general y particular aspectos relacionados con el género agave para la producción de mezcal.
- Generar la información necesaria para ser un referente en el tema del *Agave potatorum* Zucc o maguey tobalá.
- Evaluar los costos de producción para la obtención de nuevos ejemplares de agave tobalá por medio de la micropropagación, tomando como base las técnicas de cultivo de tejidos vegetales (CTV).

Capítulo 1. El agave tobalá (*A. potatorum*)

En este capítulo se busca dar a conocer los aspectos generales del género Agave, su clasificación taxonómica, descripción botánica, así como sus usos e importancia económica. Asimismo, se presenta la información más importante de la especie *A. potatorum*, como su taxonomía, su descripción botánica, centro de origen y distribución geográfica, al igual que la problemática a la que está sujeta esta especie.

Abreviaturas: ADN (ácido desoxirribonucleico), CAM (del inglés *Crassulacean Acid Metabolism*), cm (centímetros), CONABIO (Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad), CO₂ (dióxido de carbono), Ha (hectáreas), INEGI (Instituto Nacional de Estadística y Geografía), m (metros), PEPC (fosfoenolpirúvico-Carboxilasa), Pg (picogramo).

1.1 Aspectos generales del género Agave

Los agaves son plantas monocotiledóneas, perennes y xerófitas, las cuales están adaptadas a vivir en condiciones climáticas desfavorables, con largos periodos de sequía y altas temperaturas, gracias a que presentan modificaciones morfológicas como una estrategia para soportar ambientes desérticos, a su vez tienen hojas dispuestas en espiral y arregladas en rosetas en el ápice de un tallo, esta organización anatómica favorece a que el agua en forma de lluvia o de rocío sea recolectada y dirigida hacia sus raíces, de igual manera, las hojas son suculentas, fibrosas, con una base dilatada y carnosas. El número de hojas varía de una especie a otra (García-Mendoza. A, 2007., Espinosa-Barrera, 2015).

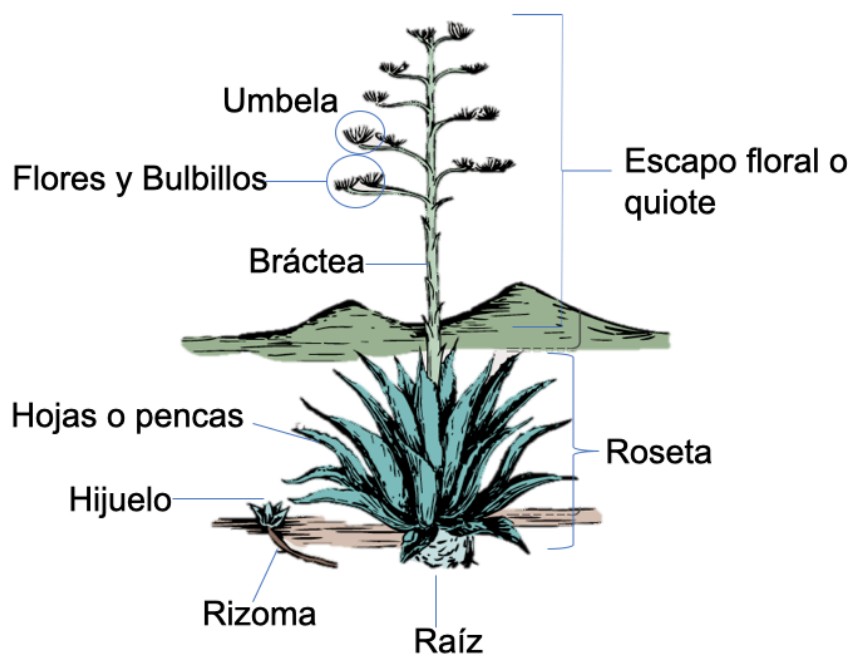


Figura 1.0. Morfología, composición y estructura de una planta de agave (Gallardo-Valdez, 2017)

1.1.1 Características sobresalientes de los agaves

Los agaves tienen estrategias para poder sobrevivir en ambientes con clima seco o periódicamente seco, con variaciones de temperatura durante el día y la noche, estas plantas limitan la pérdida de agua por transpiración al acumularla en sus tejidos especializados (García-Mendoza, A., 2007).

Asimismo, el género agave tiene una gran relevancia económica y cuenta con alrededor de 136 especies. Algunas de ellas eran consumidas por los antiguos habitantes de México siendo apetecibles por su alto contenido de azúcar (Nobel, 1988).

1.2 Clasificación taxonómica y descripción botánica

1.2.1 Presentación del género agave

Con base en el análisis morfológico y molecular realizado por Dahlgren *et al.*, (1985), éste clasifica al género agave dentro de la familia *Agavaceae*, la cual incluye 8 géneros y 295 especies (Cervantes-Dueñas, 2016., García-Mendoza *et al.*, 2019). El género *Agave* es originario de América, siendo México el país que presenta una mayor diversidad de especies, 150 aproximadamente y el 55% crece solamente en el mismo (Portillo *et al.*, 2007., Arzate *et al.*, 2014., Aguado *et al.*, 2022). En cuanto a su descripción botánica, y como se mencionó anteriormente, los agaves son plantas monocotiledóneas y xerófitas, esta última característica hace referencia a su capacidad de sobrevivir a grandes sequías. Además, son plantas perennes (se caracterizan por vivir más de dos años), de igual manera sus hojas están dispuestas en espiral y crecen en rosetas en el ápice de un tallo, cabe destacar que el tallo es el principal órgano que almacena agua y carbohidratos reserva, ya que todas las raíces adventicias nacen de su base. Las hojas de los agaves son suculentas, fibrosas y de aspecto carnoso, tienen diferentes formas de acuerdo a cada especie, éstas pueden ser lineales, ovaladas o lanceoladas, a su vez los márgenes poseen diversidad morfológica, pero se distinguen por tener una espina en la punta del ápice, de igual forma, en las hojas se almacena agua, ya que tienen adaptaciones como cutícula gruesa, sensibilidad estomática o presencia de estomas complejos que conservan y evitan la pérdida de agua (Espinosa-Barrera, 2015), como se muestra en la figura 1.0.

1.2.2 Metabolismo de las plantas de agave

Además, los agaves contienen sistemas de raíces superficiales que permiten la captación eficiente de pequeñas cantidades de agua y presentan el metabolismo ácido de las crasuláceas o CAM, en el que el CO_2 se almacena en forma de ácidos orgánicos en la vacuola y durante el día éste se incorpora a la fotosíntesis, por lo tanto, la transpiración es mayor y da como resultado ganancias en carbono, perdiendo lo mínimo en agua (Espinosa-Barrera, 2015), el metabolismo CAM se ilustra en la figura 1.1.

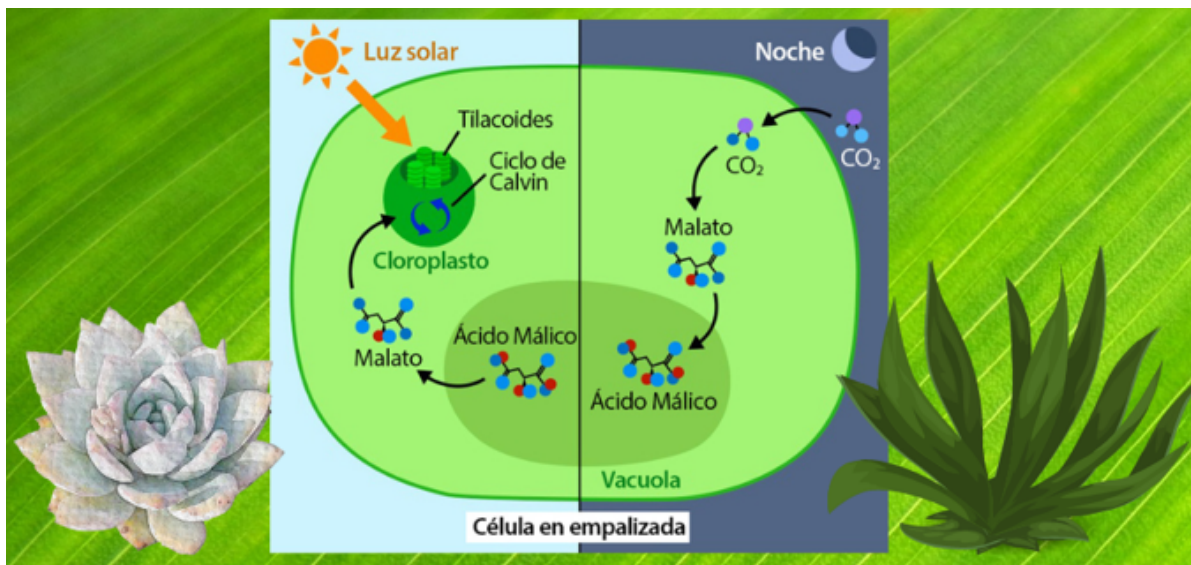


Figura 1.1. Esquema metabolismo CAM característico de la familia Agavaceae (Adaptado de: Kropp y Halasey, 2018)

En la figura 1.1 se muestra como los organismos tipo CAM reservan ácidos orgánicos dentro de la vacuola en la fase nocturna, por lo general en forma de ácido málico, a su vez, tienen una gran cantidad de carbohidratos de reserva tales como: almidón, glucanos y hexosas, debido a esto las plantas CAM utilizan grandes cantidades de PEPC (PEP-Carboxilasa) para fijar el CO_2 y junto con las enzimas descarboxilasas activas promueven la fijación diurna de CO_2 gracias al ciclo de Calvin (Geydan & Melgarejo, 2005).

Por otro lado, el metabolismo CAM, proviene de una evolución morfológica, genética y anatómica, que presenta modificaciones en la célula de la planta, ya que ésta posee un mesófilo especializado con paredes celulares delgadas y vacuolas prominentes, denominado hidrénquima, el cual se especializa en acumular agua. La adaptación y evolución de los genes en las plantas CAM las ha convertido en

organismos muy versátiles, ya que pueden sobrevivir a ambientes poco favorables, ya que si el CO₂ sigue aumentando serán las ultimas plantas en el futuro, debido a que seguirán transformando este gas en oxígeno y otros componentes orgánicos (Magos López, 2016)

1.2.3 Importancia de la reserva genética del agave

La conservación de la reserva genética (ADN) es necesaria para la subsistencia de las plantas pues en ellas se encuentra la información para el desarrollo de la planta, la morfología, el apoyo para combatir enfermedades o plagas, el ciclo de vida y las futuras adaptaciones a condiciones climáticas distintas, además de que es necesario que exista una variación genética para que posean capacidad evolutiva. Para ayudar a la conservación de los agaves uno de los puntos indispensables es generar la información sobre la organización y composición de su genoma. Se sabe que estas especies contienen 7.5 pg (haploide) de ADN, que su número básico cromosómico es $n = 30$ y que existen especies poliploides, es decir, con juegos extras de cromosomas. Sin embargo, aún se tiene mucho que explorar en los genomas de estas especies (Espinosa-Barrera, 2015).

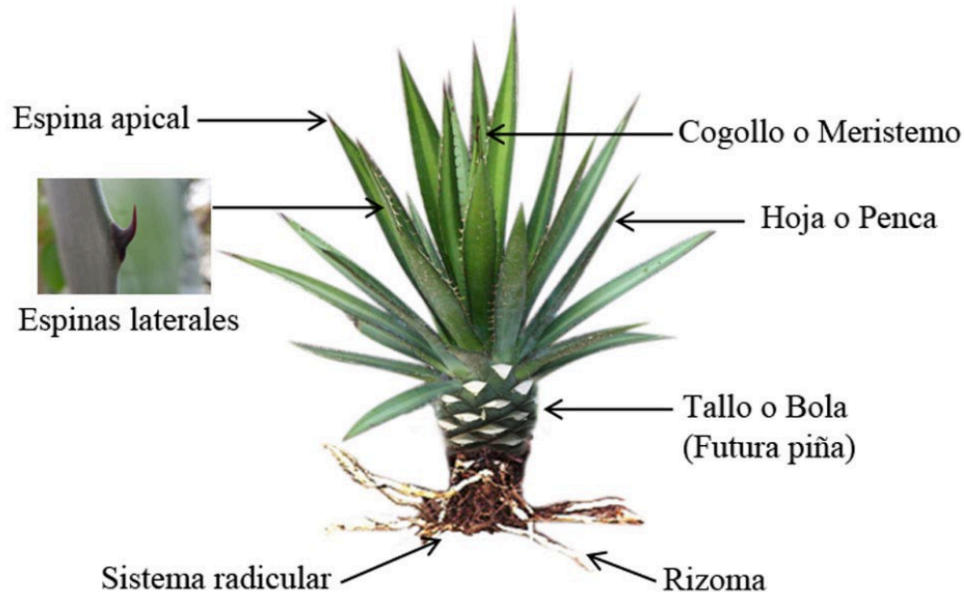


Figura 1.2. Anatomía del agave (Esparza-Ibarra *et al.*, 2015)

1.3 Centro de origen y distribución geográfica

1.3.1 Distribución del género agave en la república mexicana

Como reportan la CONABIO, (2006), Cervantes (2002) y Pérez-Hernández *et al.*, (2016), México es el centro de origen, diversificación y domesticación de la familia de las Agavaceas, a la cual pertenece el maguey, incluye 288 especies, 166 de las cuales son magueyes, agrupados en el género *Agave* (*Agave spp.*). Dentro de todo el territorio mexicano se han encontrado 125 especies de agaves, lo que representa el 75% del total mundial. De acuerdo con Palma-López *et al.*, (2016) e Isidro Morales *et al.*, (2017), estas 125 especies son potencialmente útiles para la extracción de mezcal.

Sin embargo, un estudio realizado por García *et al.*, (2019), presenta que se han encontrado cuatro especies nuevas de *Agave* (Asparagaceae, Agavoideae) al sur de México, por lo que, actualmente la cifra de especies endémicas en nuestro país es de 129, las cuales representan el 61% de las especies del mundo y 81% de las que se distribuyen en México.

La república mexicana, está conformada en un 60 % por regiones con zonas áridas y semiáridas, con condiciones climatológicas de poca precipitación, además cuenta con suelos pedregosos y superficies pronunciadas (Isidro Morales *et al.*, 2017), estas condiciones ayudan al crecimiento y desarrollo de especies vegetales xerófitas como las cactáceas y agaves.

1.3.2 Relevancia cultural y social del agave en México

De acuerdo con García-Mendoza (2012), los agaves siguen teniendo una gran importancia económica y cultural, ya que son fuente de alimentos, bebidas, medicinas, combustible, cobijo, ornato, fibras, abono, construcción de viviendas y elaboración de implementos agrícolas, etc., de igual modo, estas plantas tienen características muy particulares, lo cual ha servido para diferenciarlas de otras especies vegetales, por ejemplo: su tolerancia a la sequía y capacidad de absorber humedad del ambiente para sobrellevar los periodos de la falta de agua por precipitaciones (Isidro Morales *et al.*, 2017).

A pesar de que, los agaves están principalmente adaptados a habitar en climas áridos, tienen una distribución geográfica amplia, por lo que viven en matorrales, pastizales, bosques de pino y encino, selvas secas y húmedas, incluso algunas

especies crecen sobre suelos rocosos con muy poca superficie. En particular, los agaves utilizados para la producción de mezcal se distribuyen desde Sonora hasta Chiapas y desde Nuevo León y Tamaulipas hasta la Península de Yucatán, como se puede observar en la figura 1.3.



Figura 1.3. Distribución de los agaves en México (CONABIO, 2006)

1.4 Importancia alimenticia y económica

1.4.1 Usos y aplicaciones de las plantas de agave

Existen registros de que en México el uso de agave, data de hace más de 10 mil años (CONABIO, 2021), siendo conocidas por su variedad de usos, las especies de *Agave*, son empleadas como materia prima para la elaboración y fabricación de canastas, sacos, cordeles, entre otros, a partir de la fibra de especies como *Agave fourcroydes* Lem., (*A. henequén*), *Agave sisalana* Perrine (*A. sisal*), *Agave angustifolia* (*A. espadín*), en la gastronomía mexicana sus pencas se usan para envolver la barbacoa, sus flores (gualumbos) se cocinan y con el aguamiel se elabora pan de pulque. Es importante resaltar que, las plantas de agave contienen importantes fitoquímicos como vitaminas y saponinas, de igual manera los agaves son empleados para la elaboración de bebidas alcohólicas destiladas como lo son el tequila, que se produce a partir de *A. tequilana* Weber var. (forma) azul y/o los mezcales a partir de *Agave rhodacantha* Trel. (*A. mexicano* o *americano*) o *Agave potatorum* Zucc. (*A. tobalá*), a su vez, a partir de estas plantas se producen bebidas alcohólicas fermentadas como el pulque y los curados, los cuales incluyen minerales

de importancia nutricional y, además contienen bacterias acidolácticas con potencial probiótico que de igual forma se emplean en la medicina tradicional ya que. En *A. fourcroydes* (*A. henequén*) se han identificado compuestos con propiedades antiinflamatorias, antiparasitarias o hemolíticas. Otro producto obtenido a partir de *A. tequilana* (*A. azul*) es la miel de agave que puede ser empleada como sustituto de azúcar, y, por último, son por excelencia plantas de ornato, sin embargo, estos ejemplares han sido sobreexplotados debido a la extensa variedad de productos que son obtenidos a partir de ellos (CONABIO, 2021).

1.5 El agave tobalá

1.5.1 Descripción botánica y distribución geográfica de *A. potatorum*

“El *Agave potatorum* Zucc es una especie silvestre de la que se obtiene el mezcal tobalá, que por su sabor es altamente demandado” (Escamirosa *et al.*, 2017, p.18). De acuerdo con Sánchez (2005) y Martínez-Ramírez, Trinidad, Bautista y Pedro (2013) este maguey mezcalero se distribuye en la región Mixteca de Oaxaca y en el estado Puebla.

García-Mendoza (2010) indica en su estudio las características principales de *A. potatorum*:

“Plantas perennes, solitarias, con rosetas compactas de 30-50 cm de alto y 40-60 cm de diámetro. Constando de 30-60 hojas por planta de 15-35 cm de largo y 8-10 cm de ancho” (p. 73) (fig. 1.4 y 1.3 y tabla 1.0).

Taxonomía de la especie:

- Reino: Plantae
- División: Magnoliophyta
- Clase: Liliidae
- Orden: Asparagales
- Familia: Asparagaceae
- Subfamilia: Agavoideae
- Género: *Agave*
- Especie: *Agave potatorum*



Figura 1.4. *Agave potatorum* Zucc (Convite Mezcal, 2020)

1.5.2 Principales aspectos de *A. potatorum* (*Agave tobalá*)

Con base en la investigación de García-Mendoza (2010) y Vázquez (2006), y la información de CONABIO (2006) y SEMARNAT (2010), a continuación, se presentan los aspectos principales de *A. potatorum*:

- **Nombre común y usos:** Papalometl, papalomé, maguey papalomé, tóbala. Se usa principalmente para la elaboración de mezcal, bebida alcohólica muy apreciada por sus cualidades organolépticas suaves. Las flores se emplean en la alimentación al igual que el pedúnculo floral cuando ha comenzado su desarrollo. En la medicina tradicional, las hojas se utilizan para disminuir hinchazones y para el tratamiento de lesiones internas tanto de hombres como de animales domésticos (García-Mendoza, 2010 p. 77).
- **“Etimología:** El epíteto específico proviene del latín *potator*, *-oris* bebedor (de vino)” (García-Mendoza, 2010 p. 77).
- **“Fenología:** Florece de finales de agosto a noviembre y fructifica de noviembre a marzo” (García-Mendoza, 2010 p. 77).
- **Hábitat y distribución:** *Agave potatorum* se desarrolla en sitios planos o con poca pendiente, sobre suelos arenosos derivados de rocas calizas, en un intervalo altitudinal que va de los 1300 a 2400 m, en climas áridos y semiáridos. Forma parte de la selva baja caducifolia, del matorral xerófilo con cactáceas columnares y del matorral xerófilo con el bosque *Quercus*. Su distribución abarca el extremo oriental de la cuenca del río Balsas, el valle de Tehuacán-Cuicatlán, pie de monte de las sierras Mixtecas y montañas que rodean los Valles centrales de Oaxaca (García-Mendoza, 2010 p. 77).
- **Endemismo:** Endémica de México, se conoce de los estados de Oaxaca y Puebla. En Oaxaca en los distritos: Coixitlahuca, Ejutla, Etla, Huajuapán,

Ixtlán, Miahuatlán, Mixe, Nochixtlán, Ocotlán, Teotitlán, Tlacolula, Yautepec, Zaachila y Zimatlán (García-Mendoza, 2010 p. 36)

- **Estado de conservación cualitativa:** El aprovechamiento de las plantas para la producción de mezcal es una amenaza para las poblaciones silvestres debido a que la totalidad de las plantas son extraídas del medio silvestre, además de que se aprovechan los individuos adultos, lo que reduce el número de reproductores, la producción de semillas y la regeneración natural de la especie. Otro factor de riesgo es la pérdida y destrucción de hábitat por el cambio de uso del suelo (García-Mendoza, 2010 p. 36).
- **Polinizadores:** Principalmente, son los murciélagos *Leptonycteris curasoae* quienes polinizan y visitan sus flores otoñales, acarreando y mezclando el polen de poblaciones lejanas contribuyendo así a la formación de sus semillas.

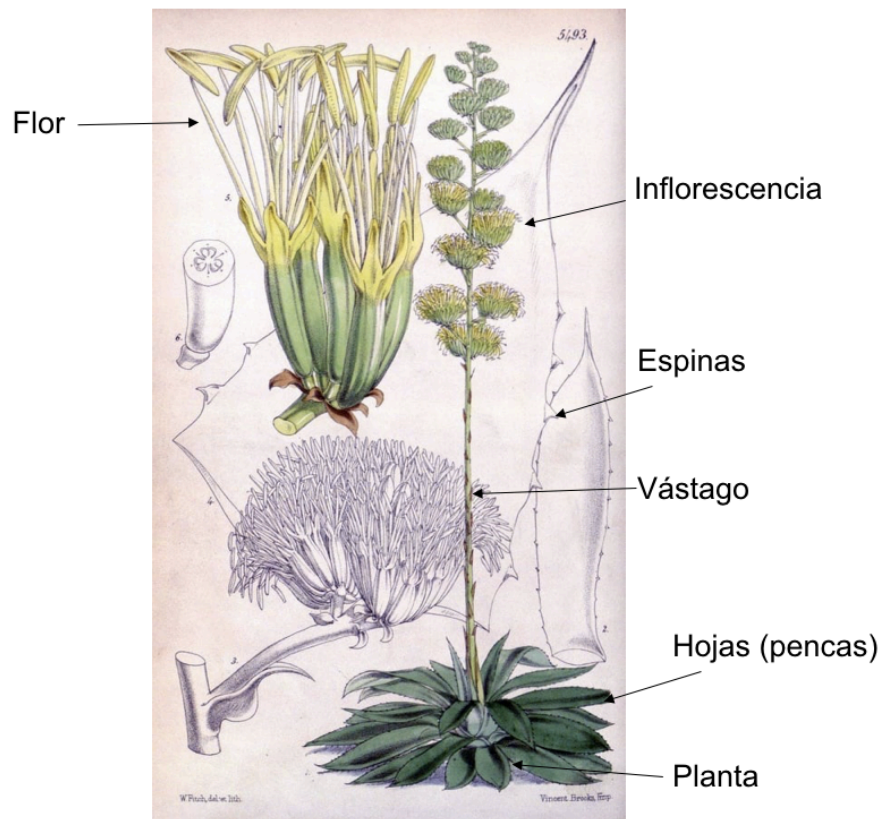


Figura 1.5. Anatomía de *A. potatorum* (Biodiversity Heritage Library, 2018)

En la tabla 1.0 se presentan algunas de las características sobresalientes de la especie *A. potatorum* o agave tobalá.

Tabla 1.0. Características sobresalientes de *Agave tobalá*

 (Far out flora, 2021)	<u>Agave potatorum Zucc.</u> ○ Madurez: 8-14 años. ○ Distribución: Oaxaca y Puebla. Partes interiores y secas de la sierra Madre del sur, Valle de Tehuacán y sierras oaxaqueñas. ○ Tipo de Reproducción: Sexual.
--	--

1.6 Problemática de la explotación de la especie

La industria tequilera del estado de Jalisco y la mezcalera de Oaxca, desde hace cinco años se encuentra en un crecimiento y demanda constante, ya que ambos productos han alcanzado reconocimiento mundial, como consecuencia se tiene escasez de materia prima (agaves), por lo que diversos productores artesanales de las sierras oaxaqueñas utilizan especies silvestres como susitutos, especialmente a *A. potatorum* Zucc., de la cual se elabora un mezcal con características organolépticas destacables, por su composición en cuanto a compuestos aromáticos (Molina-Guerrero *et al.*, 2007., Vera-Guzmán *et al.*, 2009., Isidro Morales *et al.*, 2017). Esta especie habita en suelos con pendientes pronunciadas, pedregosos y sin aporte externo de nutrimentos, por su metabolismo CAM (del inglés, *Crassulacean Acid Metabolism*), puede optimizar la absorción del agua de lluvia y los nutrientes que contiene el suelo para lograr su crecimiento y fructificación, procesos que le llevan tiempo.

1.6.1 La agricultura de *A. potatorum* y madurez reproductiva de la especie

Illsley *et al.*, (2005), López-Cruz, Martínez-Gutiérrez y Caballero-García (2016), mencionan que un ejemplar de *A. potatorum* alcanza su madurez reproductiva entre

los seis y ocho años, lo cual coincide con su concentración máxima de azúcares y su extracción del campo.

La cosecha de “piñas” provenientes de estas poblaciones silvestres, afecta a *A. potatorum* debido a que la colecta se lleva a cabo antes de que la planta pueda emitir flores y semillas, esto tiene un impacto negativo en su reproducción, ya que no existen registros de que se reproduzca asexualmente, como consecuencia, las poblaciones silvestres han ido disminuyendo (Scheinvar, 2008., Torres *et al.*, 2013., López-Cruz *et al.*, 2016).

Escamirosa-Tinoco, Martínez y Guzmán (2019) señalan que, en el censo del 2015 de las comunidades: Infiernillo San Francisco, San Miguel Piedras, Chidoco, Río Minas y San José Río Minas de los distritos de Zaachila, Zimatlán y Nochixtlan, se encontraron 29 ha cultivadas con *A. potatorum*, con una producción estimada de mezcal de 26,000 litros anuales.

De acuerdo con Scheinvar (2008), esta especie florece una única vez y muere, actualmente no existen registros de que presente algún tipo de reproducción asexual de forma natural, la polinización es el único medio de supervivencia para *A. potatorum*.

Pérez-Negrón y Casas (2007)., Delgado-Lemus (2008) y Torres *et al.*, (2013), describen los múltiples usos que se le dan a esta especie, como fuente de alimento (flores), leña, valla viva y elaboración de mezcal, por mencionar algunos. Debido a que estos usos están relacionados con el momento de su reproducción, los autores han identificado a esta especie en estado de riesgo para su conservación.

1.7 Elaboración del mezcal

1.7.1 Las especies de agave como materia prima para su obtención

En el estado de Oaxaca se utilizan diversas especies de agave para la producción de mezcal (Martínez-Ramírez *et al.*, 2013., López-Cruz *et al.*, 2016).

Cabe mencionar que, este destilado al igual que el tequila, cuenta con denominación de origen y norma oficial mexicana, para la vigilancia de su producción y comercialización en todos los niveles (SAGARPA, 2017).

Esparza-Ibarra *et al.*, (2015) indican el mezcal, se puede elaborar de diferentes especies *Agave*, sin embargo, éstas no se pueden utilizar para producir ningún otro tipo de bebida dentro de los estados que cuentan con denominación de origen.

Capítulo 2. El mezcal

El proceso de elaboración del mezcal es de gran relevancia ya que, actualmente su producción se realiza de forma artesanal, y en este capítulo se describe dicho proceso, además de mencionar a los otros destilados de agave que se producen en la República Mexicana, de igual manera, se señalan sus características más sobresalientes, las cuales marcan una gran diferencia respecto a otras bebidas como lo es el tequila, por otro lado, se mencionan los organismos reguladores de este destilado, así como su denominación de origen, la cual lo protege y sustenta, por último, se demuestra su importancia en el mercado nacional e internacional, al igual que su proyección a futuro.

Abreviaturas: ART (Azúcares Reductores Totales), DOM (Denominación de Origen), g (gramos), ISSR (Inter secuencias Simples Repetidas), L (Litros), Kg (Kilogramos), Mt (Miles de Toneladas), NOM (Norma Oficial Mexicana).

2.1 Definición de Mezcal

“Mezcal” proviene del náhuatl *Mexcalli*, y su significado es: agave horneado. Asimismo, es el nombre que recibe la bebida alcohólica destilada, la cual es elaborada de manera artesanal en muchas localidades rurales de México (Pérez-Hernández *et al.*, 2016).

La Norma Oficial Mexicana NOM-070-SFCI-2016 “Bebidas alcohólicas-Mezcal Especificaciones”, establece que; “El mezcal es la bebida alcohólica regional obtenida por destilación y rectificación de mostos preparados directa y originalmente con los azúcares extraídos de las cabezas maduras de los agaves, previamente hidrolizadas o cocidas, y sometidas a fermentación alcohólica con levaduras, cultivadas o no”.

2.1.1 Proceso de elaboración del mezcal

Esta bebida es obtenida de los azúcares fermentados de las cabezas cocidas de más de 50 especies de género *Agave* comúnmente llamado maguey (Aguirre y Eguiarte, 2013, Torres *et al* 2015, Pérez-Hernández *et al*, 2016). La cosecha del agave maduro es la primera acción que se realiza en la producción del mezcal, posteriormente se “capa” o corta su escapo floral, después se retiran la mayoría de sus hojas por medio del jimado y se obtienen las piñas de agave, las cuales se cosen y hornean en hornos o autoclaves. Durante la cocción, los polisacáridos específicamente los fructanos, son hidrolizados por la acidez del jugo y la temperatura del proceso, con ello se obtiene un jarabe rico en fructosa que se introduce a fermentación alcohólica con levaduras que son originarias o cepas seleccionadas. Por último, el mosto con un porcentaje de etanol de 2 a 13 % v/v se destila por lo menos dos veces hasta obtener un mezcal blanco o joven. La

elaboración de este destilado tarda en promedio ocho meses, eso sin tomar en cuenta, el tiempo de maduración de la planta, el cual depende de la especie y su tamaño, ya que, pueden ser entre 10 y 25 años para las grandes especies de agave y de 4 a 5 años en las pequeñas. (García-Mendoza, 2007, Pérez-Hernández *et al*, 2016). Todo el proceso es supervisado y coordinado por un maestro o maestra mezcalera, esto es, una persona con conocimiento y liderazgo en este campo (Pardo-Núñez, J., 2019).

La producción del mezcal es generalmente artesanal y por lo tanto varía de región en región. Sin embargo, se determina un proceso más o menos homogéneo que sigue las siguientes etapas (Bancomext, 2001). A continuación, se presenta un diagrama de bloques (fig. 2.0) que representa el proceso de elaboración de esta bebida espirituosa.

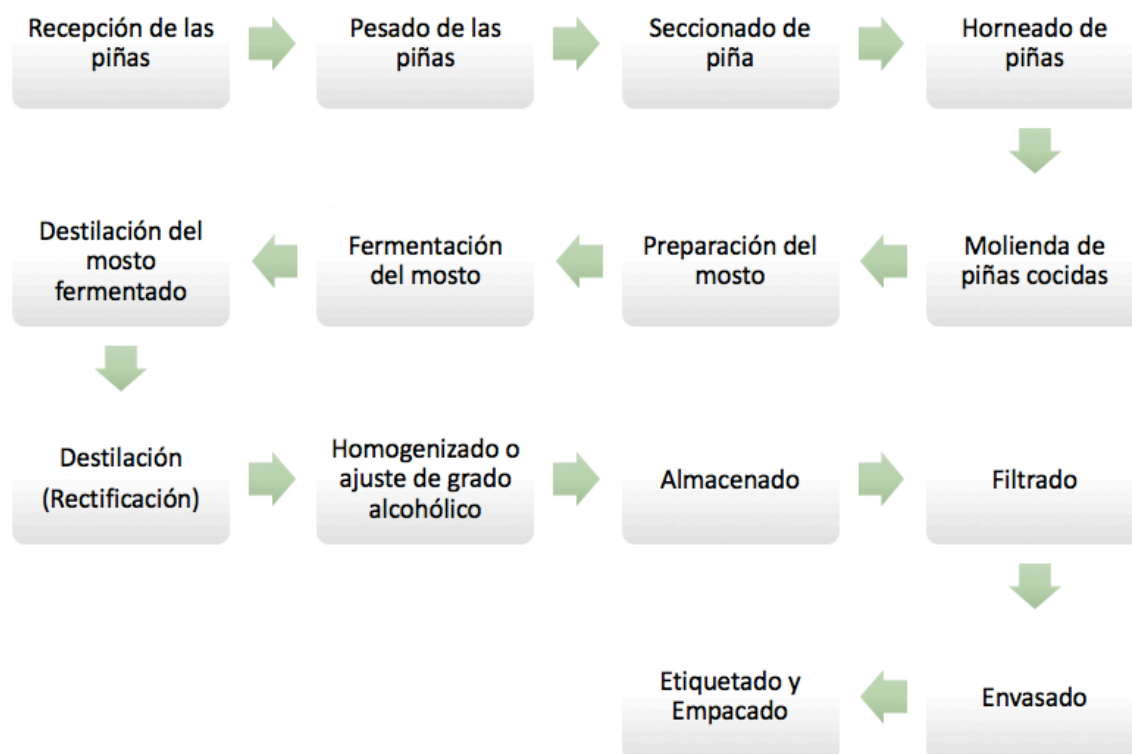


Figura 2.0. Diagrama de bloques con las operaciones realizadas para la elaboración de mezcal artesanal. Adaptado de: CIATEJ, 2014.

2.1.2 Especies de agave empleadas en la elaboración de bebidas alcohólicas

En los estados de la república mexicana donde se prepara mezcal, los productores utilizan aproximadamente 42 especies de agave, en 24 entidades federativas (Colunga, 2007., Nogales, 2020). El número de especies utilizadas ha aumentado

ya que se han reconocido científicamente más agaves mezcaleros como: *A. nussaviorum* (*A. papalotl* o *A. tobalá*), *A. semmaniana* (*A. papalometl*), *A. lyobaa* (*A. coyote*) y *A. megalodonta* (*A. espumoso*), por consiguiente, en total son 46 especies, 7 subespecies y 7 variedades.

Sin embargo, son 20 especies las más empleadas por sus características y su rendimiento para la producción de mezcal. Por otro lado, Nogales (2020), menciona que las bebidas obtenidas del agave se clasifican en dos grupos:

- 1) Las bebidas que se obtienen por medio del raspado de azúcares cuando se raspa el tallo, como: el pulque y el aguamiel.
- 2) Las bebidas destiladas que provienen del cocimiento de las corazas, para la obtención de mezcal.

2.1.3 Tipos de mezcal

Éste último se puede clasificar en las siguientes clases o tipos, como especifica la NOM-070-SFCI-2016:

- a) “Blanco o Joven”: Mezcal incoloro y traslucido que no está sujeto a ningún tipo de proceso posterior.
- b) Madurado en Vidrio: Mezcal estabilizado en recipiente de vidrio más de 12 meses, bajo tierra o en un espacio con variaciones mínimas de luminosidad, temperatura y humedad.
- c) Reposado: Mezcal que debe permanecer entre 2 y 12 meses en recipientes de madera que garanticen su inocuidad, sin restricción de tamaño, forma y capacidad en L, en un espacio con variaciones mínimas de luminosidad, temperatura y humedad.
- d) Añejo: Mezcal que debe permanecer más de 12 meses en recipientes de madera que garanticen su inocuidad de capacidades menores a 1000 L, en un espacio con variaciones mínimas de luminosidad, temperatura y humedad.
- e) Abocado con: Mezcal al que suele incorporar directamente ingredientes para adicionar sabores, tales como gusano de maguey, damiana, limón, miel, naranja, mango, entre otros.

- f) Destilado con: Es un mezcal que debe destilarse con ingredientes para incorporar sabores, tales como pechuga de pavo o pollo, conejo, mole, ciruelas, entre otros”.

2.2 La producción de mezcal

2.2.1 Aseguramiento de la calidad del mezcal

La calidad y sanidad en el proceso de elaboración del mezcal, es asegurada y regulada por instancias gubernamentales y no gubernamentales, tal es el caso de las Normas Oficiales Mexicanas que engloban varios aspectos, que van desde la producción primaria hasta el manejo de desechos y la extracción de agaves silvestres que son utilizados como materia prima (López-Cruz *et al.*, 2016).

Como se mencionó anteriormente, existen diversos organismos que aseguran y respaldan esta actividad, por ejemplo, en el estado de Oaxaca se formó el Comité Sistema Producto Maguey-Mezcal, y son los productores de agave y mezcal, comerciantes, proveedores de insumos, equipos y servicios, quienes lo conforman, además cuentan con la participación de los gobiernos estatal y federal (Martínez - Tenorio, 2013., López-Cruz *et al.*, 2016).

2.2.2 Clasificación del mezcal

El mezcal se clasifica oficialmente de acuerdo con el tipo de producción, proceso de destilación y cantidad de piñas de agave que son empleadas para obtener un litro, y éste puede ser: industrial, ancestral y artesanal.

La producción industrial pertenece a productores empresariales que ocupan infraestructura moderna para obtener grandes cantidades de este destilado, gracias a los procesos automatizados, y que a su vez es vendido para el consumo masivo. El mezcal del tipo ancestral y artesanal, los cuales no tienen diferencias considerables, son producidos de manera tradicional por pequeños productores, quienes realizan la actividad en pequeñas fábricas artesanales conocidas como “palenques”, sin embargo, la producción es de menor volumen, cabe destacar que este negocio es generacional, de ahí que sea la principal fuente económica de los pequeños productores y sus familias. (López-Cruz *et al.*, 2016., Chavoya-Cruz, 2020). Por otro lado, para la producción ancestral de esta bebida, las piñas son cocidas en hornos de piedra y tierra, la molienda es realizada de forma manual o con tracción animal. La fermentación se lleva a cabo en pilas de cemento o tinajas de

madera, cuero, acero, etc. Asimismo, para la destilación se utilizan ollas de barro o alambiques de cobre de destilación discontinua (Chavoya-Cruz, 2020). Finalmente, otro factor importante que marca la diferencia entre los tipos de mezcales es, la competencia económica, no pueden competir con el mismo grado de habilidad que las grandes industrias de bebidas alcohólicas, ya que la mayoría de las marcas de mezcal artesanal trabajan en mercados selectos, en donde el producto se vende más caro, esto se debe a las características artesanales que no les permiten tener una producción masiva (López-Cruz *et al.*, 2016).

2.2.3 Selección del agave para la producción de mezcal

La especie de agave seleccionada como materia prima, es diferente en cada región geográfica del país, siendo Oaxaca el estado donde más se elabora esta bebida, y por lo general se emplea la especie, *Agave angustifolia*, conocida como “maguey espadín”, al igual que el *Agave potatorum* o “maguey tobalá”, aunque este último con menos frecuencia (Cházaro, 2007., Pérez-Hernández *et al.*, 2016). El uso de las especies *Agave cupreata* y *Agave potatorum*, las cuales se distribuyen en los bosques tropicales secos del sur de México, ha tenido una repercusión negativa, ya que la extracción de las plantas en estado reproductivo genera una disminución en sus poblaciones silvestres (Aguirre., y Eguiarte, 2013., Pérez-Hernández *et al.*, 2016)

2.2.4 El problema de la extracción de ejemplares silvestres

Aguirre y Eguiarte (2013), evalúan en su estudio el grado de erosión genética, ésta se refiere a la degradación o pérdida de la variabilidad fitogenética, la cuál se debe a muchos factores., incluidos el deterioro parcial del hábitat natural, aumento de la agricultura, cambio climático, entre otros (FAO, 2017., Martínez Estévez, 2021) que presentan las poblaciones de agave que son explotadas, con la finalidad de proporcionar información para el desarrollo de estrategias eficaces, y en busca de su conservación, por medio de ISSR (Inter secuencias Simples Repetidas, marcadores nucleares dominantes asociado a los microsatélites), y dando como resultado que las prácticas de micropropagación (o propagación *in vitro*, es una de las técnicas biotecnológicas más utilizadas en el cultivo de tejidos, empleada para la obtención de nuevos individuos clonados) (Martínez Estévez, 2021), pueden perjudicar la diversidad genética de las poblaciones de agave, sobre todo si esta

práctica se realiza con hijuelos, a diferencia de si los individuos provienen de semillas, como resultado se evitaría la pérdida de su diversidad, además en este estudio los autores concluyen que la clonación de estas especies disminuye la variabilidad genética.

En cuanto a la especie *A. potatorum*, Delgado-Lemus *et al.*, 2014., se revisó distribución en el estado de San Luis Potosí, debido a que la recolección de esta especie se efectúa previa a su proceso de reproducción sexual, constatando que las poblaciones de *A. potatorum* se encuentran en alto riesgo, de igual manera, los autores analizaron las tasas de extracción, las prácticas de manejo, entre otros factores y para ello utilizaron modelos bioclimáticos con el fin de obtener un muestreo ecológico y estimar la distribución potencial de la especie, encontrando un área de distribución con aproximadamente 608 hectáreas las cuales producen un promedio de 7,296 plantas de *A. potatorum* cosechables. Pérez-Hernández *et al.*, 2016.

2.3 Producción del mezcal en México

2.3.1 Denominación de Origen

De acuerdo con COMERCAM (2023), México cuenta con denominación de origen del mezcal (DOM), para 9 estados de la república, la cual asegura y protege su propiedad intelectual. Incluye a los estados de Oaxaca, Guerrero, San Luis Potosí, Zacatecas y Durango, 2 municipios de Guanajuato, 29 municipios de Michoacán, 116 municipios de Puebla.

2.3.2 Legislación y regulación del mezcal

La Norma Oficial Mexicana: NOM-070-SCFI-2016, Bebidas alcohólicas-Mezcal Especificaciones, es la que define todas las reglas de la producción del mezcal, por otro lado, el organismo encargado de promover y vigilar el cumplimiento de esta norma es el Consejo Mexicano Regulador de la Calidad del Mezcal, A.C., fundado en 1997 (COMERCAM, 2015).

2.3.3 La certificación oficial del mezcal

La NOM-251-SSA1-2009, impone los requisitos de calidad en las operaciones de las plantas que procesan el mezcal, envasadora, homogeneizadora, entre otras. Acatar esta NOM ayuda a garantizar la calidad química del producto, su origen y características sensoriales que son propias de cada marca, al igual protege a esta

bebida de una posible adulteración, gracias a esta regulación se logra certificar la calidad del producto. La certificación del mezcal, consiste en que el COMERCAM emite el certificado NOM con vigencia de seis meses, este mismo organismo supervisa el cumplimiento de la NOM, basándose en los resultados de los reportes de pruebas de laboratorio, si estos son aprobados, indican el cumplimiento de la Norma y el certificado se vuelve a renovar por otros seis meses, además de realizar el pago por este servicio (Pérez-Hernández *et al.*, 2016).

2.3.4 La cadena productiva del Maguey-Mezcal

La cadena productiva del Maguey-Mezcal, es el nombre que recibe el conjunto de operaciones y actores que forman parte de la transformación del agave o maguey hacia el producto mezcal, el cual es envasado y comercializado para llegar a las manos del consumidor (Palma *et al.*, 2016).

En el estudio realizado por Palma *et al.*, (2016), los autores señalan que este conjunto abarca diversas etapas consecutivas de un proceso de transformación, desde materia prima, tecnología, conocimiento, recursos humanos, insumos forestales y no forestales, infraestructura, transporte y locales de ventas, las cuales se mantienen interactuando. Estas áreas o eslabones actúan como subsistemas que tienen un valor económico. El COMERCAM, refiere que existen cinco eslabones, en palabras de este organismo, la cadena del sistema producto maguey y mezcal está conformada por:

1. Viveristas
2. Productores de Maguey
3. Productores de mezcal palenqueros e industriales
4. Envasadores pequeños, medianos y grandes
5. Comercializadores a granel y exportadores

En el mismo estudio Palma *et al.*, 2016, indican que esta interacción no es lineal y además es enredosa, debido a su dinámica. Por ejemplo, hay dos eslabones que se deberían tomar en cuenta: el vendedor de maguey y el vendedor intermediario de mezcal, el cual comercializa esta bebida artesanal. En consecuencia, la cadena productiva así expresada, no señala una diferencia significativa entre los productores de mezcal artesanal y los productores industriales. Ante esto, el estudio elaborado por Palma *et al.*, 2016 sugiere, el siguiente diagrama de la cadena

productiva y los actores implicados en la producción de mezcal artesanal y mezcal industrial.

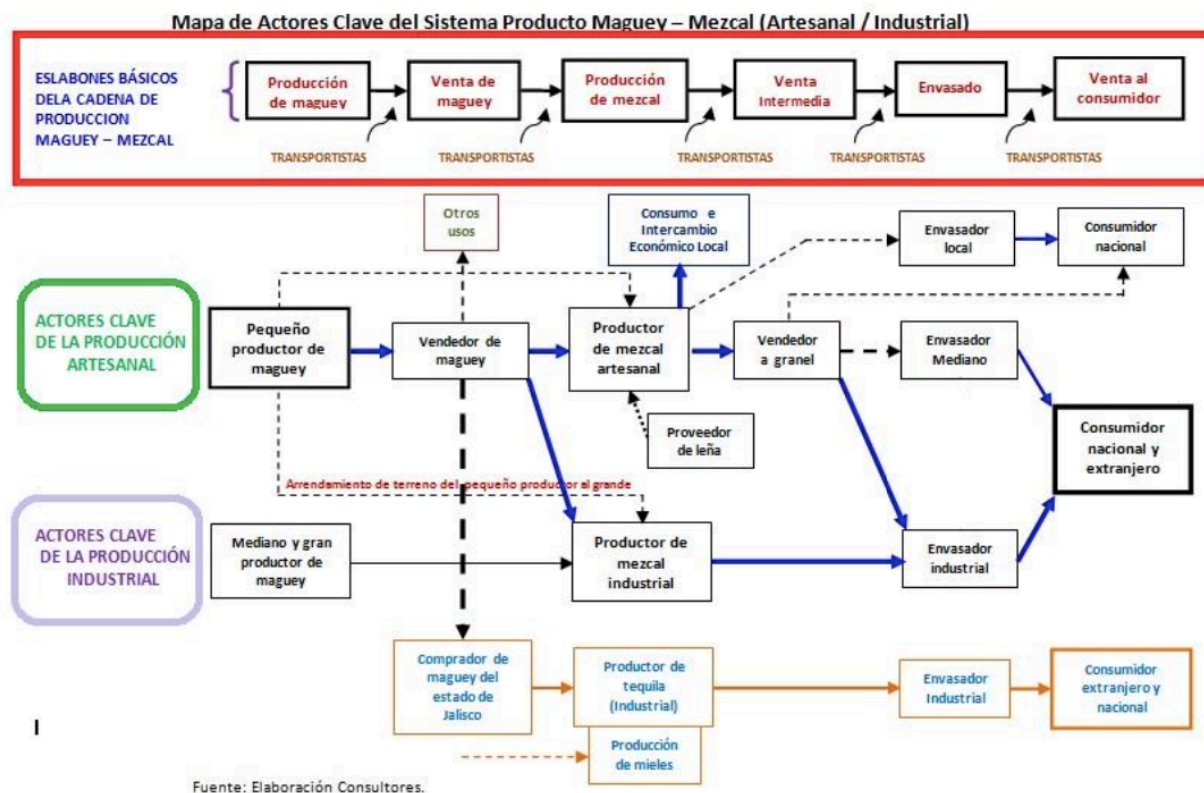


Figura 2.1. Mapa de actores clave del sistema producto maguey-mezcal (artesanal/industrial) (Palma *et al.*, 2016)

2.4 La producción del mezcal y otros destilados

En la Tabla 2.0 se mencionan a las especies del género agave más comunes, las cuales son empleadas como materia prima para producir diversos destilados de agave, en la república mexicana.

2.4.1 Especies de agave utilizadas para producir bebidas alcohólicas

La producción de diferentes destilados se puede obtener de distintas especies (silvestres y domesticadas), y cada región produce un destilado específico. En la siguiente tabla se citan los destilados más comunes así como los agaves utilizados par dichas bebidas.

Tabla 2.0. Tipo de destilados Tequila y Mezcal y especies de agaves utilizadas como materia prima

Destilado	Especies de Agave
Tequila Es un mezcal industrializado y elaborado a partir de una especie particular.	El agave utilizado como materia prima para la elaboración de tequila debe ser de la especie <i>Agave tequilana weber</i> variedad azul (NOM-006-SCFI-2012).
Mezcal Bebida alcohólica típica de México, obtenida a partir de más de 21 especies distintas de agave (CONABIO, 2006., Colunga <i>et al.</i>, 2007., Scheinvar, 2008., NOM-070-SCFI-2016).	Agave Angustifolia Haw (maguey espadín); Agave <i>esperrima</i> jacobi, Amarilidáceas (maguey de cerro, bruto o cenizo); Agave weberi cela, Amarilidáceas (maguey de mezcal); Agave potatorum Zucc, Amarilidáceas (maguey de mezcal); Agave salmiana Otto Ex Salm ssp Crassispina (Trel) Gentry (maguey verde o mezcalero).

Cabe resaltar que, la cantidad de mezcales es muy diversa, por ejemplo, el mezcal elaborado por los pobladores indígenas es totalmente artesanal, ya que cada maestro le da su toque especial, sin embargo, el sabor de la bebida también depende del tipo de agave (especie o combinación de especies, que son empleadas) y de la zona donde se extrae, del proceso de destilación y grado alcohólico final. Dentro de este proceso general, cada maestro mezcalero puede añadir otros productos o usar diferentes materiales (madera, piedra, cobre, entre otros) en los contenedores para la fermentación de acuerdo con su tradición (CDI, 2015). En la siguiente tabla 2.1 se muestran las diferencias entre los distintos tipos de destilados de agave que se elaboran en algunas regiones del país.

2.4.2 Presentación de los diferentes destilados de agave en México

Dependiendo de la región, el proceso de elaboración y, en algunas ocasiones de la especie de agave empleada, el destilado recibe un nombre diferente, así mismo cada destilado de agave puede tener su propia Norma Oficial o estar en proceso de obtenerla. En la tabla 2.1, se presentan los destilados de agave que son más populares en México.

Tabla 2.1. Destilados de agave elaborados en México con Denominación de Origen.

Destilado	Especies (materia prima)	Proceso de Elaboración	Norma Oficial Mexicana	Lugar de Origen
Mezcal	<i>Agave angustifolia</i> , <i>Agave rhodacantha</i> , <i>Agave potatorum</i> , <i>Agave tequilana</i> , <i>Agave valenciana</i> , <i>Agave salmiana</i> , <i>Agave cuprita</i> , <i>Agave marmorata</i> , <i>Agave americana</i> variedad <i>americana</i> , <i>Agave americana subespecie protamericana</i> , <i>Agave montium-sancticaroli</i> , <i>Agave colorata</i> , <i>Agave palmeri</i> , <i>Agave zebra</i> , <i>Agave pelona</i> , <i>Agave aspérriba</i> , <i>agave pintilla</i> , <i>Agave inaequidens</i> , <i>Agave aff. tequilana</i> , Entre 28 y 39 especies de agaves han sido empleadas tradicionalmente para elaborar mezcal en por lo menos 26 estados de la República Mexicana.	Éste es generalmente artesanal y se realiza a través de cinco procesos: 1) se obtiene la materia prima por medio de la cosecha y recolección del agave, 2) el cocimiento de las piñas o cabezas de agave en hornos, 3) la molienda, 4) la fermentación de las fibras obtenidas de la molienda junto con los jugos, para que finalmente se lleve a cabo 5) la destilación.	NOM-070-SCFI-2016. Permite la adición de hasta 20 por ciento de azúcares no provenientes de Agave.	Denominación de Origen Mezcal (DOM) desde 1994, los estados de: Guerrero, Zacatecas, San Luis Potosí, Durango, Puebla, Oaxaca, un municipio de Guanajuato y once de Tamaulipas, cuentan con dicha denominación. En el año 2016, la denominación de origen incluyó algunos municipios de los estados de: Aguascalientes, Estado de México y Michoacán.
Tequila	<i>Agave tequilana azul weber</i>	Es un proceso industrializado, para alcanzar mayor homogeneidad en todos sus aspectos y reducir costos.	NOM-006-SCFI-2012. Le permite utilizar 51 % de agave tequila azul y un 49 % de	Denominación de origen (DOT) Estados: Jalisco, Guanajuato, Michoacán, Nayarit y Tamaulipas.

			otros agaves o alcohol de caña	
Bacanora	<i>Agave angustifolia</i> Haw	Proceso similar al del mezcal, ya que comparte los cinco pasos fundamentales, que son: la cocción de las piñas, la molienda, la fermentación alcohólica con levaduras y finalmente la destilación junto con la rectificación (la bacanora puede ser blanco, reposado o añejo y susceptible de ser abocado).	NOM-168-SCFI-2004.	Denominación de origen (DOB) desde el año 2000, que protege a 35 municipios del estado de Sonora. Sonora: La producción de bacanora se realiza en 35 municipios. Área de Denominación de Origen Bacanora (ADOB)
Sotol (La bebida que fue mezcal por un tiempo)	Se elabora de una planta que no es agave. Planta: <i>Dasyllirion</i> spp. O <i>Dasyllirion wheeleri</i>	Las plantas <i>Dasyllirion</i> son similares a las piñas del agave. Sin embargo, el proceso para elaborar el sotol tradicionalmente consiste en cosechar y deshojar las plantas, preparar el horno; cocinar las piñas, macerarlas y fermentarlas. Al igual que el mezcal se hornea, fermenta y destila el producto en dos ocasiones.	NOM-159-SCFI-2004	Chihuahua, Coahuila y Durango. Cuenta con denominación de origen DO desde el 2002. Existen cuatro variedades de sotol: sotol blanco o silver, joven, reposado y extra añejo.

Comiteco	<i>Agave americana</i> var. <i>americana</i> o maguey comiteco.	Esta bebida se obtiene de manera distinta a los otros mezcales, ya que proviene de la destilación del “pulque”. Los mostos del agave comiteco (jugos, aguamiel o jarabe) son enriquecidos con piloncillo o panela (endulzante) de caña, en una proporción al menos 70% de carbohidratos reductores provenientes del agave, se someten a destilación. Cabe destacar que, en este proceso no se cuecen las piñas, sino que se elabora a partir del aguamiel, éste se obtiene por medio de un proceso de fermentación acompañado de piloncillo y una corteza conocida como <i>timbre</i>. Dicho “pulque” se destila y así se elabora el Comiteco.	PROY-NOM-199-SCFI-2015	El comiteco se elabora en el municipio de Comitán de Domínguez, Chiapas. No cuenta con denominación de origen.
------------------------	--	---	--------------------------------------	---

Raicilla	-<i>Agave maximiliana</i> Baker - <i>Agave inaequidens</i> Koch -<i>Agave Valenciana</i> -<i>Agave angustifolia</i> Haw -<i>Agave rhodacantha</i>.	Proceso artesanal al igual que el mezcal. En el cual, se escogen las piñas maduras, se jiman, se limpian y se cosen en hornos a 130 ° C, posterior, se enfrían y se muelen, el producto líquido se fermenta máximo ocho días, se vierte todo a los alambiques y finalmente se destila. El grado de alcohol de la raicilla oscila entre 36 y 45%, para obtener un litro de raicilla se requieren aproximadamente 10 kg de agave. Existen dos tipos de raicilla: -La raicilla de la costa: elaborada con los agaves: <i>angustifolia</i> Haw, y <i>Rhodacantha</i>". -La raicilla de la Sierra: elaborada con los agaves: "Agaves <i>maximiliana</i> Baker, A. <i>inaequidens</i> Koch y <i>Valenciana</i>"	PROY-NOM-257-SE-2021, Bebidas alcohólicas-Raicilla-Denominación, especificaciones, información comercial y métodos de prueba.	DO, desde el año 2019 cuenta con denominación de origen en 16 municipios del occidente de Jalisco y uno de Nayarit.
------------------------	---	--	---	---

Tuxca	Agaves endémicos de la zona cercana al nevado de Colima tales como: Cimarrón, Ixtero Amarillo y algunas variedades de angustifolia: -<i>Angustifolia</i> Haw -<i>A. rhodacantha</i> Trel	Este proceso es artesanal y el cocimiento se lleva a cabo en hornos cónicos subterráneos de tierra, la molienda es hecha a mano con mazo y hacha, la fermentación natural se da a través del “tajipo” (pozos de peña volcánica) y con destilador filipino. Cabe señalar, la importancia de los elementos ambientales como lo son la tierra volcánica y el agua proveniente del volcán “Nevado” de Colima, dos factores que definen e influyen en el sabor de la bebida.	Sin Norma Oficial	Tuxcacuesco, Zapotitlán de Vadillo, Tolimán, en Colima. Se produce en los límites de Jalisco y Colima. Sin denominación de origen (DOM).
Lechuguilla o Lechuguilla de la sierra	-<i>Agave shrevei</i> o <i>A. shrevei</i> (maguey 34lechuguilla). -<i>Agave bovicornuta</i> o maguey lechuguilla de la Sierra. -<i>Agave colorata</i> o Mezcal ceniza.	Destilado elaborado con el agave del mismo nombre. Su proceso de elaboración consiste en: La selección del agave para jimar, éste debe ser un agave capón de un año, los tallos labrados y rasurados se cosen en un horno	Sin Norma Oficial	La región cultural de la bebida la integran municipios ubicados en la Sierra Madre Occidental, de los estados de: Batopilas, Chihuahua y Sonora.

		cónico-invertido construido en la tierra, complementado con leña y piedras volcánicas.		
Quitupan	- <i>Agave inaequidens</i> Koch o Maguey bruto o alto	Para obtener el licor denominado Quituan o mezcal de olla, se lleva a cabo una producción artesanal, el nombre de este mezcal hace referencia a que se destila en ollas de barro, por lo que adquiere un sabor particular a olla de barro.	Sin Norma Oficial	Quitupan (en Las Agujas y El Chamacuero), en Jalisco y noroeste de Michoacán.
Zihuaquío	- <i>Agave cupreata</i> o maguey papalote, agave de hoja ancha.	La producción artesanal de esta bebida comienza con la recolecta del agave en las laderas, se utiliza un horno cónico prehispánico de piedra para cocerlo, y se despedaza con mazos de madera de encino, la fermentación se realiza en tinas de madera o cuero de vaca, finalmente para la obtención del destilado	Sin Norma Oficial	Tierra Caliente, Guerrero, Coyuca de Catalán. -Sin Denominación de Origen

		se ocupa un destilador filipino de cobre y se somete a una segunda destilación.		
Sisal y Yaax Ki	<i>Agave fourcroydes</i> o Henequén.	El “Sisal” se creó en el centro de investigación científica de Yucatán (CICY) a principios del año 2000. La otra bebida que se elabora a partir del agave Henequén es conocida como “Yaax Ki” y su proceso es artesanal, la planta de entre 7 y 10 años, se jima y el resto de la piña se pesa (35 Kg c/u). La piña se cocina al vapor en un horno a 92° C aproximadamente.	Proyecto de Norma parado.	Yucatán Sin Denominación de Origen
Turicato	- <i>Agave cupreata</i> o Maguey chino	Para la producción de esta bebida, primero se seleccionan los agaves maduros (entre 6 y 9 años) en campo, se jima y se desprende la “piña” o cabeza por la mitad, después se transporta a	NOM-070-SCFI-2016.	Turicato, Michoacán. Con DO desde 2012

		las “viñatas” donde se procesa artesanalmente.		
NOM-070-SFCI-2016., NOM -006-SFCI-2012., NOM-168-SFCI-2004., NOM-144-SCFI-2000., ASERCA, 2018., NOM-159-SCFI-2004., SADER, 2015., Nogales, 2020., SADER, 2015., IMPI, 2019., SADER, 2015., IIEG, 2021., PROY-NOM-257-SE-2021., Peña, 2019., Vásquez, 2021., Enciclovida, 2021., Flash, 2021., Iglesias-Mancera, 2020., Betancourt, 2020., Aguilar, 2017., CIATEJ, 2020.				

Como se observó en la tabla 2.0. La elaboración de cada mezcal es compleja y única ya que no sólo depende de las especies de agave empleadas, dado que el producto final puede proceder de una sola especie o de la mezcla de alcohol proveniente de varias de ellas. Sino también del proceso, las herramientas, materiales, microbiota nativa presente en la fermentación, al igual que el tiempo y temperatura de este último proceso, por lo que cada destilado tiene diferentes características sensoriales que marcan una distinción para cada estado o región en donde es producido (Illsley-Granich *et al.*, 2009., García-Mendoza, 2012., Montero *et al.*, 2017).

Por otro lado, García-Mendoza (2012) señala que el destilado o licor de agave es el nombre que, por decreto, se estableció en una NOM de emergencia, en 2006, y que se han visto obligados a usar los fabricantes de mezcales de las regiones que no incluyen la protección de las Denominaciones de Origen Tequila, Mezcal y Bacanora.

En la siguiente imagen (fig.2.2) se puede observar la distribución de las principales bebidas destiladas de agave a lo largo de la república mexicana.



Figura 2.2. Ubicación del sitio de elaboración de los distintos destilados de agave en la república mexicana (Pinterest, 2021)

2.5 Diferencia entre Mezcal y Tequila

El tequila es un tipo de mezcal, sin embargo, ningún mezcal puede ser un tequila, ya que este último destilado es nombrado así por una de las localidades en donde originalmente se produce (Tequila, Jalisco, México), además de que éste se obtiene de una única especie de agave (*Agave tequilana* Weber), y, por último, el proceso para la obtención del tequila es mayormente industrializado, esto marca una gran diferencia respecto al mezcal (tabla 2.2) (Pérez-Hernández *et al.*, 2016).

Tabla 2.2. Principales diferencias entre el Tequila y el Mezcal

Tequila	Mezcal
Una especie de agave: <i>Agave tequilana</i> (NOM-006-SCFI-1994)	Varias especies de agave: Los más utilizados son <i>Agave angustifolia</i> , <i>Agave esperima</i> , <i>Agave potatorum</i> y <i>Agave salmiana</i> (NOM-070-SCFI-2016)
*Proceso tecnificado/ industrializado	*Proceso artesanal
Región con denominación de origen reducida (proceso más estandarizado).	Región con denominación de origen amplia y dispersa (variabilidad en la elaboración de mezcal en cada región).

*Etapas de producción consisten en: la selección y corte de la materia prima (en edad óptima), la cocción del agave, la molienda del mosto, la fermentación del jugo, la destilación, la rectificación y la maduración del destilado. Adaptado de Pérez-Hernández *et al.*, (2016).

2.6 El agave y el mezcal

2.6.1 Diversidad de especies agave para elaborar mezcal y carbohidratos de reserva

Para producir este destilado se utilizan por lo menos 28 de especies de agave a lo largo y ancho del país, en más de 20 estados de la república (Montero-Villanueva, 2017). Los mezcales provenientes de estos agaves, se distinguen entre ellos por el aroma y sabor, gracias a que poseen diversos compuestos volátiles y no volátiles, los cuales al mezclarse dan como resultado sus características sensoriales, de igual forma, el mezcal contiene concentraciones altas de compuestos volátiles como el metanol y alcoholes superiores, a su vez tiene los mismos compuestos en bajas concentraciones tales como ésteres, aldehídos, cetonas, entre otros. Cabe destacar

que, el origen de los componentes volátiles es indefinido, ya que pueden formar parte de la materia prima (varía entre especies), depende de la región geográfica, las condiciones ambientales y de cultivo, también se pueden obtener durante el proceso de fermentación del mosto y la cepa empleada, o en el proceso final de la maduración del mezcal (Gómez-Zamora *et al.*, 2016)

Un aspecto importante, es la cantidad y el tipo de carbohidratos que contienen las piñas de agave, ya que éstos son empleados por los microorganismos (bacterias y/o levaduras) para la obtención de etanol.

De acuerdo con Wesche (2000), las plantas de agave tienen carbohidratos de reserva, conocidos como polímeros de fructosa (fructosanos), como la inulina, los cuales son solubles en agua y de menor tamaño a diferencia de las moléculas de almidón. Cabe destacar que, los fructanos son carbohidratos de reserva porque la planta los mantiene durante su desarrollo para poder florecer. Por otro lado, la inulina es un polímero lineal y se conforma por cadenas de 25 a 35 residuos de fructosa unidas por enlaces glucosídicos $\beta(2-1)$, con una molécula de sacarosa final. Por ejemplo, se ha reportado que las piñas de la especie *A. tequilana* Weber, contienen aproximadamente un 75% de carbohidratos, de los cuales se han identificado glucosa, dextrinas, almidón y principalmente inulina (Justo *et al.*, 2001).

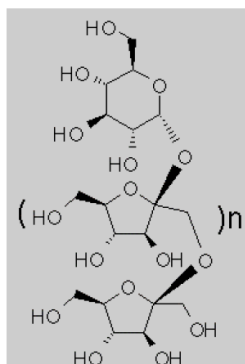


Figura 2.3 Molecula de inulina (Justo *et al.*, 2001)

Ésta última, se degrada durante el cocimiento del agave dando como resultado su descomposición (hidrólisis de fructanos), en moléculas de fructosa. La fructosa y la glucosa, son un tipo de carbohidratos, conocidos como reductores, los cuales se emplean para obtener alcohol mediante la fermentación, debido a que la fructosa

es un sustrato fácil de metabolizar y accesible para las levaduras. La cantidad de los azúcares reductores totales (ART), va de entre el 20 y 30% en peso. Sin embargo, se desconoce el porcentaje total de carbohidratos que contienen las piñas de agave, ya que influyen aspectos como: tamaño de piña, su tiempo de maduración, condiciones de proceso, además son cultivadas en diferentes regiones, y la selección de la materia prima se basa en el conocimiento empírico del maestro mezcalero («Evaluación del Contenido de Azúcares En Piñas de Agave Mezcalero Producido En la Región SE del Estado de Durango», 2016).

Las diversas especies de agave también son empleadas para elaborar diferentes bebidas tradicionales como lo son el *Tequila*, *Bacanora*, *Sotol*, *Raicilla* y *Mezcal* (dependiendo de la región), la mayoría de ellas utilizan un proceso similar para su producción. Como se observó en la tabla (2.2), a grandes rasgos, estas bebidas se diferencian en cuanto a la especie de agave empleada y el nivel de industrialización en su respectivo proceso (CIATEJ, 2020).

Un dato relevante es, que las especies utilizadas en la producción de mezcal, la mayoría son recolectadas de zonas silvestres (Torres *et al.*, 2015) y de las 14 especies de agave más empleadas para esta actividad, dos de ellas, son cultivadas en plantaciones agroindustriales monoespecíficas: *Agave tequilana* (empleada para la producción del Tequila) y *Agave angustifolia* (Aguirre y Eguiarte, 2013), el cual es principalmente cultivado en el estado de Oaxaca, a su vez es la especie de mayor producción del mezcal comercial (CONABIO, 2006; Gentry, 1982) (Pérez-Hernández *et al.*, 2016).

Oaxaca siendo uno de los estados en donde se produce mezcal en mayor medida, sus productores utilizan generalmente al “maguey espadín” (*Agave angustifolia*) y al “maguey tobariche” (*Agave potatorum*), aunque éste último en menor proporción, debido a sus características fisiológicas (Cházaro, 2007), por otro lado, en las montañas de la sierra madre del sur, los productores utilizan al *Agave cupreata* para elaborar el mezcal, en el estado de Guerrero (Pérez-Hernández *et al.*, 2016).

2.6.2 La maduración del agave para la producción de mezcal

Con la finalidad de que la “piña” o “cabeza” del maguey se ensanche y produzca más azúcares, no es extraída del campo hasta que emerja su escapo floral, cabe destacar que, el tiempo de floración es diferente para cada especie, puede ser de

los 6 a 15 años, (Zizumbo-Villarreal *et al.*, 2009., SIAP, 2018., Fonseca Varela, 2020).

Por lo general, y cuando el tipo de reproducción lo permite, en el campo la reproducción vegetativa para el cultivo del agave mezcalero se realiza trasplantando hijuelos de plantas maduras seleccionadas que tienen cualidades reproductivas, las cuales permiten al agricultor conservar las características ideales en sus próximos cultivos (Martínez *et al.*, 2007., Zizumbo-Villarreal *et al.*, 2009).

2.6.3 Racionalidad en el sistema de cultivo tradicional

De acuerdo con Zizumbo-Villarreal *et al.*, (2009) el sistema de racionalidad para la producción de agave, en términos socioeconómicos consiste en: 1) producir de manera continua todo el año y entre años sembrar y cosechar de manera continua; 2) adecuar la oferta con la demanda a través de cosechas escalonadas, a partir del intercambio y de la compra de plantas a productores locales; 3) generar valor agregado al elaborar y comercializar directamente el licor, y 4) reinvertir parte de las ganancias de la comercialización en el sistema de cultivo milpa para lograr su continuidad.

Los niveles de racionalidad son manipulados por el productor, tales como: el proceso de elaboración del mezcal, su comercialización y la producción de la planta, estos niveles se pueden adaptar a la oferta con la demanda (Zizumbo-Villarreal *et al.*, 2009).

2.7 Impacto Económico

La población mexicana tiene una fuerte relación con el agave, gracias a que esta planta cubre varias de las necesidades de los pobladores de las zonas con climas áridos del país, a su vez son la materia prima más importante para las actividades económicas generadoras de empleo y riqueza como lo son la industria del mezcal, el tequila y fibras naturales (Esqueda *et al.*, 2011., SIAP, 2017).

2.7.1 Las industrias que utilizan plantas de agave

Hoy en día, los tallos o “piñas”, al igual que los quiotes (inflorescencias inmaduras) y sus flores, forman parte de la alimentación en varias regiones del país, así como las hojas que se utilizan como forraje para el ganado. Además, las partes del agave son ricas en carbohidratos, entre ellos los fructanos e inulina, son fibra que favorece

a la salud intestinal y mejoran la metabolización de lípidos ya que tienen un efecto prebiótico, y es por ello que se pueden elaborar diversos productos alimenticios a partir de ellos («Alimentos Enriquecidos Con Fibra de Agave», 2017).

Por otro lado, el aguamiel, el cual se obtiene de la piña y de la base del quiote, es una bebida y complemento muy importante en la dieta (rico en azúcares fermentables con función prebiótica) . De igual manera, ésta se puede fermentar para elaborar pulque, esta bebida contiene minerales como calcio, fósforo, hierro y zinc, también aporta bacterias acidocáticas, probióticos que ayudan al bienestar del sistema digestivo, al igual que se pueden concentrar los azúcares para obtener la miel de agave o también ser procesada para obtener fructosa (Domínguez *et al.*, 2008., SIAP, 2017., CONABIO, 2021).

Ramales-Orsorio y Barragán-Ramírez (2002)., Ortiz-Bravo (2006), indican que, la industria del mezcal fortalece y favorece a la economía del estado de Oaxaca, ya que este estado presenta altos índices de pobreza, y la generación de empleos al igual que las divisas obtenidas por las exportaciones de este destilado mantienen estables sus ingresos económicos, de tal manera que se evitan fenómenos como la emigración. Los autores citados están de acuerdo en que la industria del mezcal es una de las pocas manufactureras que existen en Oaxaca, y es de gran importancia para el desarrollo económico y social del mismo. Para la industria de bebidas, las plantas de agave son de especial interés, gracias a que estas plantas acumulan azúcares de reserva como las agavinas o fructanos (polímeros de fructosa), durante toda su vida (Arrizón-Gaviño, 2020), cada Kg de piña de agave puede contener 200 g o más de estos carbohidratos (Mellado, E., y López, M, 2012., Juárez *et al.*, 2020).

Debido a sus características sobresalientes, estas especies se convierten en materia prima de alto valor comercial, su composición en carbohidratos da como resultado la producción de jarabes obtenidos de estos agaves.

Huezcas-Garrido., *et al* (2022) señalan que el jarabe derivado del agave es un producto alto en fructosa (87%), bajo en glucosa (10%) de aquí su importancia económica.

2.8 Producción y exportación del Mezcal

México posee la denominación de origen tanto del tequila como del mezcal; cabe destacar que, ambas bebidas son altamente demandadas en el mercado internacional (SIAP, 2016).

2.8.1 Principales exportaciones

De acuerdo con SIAVI (2017). En 2016 las exportaciones mexicanas del mezcal alcanzaron los 26 millones de dólares, éstas fueron principalmente a Estados Unidos, Taiwán y países miembros del bloque de la Unión Europea, con un volumen de aproximadamente 2.71 millones de litros. Además, la misma fuente estima que para el periodo de 2016-2030 la producción potencial de agaves puede aumentar en un 1.61% mientras que, el crecimiento de agaves mezcaleros tenga un aumento del 0.51 % y en ese mismo porcentaje aumenten las exportaciones de mezcal (Tabla 2.5).

Tabla 2.3. Estimaciones y crecimiento económico del Mezcal y el Tequila

AÑO/PERIODO	ESTIMACIONES**				CRECIMIENTO ACUMULADO**				CRECIMIENTO PROMEDIO ANUAL**	
	2016	2018	2024	2030	2003-2016	2016-2018	2016-2024	2016-2030	2003-2016	2016-2030
Producción potencial de agave*** (miles de toneladas)	1,667.82	1,732.58	1,926.42	2,120.27	282.72%	3.88%	11.19%	27.13%	10.88%	1.61%
Producción potencial de agave mezcalero*** (miles de toneladas)	208.12	210.49	217.62	224.75	-31.10%	1.14%	3.39%	7.99%	-2.82%	0.51%
Exportaciones de tequila (millones de litros)	173.42	179.47	198.92	220.47	92.95%	3.49%	10.83%	27.13%	5.19%	1.61%
Valor de exportaciones (millones de dólares a precios de 2016)	1,203.31	1,245.28	1,380.21	1,529.75						
Exportaciones de mezcal (millones de litros)	2.71	2.74	2.83	2.93		1.10%	3.35%	7.99%		0.51%
Valor de exportaciones (millones de dólares a precios de 2016)	26.81	27.11	28.02	28.96						

Fuente: Elaboración propia con datos del SIAP, el SIAVI, CRT y CRM.

* Representa la participación del valor de la producción de 2016 con respecto al PIB agrícola del mismo año.

** Estimaciones realizadas por la Coordinación de Asesores de la Subsecretaría de Agricultura.

*** Estimada con base en la capacidad instalada actual, rendimientos de referencia históricos y considerando que no se incrementará la frontera agrícola reportada en 2016.

Notas: Las cifras oficiales pueden no cuadrar debido a redondeo y/o reexpresión.

Las exportaciones de mezcal se iniciaron en 2012; las tasas de crecimiento son exorbitantes y por lo tanto no se reflejan.

Por otro lado, SIAVI (2017) y el IMPI (2016), señalan que son 669 municipios de la república mexicana los que cuentan con denominación de origen para la producción de tequila y 731 para la producción de mezcal (Tabla 2.6).

Tabla 2.4. Denominación de Origen de Tequila y Mezcal

Destilado	Denominación de origen (Registro OMPI)	Extensión de la denominación de origen	Fecha DOF D.O.	NOM
Tequila	669	Jalisco, Guanajuato, Nayarit, Michoacán y Tamaulipas	09/xii/1974	NOM-006-SCFI-2005
Mezcal	731	Oaxaca, Guerrero, Durango, San Luis Potosí, Zacatecas, Guanajuato, Tamaulipas, Michoacán y Puebla	28/xi/1994	NOM-070-SCFI-2016

Fuente: IMPI, DOF, 2016.

* El dato de agave contempla el agave mezcalero y el agave tequilero reportado por el SIAP; en el caso de este último, no utilizado para el envasado de tequila, se emplea para la producción de bacanora, sotol, miel de agave (inulina), aloe y henekén, entre otros.

** El consumo nacional representa la demanda total del cultivo por tipo de uso en el periodo analizado.

Actualmente, cualquier aspecto que consterna al tequila y al mezcal, es sustentado por organismos como lo son, el Consejo Regulador del Tequila y el Consejo Regulador del Mezcal, lo cual optimiza la implementación de reglamentaciones e información (SAGARPA, SIAP, 2017).

A continuación, en la Tabla 2.7 se muestra la distribución de la disponibilidad de tequila y mezcal referida a su producción, exportación y consumo nacional.

Tabla 2.5. Distribución de la disponibilidad de Tequila y Mezcal en México (miles de litros). Adaptado de SAGARPA, 2017.

Destilado	Producción*	Exportaciones**	Consumo nacional***
Mezcal	3,028	2,013	315
Granel		0****	
Envasado		2,013	
Tequila	273,300	197,932	75,368
Granel		86,352	
Envasado		111,580	

*CRT y CRM, 2017

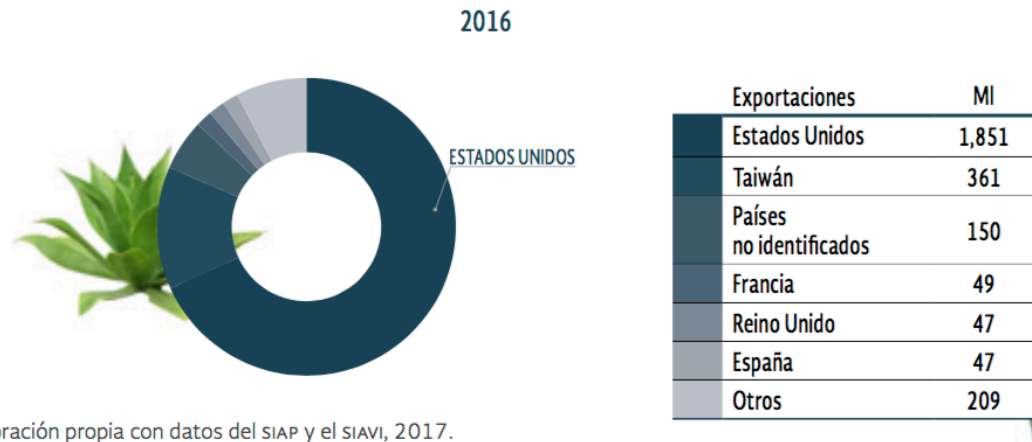
** SIAVI, CRT y CRM, 2017.

*** Consumo= (producción-importación)-exportación.

**** De acuerdo con la NOM-070-SCFI-2016, la exportación a granel del mezcal está prohibida.

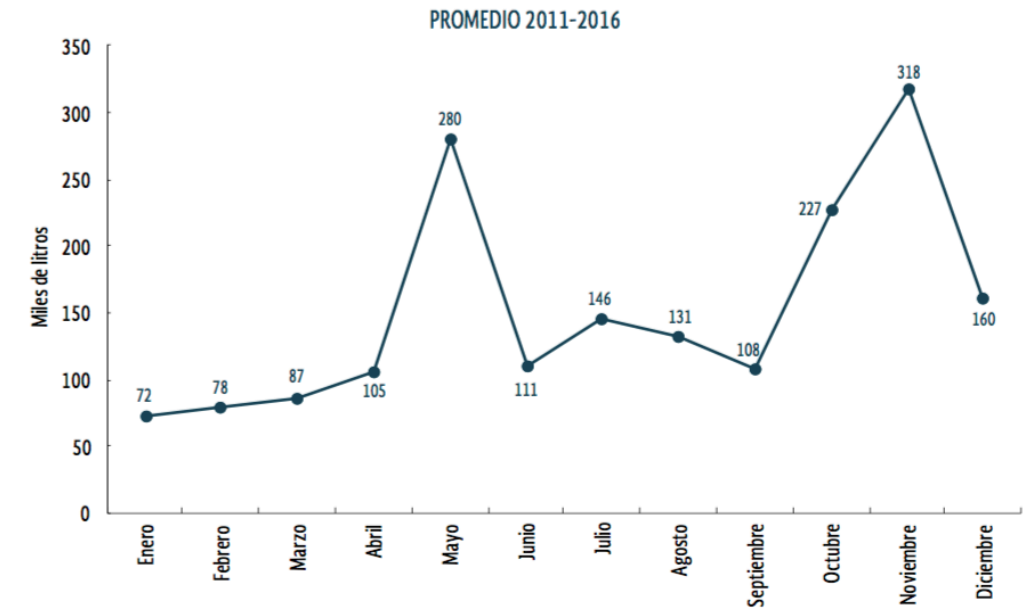
SIAVI y SAGARPA (2017) señalan que, el principal país al que se exporta mezcal actualmente son los Estados Unidos con un total de 1, 851 millones de litros anuales, en segundo lugar, se encuentra Taiwán con 361 millones de litros (Tabla 7.8).

Tabla 2.6. Destinos de Exportaciones del Mezcal



En lo que se refiere a la estacionalidad (ésta depende de los ciclos productivos y de las variaciones de la demanda en función a la época del año, en general esta variable se refiere al aumento en la demanda del producto, en este caso de manera anual) para las exportaciones de mezcal, los meses de mayor exportación, en promedio, fueron mayo, octubre y noviembre (Gráfica 1.0) (SIAP, SIAVI, 2017).

Gráfica 1.0. Estacionalidad de Exportaciones de Mezcal

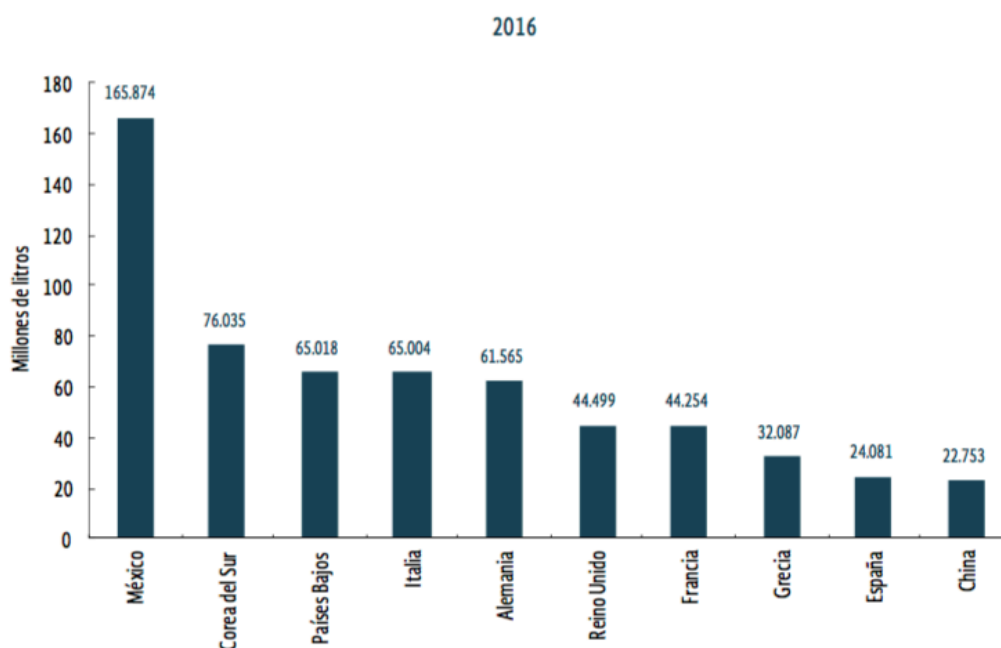


2.8.2 Relevancia en el mercado internacional de bebidas alcohólicas

Como se mencionó anteriormente, el tequila y el mezcal pertenecen al mercado internacional de bebidas espirituosas, de igual manera, tienen denominación de origen gracias a su producción geográfica, como el brandy y el whisky escocés. Es por esta razón que se lleva a cabo un análisis del mercado internacional, ya que, no existe la denominación de origen para destilados de agave, ni, competencia. (SAGARPA, 2017).

En el mismo estudio, SIAVI y SAGARPA (2017) reportan que México se encuentra en el primer lugar como exportador mundial de bebidas espirituosas con 165, 874 millones de litros vendidos al mercado internacional, estas bebidas incluyen al tequila y al mezcal, como se puede observar en la Gráfica 2.0.

Gráfica 2.0. Principales exportadores mundiales de bebidas espirituosas



Fuente: Elaboración propia con datos de UN COMTRADE e ITC, 2017.

Por otro lado, el reconocimiento internacional se obtiene gracias a que, el tequila y el mezcal poseen denominación de origen, por lo que algunos países han otorgado reconocimiento a ambos destilados (SAGARPA, 2017). En la siguiente tabla se mencionan los tratados o acuerdos de los países que reconocen la denominación de origen para el tequila y el mezcal, (Tabla 2.9).

Tabla 2.7. Reconocimiento de países a la denominación de origen de bebidas espirituosas destiladas de agave

DE BEBIDAS ESPIRITUOSAS DESTILADAS DE AGAVE		
Tratado / Acuerdo	País(es)	Destilado
Acuerdo de Lisboa	Argelia, Bosnia Herzegovina, Bulgaria, Burkina Faso, Congo, Costa Rica, Cuba, Eslovaquia, Ex República Yugoslava de Macedonia, Francia, Gabón, Georgia, Grecia, Haití, Hungría, Irán, Israel, Italia, Marruecos, Montenegro, Nicaragua, Perú, Portugal, República Checa, Moldavia, Corea del Sur, Rumania, Serbia, Togo, Túnez y Turquía	Tequila y mezcal
TLCAN	Estados Unidos y Canadá	Tequila y mezcal
TLCUEM	Portugal, España, Francia, Alemania, Italia, Austria, Hungría, Polonia, Bélgica, Países Bajos, Reino Unido, Dinamarca, Finlandia, República Checa, Suecia, Lituania, Estonia, Bulgaria, Rumania, Grecia, Irlanda, Luxemburgo, Chipre, Croacia, Eslovenia, Eslovaquia, Malta y Letonia	Tequila y mezcal
TLC AELC	Suiza, Noruega, Islandia y Liechtenstein	Tequila y mezcal
ACE 60	Uruguay	Tequila y mezcal
TLC Japón	Japón	Tequila y mezcal
ACE 53	Brasil	Tequila
TLC Colombia	Colombia	Tequila y mezcal
TLC Chile	Chile	Tequila y mezcal
Alianza del Pacífico	Perú, Colombia, Chile	Tequila y mezcal
ACE 6	Argentina	Tequila y mezcal
TLC Centroamérica	Honduras, Belice, Guatemala, Nicaragua, Costa Rica y El Salvador	Tequila y mezcal
TLC Panamá	Panamá	Tequila y mezcal
ACE 66	Bolivia	Tequila y mezcal
ACE 54	MERCOSUR	Tequila y mezcal
TLC Israel	Israel	Tequila y mezcal
ACE 67	Perú	Tequila
Otros instrumentos legales (v. gr. memoranda de entendimiento adjunto al Protocolo de Adhesión a la OMC).	China, India, Vietnam, Singapur, Nueva Zelanda, Hong Kong, Ucrania, Rusia, Sudáfrica, Turquía, Emiratos Árabes Unidos, Taipéi Chino, Tailandia y Australia	Tequila y mezcal

Recuperado de (SAGARPA, 2017)

De acuerdo con la secretaría de economía (2020), los acuerdos contienen obligaciones para México y otros países, con el fin de garantizar que las denominaciones de origen protegidas se presenten únicamente para las bebidas

espirituosas del país de origen y solo puedan ser utilizadas de acuerdo a las leyes y regulaciones de dicha parte. A su vez, el acuerdo otorga protección contra el uso inadecuado de las denominaciones protegidas, garantiza el comercio internacional de estas bebidas, respetando sus orígenes y fomentando su protección en el territorio de los socios comerciales del país. Cabe destacar que, México junto con la unión europea y los EUA actualizaron su tratado, para reconocer y proteger también al “bacanora” y “raicilla”, éste ya incluía al “mezcal”, “sotol” y “charanda” (Secretaría de Economía, 2020).

2.8.3 El crecimiento en la producción de mezcal

De acuerdo con el informe estadístico 2023, elaborado por el COMERCAM, la producción del mezcal se encuentra en crecimiento tal como muestra la siguiente figura, durante el 2022, el estado con mayor porcentaje (91.31%) de la producción total de mezcal fue el estado de Oaxaca, Figura 2.4.

- **Producción por año (Referido a 45 % alc. Vol.)**

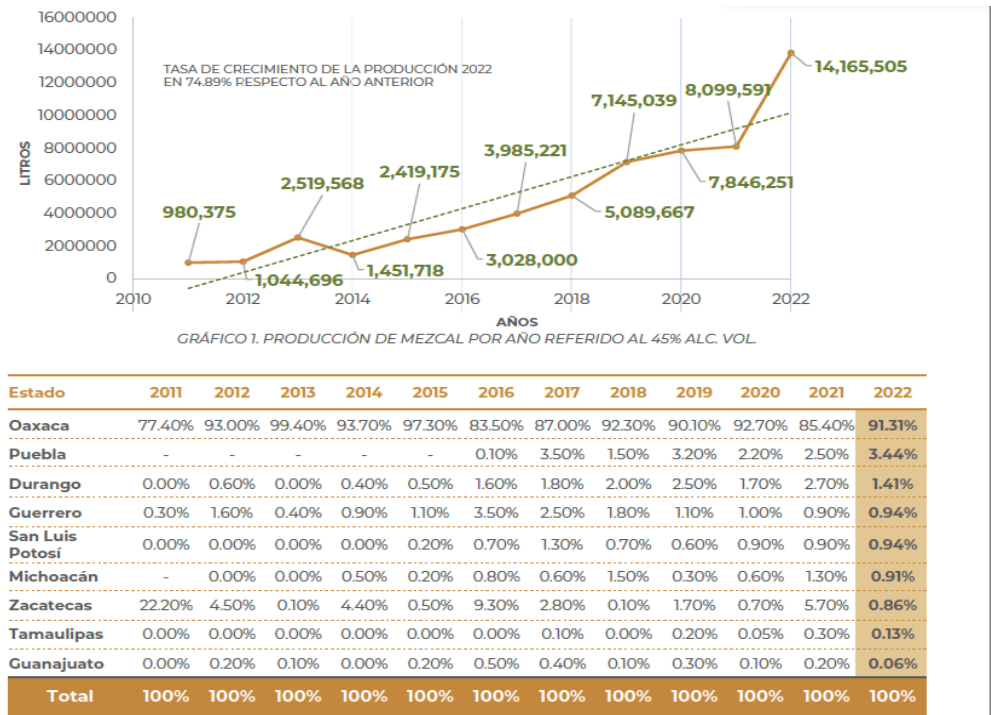


Figura 2.4. Producción de mezcal por año del 2011-2022 (COMERCAM, 2023)

La producción nacional de mezcal 2022 referido a 45 % Alc. Vol. Equivale a 14,165,505.00 litros, siendo Oaxaca el principal estado productor con el 91.31 %.

- **Producción por categoría (Referido a 45 % Alc. Vol.)**

La producción nacional de mezcal 2022 referido a 45 % Alc. Vol. Equivale a 14, 165, 505. 00 litros, siendo la categoría de **Mezcal artesanal** la principal producida con el 95.35 % (COMERCAM 2022) figura 2.5.

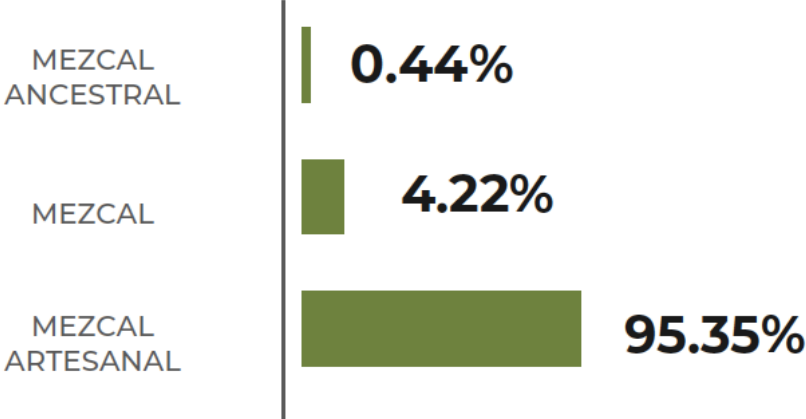


Figura 2.5. Producción de mezcal por categoría (COMERCAM, 2023)

- **Producción por Clase (Referido a 45% Alc.Vol.)**
La producción nacional de mezcal 2022 referido a 45% Alc. Vol. Equivale a **14, 165,505.00 litros**, siendo la clase; Blanco o joven la principal producida con el **98.78%** (COMERCAM, 2023) Figura 2.6.

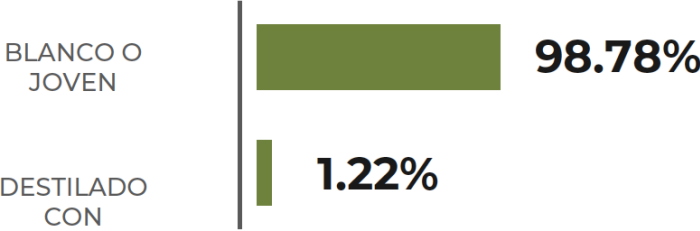


Figura 2.6. Producción nacional de mezcal por clase (COMERCAM, 2023)

- **Producción por Especie (Referido a 45% Alc. Vol.)**
La producción nacional de mezcal 2022 referido a 45% Alc. Vol. Equivale a 14, 165,505.00 litros, siendo la especie; Maguey o agave espadín la principal empleada

para la producción con el 81.08 %, y colocando al maguey tobalá (*Agave potatorum*) en el quinto lugar con un porcentaje del 1.50 % del total de la producción (COMERCAM, 2023) Figura 2.7.

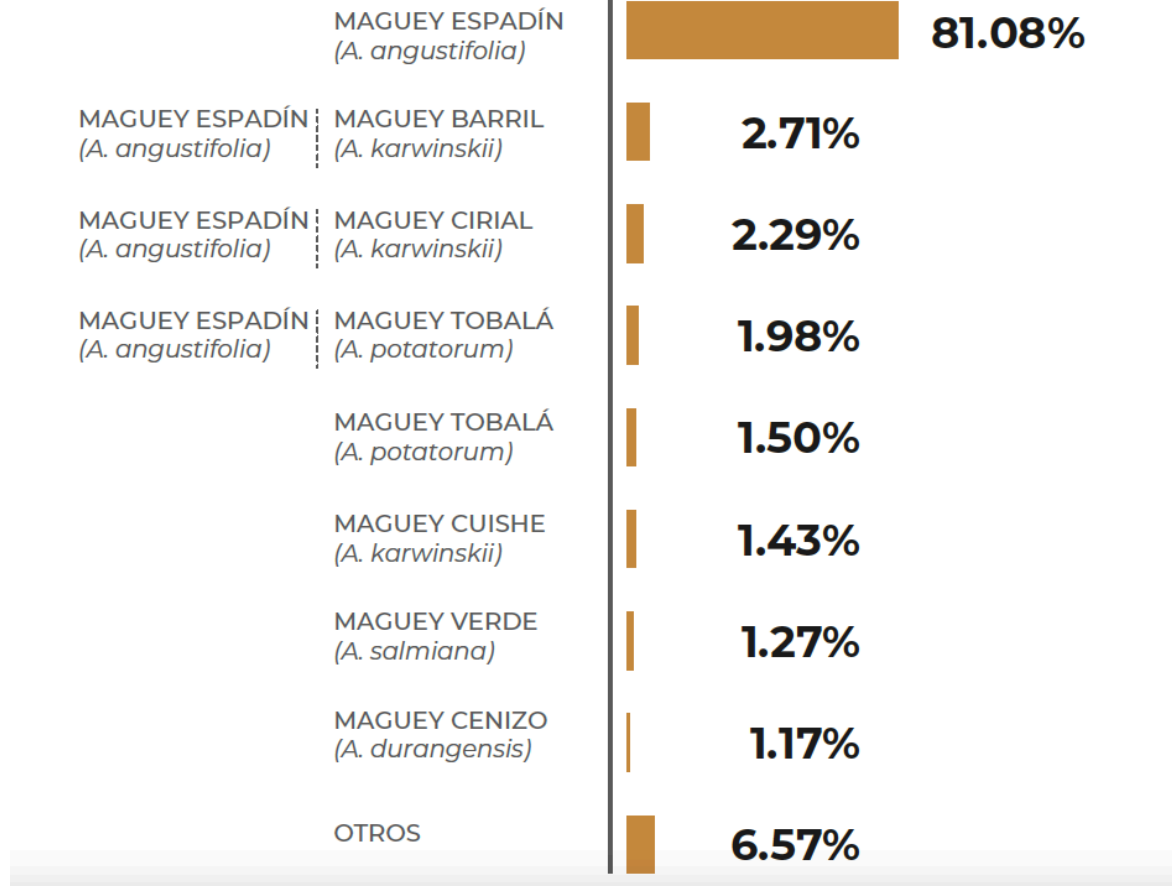


Figura 2.7. Producción nacional por especie de agave (maguey) (COMERCAM, 2023)

2.9 Proyección a futuro

2.9.1 Resultados del crecimiento en ventas y exportación

De acuerdo con Pérez-Hernández *et al.*, (2016). El mezcal tiene un ascenso en las altas posiciones del mercado internacional y sus estadísticas son prometedoras. A su vez, SAGARPA (2017) indica un crecimiento en la producción del agave mezcalero de 208.12 a 224.75 Mt (miles de toneladas) para el año 2030, por lo que se espera un crecimiento en las exportaciones de mezcal del 7.99 %.

Actualmente, existen más de 5,297 asociados al COMERCAM, 397 marcas exportadas, 230,000 empleos en la industria, además el sector del mezcal presenta 15, 686 MDP en el valor de la categoría, y para al cierre del año 2022 se exportaron 8.5 millones de litros (COMERCAM, 2023).

Al final del 2022, se encontraron las siguientes estadísticas: el estado con mayor porcentaje (91.31%) de la producción total de mezcal fue el estado de Oaxaca, la categoría de mezcal artesanal fue la principal producida con el 95.35 %, de igual manera la clase blanco o joven fue la principal producida con el 98.78 % y la especie de agave espadín, fue la principal empleada para la producción con el 81.08 %. De acuerdo con el mismo estudio de el COMERCAM, el agave tobalá (*Agave potatorum*) quedó en el quinto lugar con un porcentaje del 1.50 % del total de la producción.

Capítulo 3. Reproducción de *A. potatorum* y otros Agaves: Sistema tradicional y por CTV como alternativa

En este capítulo se presentan las bases sobre el tipo de reproducción natural que lleva a cabo el género agave, posteriormente se hablará de la problemática que acontece *A. potatorum* en cuanto a su propagación sexual, posteriormente se abordará la alternativa más viable para la propagación de esta misma especie con ayuda de la biotecnología vegetal y su técnica de cultivo de tejidos, así como la descripción del proceso de micropropagación y sus vías regenerativas.

Abreviaturas: ABA (Ácido abscísico), AG3 (Ácido giberélico), AFLP (Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción Amplificados), AIA (Ácido indol-3-acético), AIB (Ácido indolbutírico), BA (Bencilaminopurina), BIG (Biorreactores de Inmersión por gravedad), CTV (Cultivo de Tejidos Vegetales), IBA (Ácido Indol-3- Butírico), KIN (Cinetina), LED (Light Emitting Diode), L (Litros), mg (miligramos), μ mol (micromol), MS (medio Murashige y Skoog), NAA (Ácido naftalenacético), PEG (polietilenglicol), RADP (ADN Polimórfico Amplificado al Azar), RC (Reguladores de Crecimiento), RCV (Reguladores de Crecimiento Vegetal), SH (medio Scheck y Hildebrandt), SIT (Sistemas de Inmersión Temporal), TDZ (Tidiazurón), 2,4-D (Ácido diclorofenoxiacético).

3.1 Reproducción y propagación de los Agaves

3.1.1 Aspectos generales de la reproducción natural en las especies de agave

Los agaves son plantas perenes que se reproducen tanto sexual como asexualmente, sin embargo, la forma de reproducción más generalizada, en condiciones silvestres, es la asexualmente a través de dos tipos de estructuras, estos son, los rizomas, así como también por bulbillos (Valenzuela *et al.*, 2003., Sánchez-Mendoza *et al.*, 2017). La otra forma de reproducción es sexual, algunas especies se reproducen a través de este sistema; y es a través de la polinización de las flores que dan paso a la formación de los frutos los cuáles producen miles de semillas, pero son escasas las semillas viables y que, al final germinan para dar lugar a un individuo nuevo en el ambiente silvestre (García-Mendoza, 2007., Sánchez-Mendoza *et al.*, 2017). Además, son pocas las plántulas que logran establecerse por falta de condiciones ambientales adecuadas para su crecimiento y desarrollo (Eguiarte *et al.*, 2000., Sánchez-Mendoza *et al.*, 2017). Cabe resaltar que, los individuos originados de semilla son de suma importancia porque permiten la variabilidad genética y con ello la estructura y dinámica de las poblaciones de maguey, al igual que contribuyen a la sobrevivencia de las especies. En la figura xxx se muestra la reproducción por semilla (Ramírez-Tobías *et al.*, 2012., Sánchez-Mendoza *et al.*, 2017).

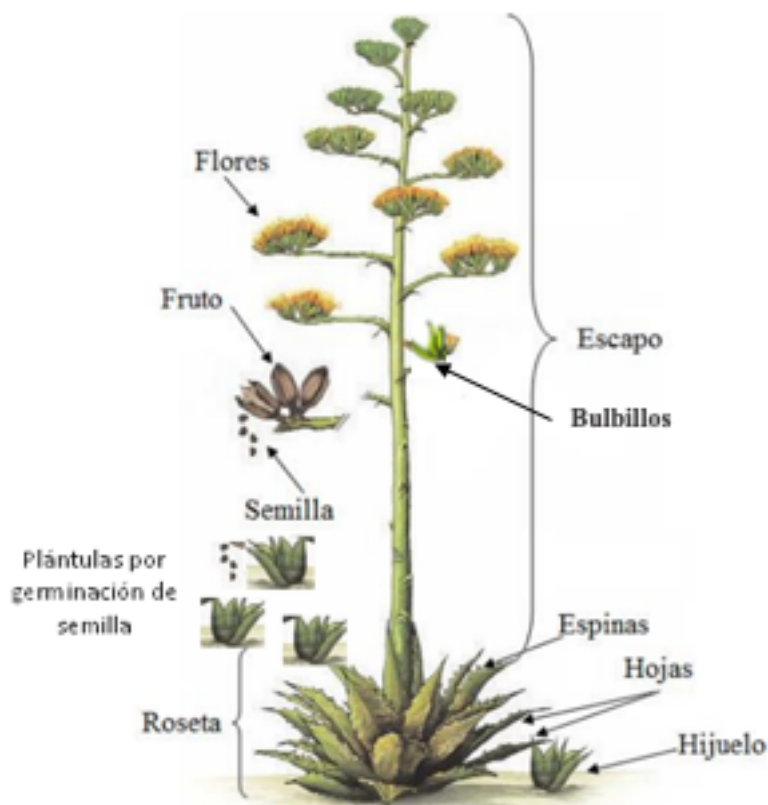


Figura 3.0. Morfología de la planta y formas de reproducción natural de algunas especies del género *Agave* (Modificada de Medina, 2014)

3.2 Formas de propagación convencional de agaves

3.2.1 Mecanismos de reproducción natural

Básicamente, existen dos formas de propagación de los agaves: 1) sexualmente a través de semillas o 2) asexualmente mediante hijuelos, rizomas, bulbillos o técnicas de cultivo de tejidos vegetales (CONABIO, 2021). Estas últimas conservan la potencialidad de multiplicación y diferenciación celular para generar nuevos individuos con partes vegetativas de la planta (Osuna-Fernández *et al.*, 2017).

3.2.2 Propagación sexual en plantas de agave

La reproducción sexual se efectúa de forma natural e involucra a órganos y células especializadas teniendo lugar la unión de dos células sexuales o gametos. El ciclo sexual, permite la generación de plantas individuales distintas presentando características de los gametos masculino y femenino. Este sistema de reproducción en condiciones silvestres es muy importante, ya que la semilla es el órgano de propagación a través del cual se conserva la variabilidad genética y permite la

dispersión de las especies (Osuna-Fernández *et al.*, 2017). De acuerdo con Oronoz *et al.*, (1983) y Duque-Sánchez (2013), en la reproducción por semillas (sexual) se presenta cierta variación genética y/o segregación entre las plantas hijas lo que permite que la especie no sea amenazada, ya que éstas heredan y mezclan los genes de la planta madre y de la otra de la cual proviene el polen.

3.2.3 Propagación asexual (bulbillos e hijuelos) en plantas de agave

Los magueyes tienen otro medio de reproducción, que es por medio de bulbillos e hijuelos (CONABIO, 2021). Los bulbillos son yemas adventicias que se desarrollan en una yema y crecen a lo largo de los márgenes de las hojas, estas yemas cuando están un poco más crecidas, y después de un determinado tiempo caen al suelo, en donde comienzan a formar raíces adventicias y, finalmente, crecen formando una nueva planta con las mismas características genéticas y morfológicas de la planta madre (Duque-Sánchez, 2013., CONABIO, 2021). Este método de propagación presenta algunas desventajas, ya que si la planta madre presenta alguna enfermedad estos bulbillos pueden propagar dicha enfermedad. Gentry (1982) y Duque-Sánchez (2013) señalan que, además de la propagación de enfermedades, el tiempo y costo de producción es mayor que cuando se propaga por hijuelos rizomatosos.

Por otro lado, los rizomas o hijuelos crecen generalmente en un plano horizontal a la planta madre, el cual es paralelo a la superficie del suelo, además, los rizomas poseen yemas en la cara superior de donde se originan ramas, hojas y flores aéreas y en la cara inferior generan raíces adventicias (Oronoz *et al.*, 1983., Duque-Sánchez, 2013), dando como resultado hijuelos más vigorosos, que nacen en el cuello de la planta madre (CONABIO, 2021). El sistema de propagación más utilizada es la vía asexual, ya sea por rizomas o por bulbillos, sin embargo, la propagación por rizomas es la más empleada, no sólo por que conserva las características genéticas, sino porque el crecimiento y el desarrollo de las plantas son más rápidos y vigorosos que con los bulbillos (Duque-Sánchez, 2013). Cabe destacar que, tanto los bulbillos como hijuelos son genéticamente iguales a la planta que los produjo, o sea, son clones. Un clon puede definirse como una o varias plantas obtenidas por multiplicación vegetativa a partir de un solo individuo. Este sistema de reproducción es una práctica agrícola que se utiliza desde tiempos

ancestrales para preservar los buenos caracteres de las plantas madre. Por ello, es de suma importancia que se mantengan intactos los genotipos en cuanto a las características seleccionadas, debido a que no tendrá lugar la recombinación genética que caracteriza la reproducción sexual (Trippi, 2007., CONABIO, 2021).

3.2.4 Propagación del agave en campo y producción de nuevas plantas

Algunos autores mencionan que una planta de agave puede producir durante su vida hasta 15 plántulas o hijuelos, según su edad, éstos pueden tener diferente vigor y calidad (Duque-Sánchez, 2013). Cabe destacar que, la propagación de los agaves en campo puede darse por medio de tres vías diferentes, bulbillos, hijuelos, y por semillas, sin embargo, esto dependerá de cada especie, en la figura 3.0 se muestran las tres vías de reproducción (CONABIO, 2006).

La mejor edad para que el agave pueda reproducirse se encuentra entre los tres y cinco años (Paredes-López, 2002). Por otra parte, una planta madre da entre uno y dos hijuelos por año, aunque esto depende de la especie cultivada y de las condiciones ambientales (Duque-Sánchez, 2013). Se ha reportado que al final de su vida, los agaves mezcaleros del Altiplano, producen el quiote o inflorescencia, en donde las flores surgen y si son polinizadas, forman semillas, y si no se lleva a cabo la polinización, entonces se desarrollan hijuelos a partir del rizoma o raíz (Esparza, *et al.*, 2015)

En la figura 3.0, se puede observar la representación gráfica de una planta de agave con formación de hijuelos o bulbillos, de igual manera, se presenta al “quiote” o tallo, que puede alcanzar hasta los 10 m de altura y en su extremo más alto se encuentran sus flores, también conocidas como “gualumbos”, en donde además se producen las semillas (SIAP, 2018).

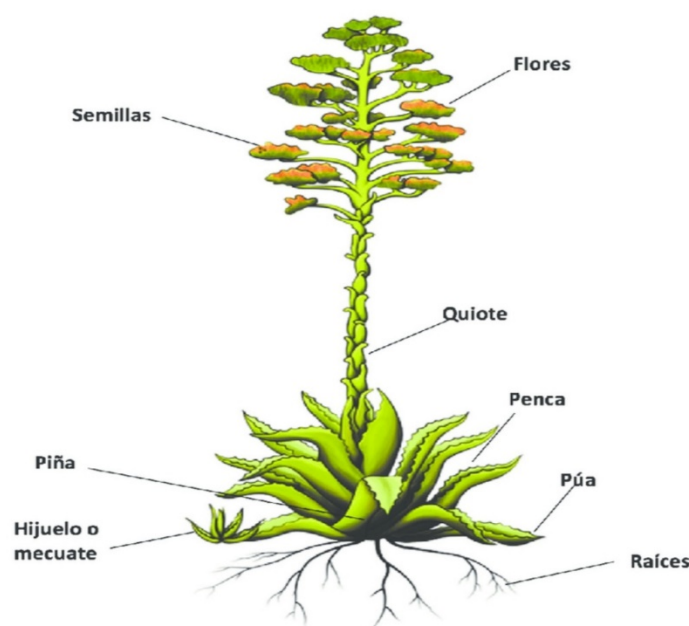


Figura 3.1. Forma de reproducción asexual del agave, formación de hijuelos (León, 2014).

3.3 Reproducción sexual por semilla del *A. potatorum*

3.3.1 Tipo o vía de reproducción natural de *A. potatorum*

El *Agave potatorum* (tobalá) es una especie silvestre que se caracteriza por la reproducción natural, la cual es únicamente a través de semilla (Vera-Guzmán *et al.*, 2009., García-Mendoza, 2010., Gutiérrez-Hernández *et al.*, 2020., CONABIO, 2021). Durante el ciclo sexual, la propagación se lleva a cabo por medio de semilla, y como consecuencia, se logra la obtención de nuevas plantas individuales, además cuentan con las características de las plantas que produjeron los gametos masculinos y femeninos. Por otro lado, la floración del agave tiene lugar cuando emerge el escapo floral o quíote, indicando también el final de su ciclo de crecimiento, y pasando a la etapa reproductiva, cabe mencionar que, esta especie presenta un crecimiento determinado y un solo punto de emisión de hojas, además de ser se monocarpelar, es decir, que solo una vez en su vida emerge la inflorescencia (Vicente-Ramírez *et al.*, y Del Real Laborde, 2007). Para fines comerciales es importante eliminar el escapo floral o quíote antes de que tenga lugar la maduración de las flores, ya que cuando surge el escapo floral, la planta de agave está terminando su desarrollo vegetativo e interrumpe la formación de hojas o

pencas, con ello se marca la etapa reproductiva. En este periodo tiene lugar el inicio de la despolimerización de los fuctanos, es decir, el consumo de las sustancias de reserva que se conservan en el tallo o piña, y comienza la utilización de éstos para la formación y sostenimiento de los órganos reproductores (Aguirre *et al.*, 2001).

3.3.2 Desventajas de la reproducción sexual (por semilla) para *A. potatorum*

A continuación, se enlistan algunas de las dificultades que puede presentar este proceso de propagación, cuando se tienen fines comerciales, por ejemplo:

:

- Problemas respecto a la variación genética al estar sujeto a polinización cruzada.
- Complicaciones para mantener un abasto ordenado, como consecuencia de lo prolongado del ciclo de crecimiento, ya que toma de 5 a 8 años para llegar a la etapa de floración y producción de semilla.
- La viabilidad de la semilla puede ser baja y, por ende, no se logra obtener un nuevo individuo.
- Es necesario que las plantas emitan su escapo floral para que se produzcan las inflorescencias y posteriormente las semillas (Vicente-Ramírez y Del Real Laborde, 2007).

3.3.3 Importancia de la propagación por semillas

Uno de los problemas más grandes radica en que, justo antes de que comience a emerger el escapo floral, el tallo o piña, también alcanza su máximo tamaño y contenido de azúcares, ésta última etapa coincide con el momento óptimo para su extracción o corte en campo. Lo que termina por afectar a esta especie a causa de una fuerte pérdida de producción de semillas, al igual que la disminución de variabilidad genética y, por lo tanto, en la eventual extinción de la especie (Delgado-Lemus *et al.*, 2014).

Por todas estas limitaciones se requiere destinar mayores esfuerzos de investigación hacia la propagación por semillas y con ello evitar la pérdida de variabilidad genética, esta medida o parámetro no se puede obtener con la multiplicación por vástagos vegetativos de las poblaciones silvestres y cultivadas de estos agaves, porque son clones (Robert y Arce-Montoya, 2007).

Es importante señalar que la reducción de la variabilidad genética de los agaves genera susceptibilidad a ataques de plagas y enfermedades, así como también implica poca adaptabilidad ante los cambios climáticos y, por tanto, aumentan el riesgo de su extinción (Erazo y Cárdenas, 2013., Mandujano-Bueno *et al.*, 2018)

3.3.4 El concepto de viabilidad de las semillas

La viabilidad de las semillas es un parámetro que puede ser utilizado para la medición de la actividad metabólica de sus tejidos vivos, de igual manera se puede estimar la capacidad germinativa de los lotes de semillas de interés, en resumen, determina la posibilidad que tiene una semilla de germinar (Copeland y McDonald, 2012). Para evaluar la calidad biológica de las semillas, se debe realizar una prueba de germinación normal (ISTA, 2015), la cual consiste en incubar las semillas en condiciones favorables para dar lugar a la activación del embrión y con ello se logre el crecimiento de una planta completa (Pérez-García y Pita-Villamil, 2001., Vadillo *et al.*, 2004., Langlé-Argüello *et al.*, 2017). Por otro lado, se pueden hacer pruebas de tinción para evaluar la viabilidad de las semillas. De acuerdo con el estudio realizado por Langlé-Argüello *et al.*, (2017), las semillas con una coloración intensa de tinción con solución de tetrazolio 1 % (p/v) en el 100 % del eje embrionario se consideran viables, mientras que las semillas que presentan poca o nula intensidad de coloración, o sin embrión se consideran no viables. La viabilidad puede ser expresada en porcentaje. La prueba de tetrazolio tiene las ventajas de ser rápida y no requerir una tecnología o equipos muy sofisticados. La metodología fue puesta en marcha para especies de plantas cultivadas por ISTA (International Seed Testing Association). La prueba se basa en el hecho de que los diferentes tejidos de la semilla, después de haberse hidratado, especialmente en el embrión se activan varias rutas metabólicas, en donde tienen lugar muchas reacciones químicas principalmente de oxidación. La solución de tetrazolio se difunde a través del interior de la semilla, donde la enzima deshidrogenasa reduce esta sal en los tejidos vivos (Canuto, 2012); provocando la formación de un compuesto insoluble, de color rojo llamado Formazan, lo que indica la actividad respiratoria en las mitocondrias y, por lo tanto se demuestra que la semilla es viable. Por otro lado, los tejidos muertos (no viables) no reaccionan con la solución conservando su color natural (Lazarotto, Piveta, Muniz y Reini-ger, 2011).

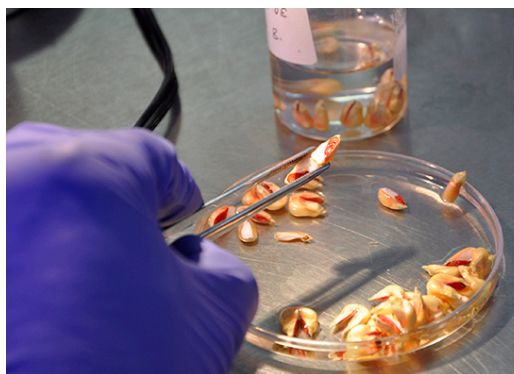


Figura 3.2. Prueba de viabilidad de semillas (SNICS, 2018)

De acuerdo con Jurado-Guerra, Melgoza-Castillo, Morales-Nieto, Royo-Márquez, y Ortega-Ochoa (2009), el cloruro de tetrazolio (utilizado en la prueba de tinción) actúa al ser reducido por las enzimas deshidrogenasas presentes en el tejido vivo produciendo un compuesto rojizo (Langlé-Argüello *et al.*, 2017)., como se puede observar en la figura 3.2.

3.4 Las semillas del *agave potatorum*

3.4.1 Tipos de semillas y su clasificación

Las semillas se clasifican por su tolerancia a la deshidratación, tanto en ortodoxas, intermedias, así como recalcitrantes (Magnitskiy y Plaza, 2007); las primeras almacenan carbohidratos y son más longevas, además su apariencia es más grande o gruesa en comparación con las últimas que poseen un contenido alto de lípidos y longevidad reducida, son de menor tamaño y más planas (Berjak y Pammenter, 2010., Gutiérrez-Hernández *et al.*, 2020).

3.4.2 Periodo de vida de las semillas

La falta de viabilidad en las semillas del tipo recalcitrantes inicia con la degradación de los ácidos grasos saturados durante el almacenamiento y la poca disponibilidad de almidón, como compuesto de reserva (Pukacka y Ratajczak, 2006., Gutiérrez-Hernández *et al.*, 2020). En cambio, las semillas que se consideran ortodoxas tienen viabilidad durante lapsos de tiempo prolongados (años), o bien, recalcitrantes o no ortodoxas si la pierden rápidamente (días o meses).

El periodo de vida de las semillas está en función de varios factores, como: el genotipo, condiciones de producción, cosecha, almacenamiento, entre otros (Gutiérrez-Hernández *et al.*, 2011., Langlé-Argüello *et al.*, 2017).

3.4.3 El tamaño y color de las semillas

Garrido *et al.*, (2005) mencionan que, los tamaños que pueden alcanzar la semillas tienen una gran variación entre poblaciones, años y especialmente entre plantas individuales, también sostiene que, semillas más grandes otorgan a las plántulas más ventajas para su germinación, establecimiento y supervivencia en comparación con las semillas pequeñas, éste último hecho es reportado frecuentemente en la literatura (Fenner, 2000; Kuniyal *et al.*, 2013; Vázquez-Díaz *et al.*, 2011., Langlé-Argüello *et al.*, 2017).

Por su parte, Vázquez *et al.*, (2011) sostienen que la calidad de la semilla del *A. salmiana* se determina por su peso y tamaño, aunque haya variaciones entre localidades para la misma especie, sin embargo, las semillas más grandes seleccionadas para cada localidad fueron las que germinaron más rápidamente. Con estos dos estudios se demuestra que el tamaño de la semilla si es relevante para el establecimiento de plantas en vivero o bajo condiciones *in vitro*. Rosales-Mata *et al.*, (2013) señalan la importancia de seleccionar la semilla a través de características físicas típicas de la especie como el color y tamaño. Las semillas fértiles son de color negro, mientras que las infértiles son pequeñas y de color blanco. En la figura 3.3, se muestra una semilla no seleccionada y otra si seleccionada con base a su color.



Figura 3.3. Semilla seleccionada, las semillas negras son fértiles y las blancas infértiles
(Rosales-Mata *et al.*, 2013)

3.4.4 Descripción general de las semillas de *A. potatorum*

En un estudio realizado por Gutiérrez-Hernández *et al.*, (2020), se determinó que las semillas de *A. potatorum* con un menor tiempo de almacenamiento (seis y doce meses) presentaron la mayor viabilidad, porcentaje de germinación y cantidad de materia seca en plúmula y plántula. Por otro lado, las semillas de *A. potatorum*

presentaron un comportamiento de semillas no ortodoxas cuando fueron almacenadas durante 24 meses a temperatura ambiente, con ello su viabilidad y capacidad de germinación fueron nulas. Por lo que las semillas de tobalá (*A. potatorum*) resultaron ser oleoproteaginosas y recalcitrantes. Así mismo, su contenido de lípidos y la germinación disminuyeron con el tiempo de recolecta y la producción de plántulas dependió esencialmente de los lípidos (Gutiérrez-Hernández *et al.*, 2020). En algunos experimentos, se ha confirmado que las semillas de ciertos agaves carecen de latencia y pueden alcanzar una alta germinación (Freeman *et al.*, 1977), sin embargo, el tipo de propagación y la presencia o ausencia de la latencia es particular en cada especie (Aguirre *et al.*, 2001, Sánchez-Mendoza *et al.*, 2017). A continuación, se presentan las principales características de las semillas de *A. potatorum*, iniciando con su composición química como se puede observar en la tabla 3.0.

Tabla 3.0. Composición química en promedio de las semillas de *A. potatorum*

Composición química	Proteínas 38 % Fibra bruta 22 % Lípidos 16 % Extracto libre de nitrógeno 15 % Humedad 5 % Cenizas 4 %
Adaptado de Gutiérrez-Hernández <i>et al.</i> , (2020)	

En cuanto a su descripción física, sus semillas son: lacrimiformes, planas y de color negro brillante (Vázquez *et al.*, 2011); son viables, sin latencia y germinan rápida y uniformemente (Peña-Valdivia *et al.*, 2006). En la figura 3.4 se pueden apreciar las características físicas de las semillas de *A. potatorum*.



Figura 3.4. Germinación de semillas de *A. potatorum* (Ortiz-Hernández, 2020)

3.4.5 Importancia de las semillas y otra alternativa para la supervivencia de *A. potatorum*

Como se mencionó anteriormente, la reproducción natural de *A. potatorum* se lleva a cabo, únicamente por semilla lo que limita su ciclo de reproducción (Gutiérrez-Hernández *et al.*, 2020). Esto pone en peligro a la especie porque a diferencia de la mayoría de los agaves, su propagación asexual es casi nula y depende de las semillas para sobrevivir (García-Mendoza, 2010; Aguirre-Dugua y Eguiarte, 2013; Delgado-Lemus *et al.*, 2014., Gutiérrez-Hernández *et al.*, 2020).

Una alternativa prometedora para la resolución de este tipo de problemas para especies como *A. potatorum*, es la utilización de las técnicas de propagación y mejoramiento derivadas de la biotecnología vegetal. En estos momentos, la técnica más empleada dentro de este campo es la llamada micropropagación o propagación *in vitro*, misma que consiste en la propagación asexual de plantas utilizando las técnicas de cultivo de tejidos vegetales (Domínguez-Rosales *et al.*, 2008).

3.5 El Cultivo de Tejidos como una alternativa para la propagación

3.5.1 El concepto del Cultivo de Tejidos Vegetales y sus principios básicos

El Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV) o “cultivo *in vitro*” es un conjunto de técnicas que permiten el establecimiento, mantenimiento y desarrollo de cualquier parte de una planta, desde una célula hasta un organismo completo, bajo condiciones artificiales y controladas. En otras palabras, consiste en crecer material vegetal en condiciones axénicas (o libre de patógenos) en un medio del cultivo nutritivo artificial, el cual es contenido en un recipiente de plástico o de vidrio, y que además es incubado bajo condiciones ambientales controladas (Ruscitti y Giménez, 2011). El CTV es una herramienta de la biotecnología vegetal moderna que se basa en tres principios, de cuya comprensión y manipulación depende el éxito o fracaso de cualquier trabajo en este campo. Los principios básicos son los siguientes:

- Elección del explante: se llama explante al órgano, tejido, segmento o agregados celulares de tejido vegetal que se utilizan para dar inicio al cultivo. Puede ser desde una semilla, embriones aislados, un segmento de hoja, tallo, cotiledón, granos de polen, incluso pueden ser agregados celulares y/o

protoplastos, etc. La respuesta *in vitro* dependerá no sólo del explante, sino también de la variedad, el genotipo, la edad de la planta donadora de explante, etapa fenológica de la planta donadora, así como de la estacionalidad en la que se encuentre la planta (Ruscitti y Giménez, 2011). George *et al.*, (2008) sostienen que mucho del éxito que se obtenga en la regeneración de plantas bajo condiciones *in vitro*, depende en gran medida de la selección del explante. Tejidos jóvenes y con altas tasas de división son mejores, así mismo se ha demostrado que la etapa vegetativa en la que se encuentre la planta donadora es de suma importancia, esto es las condiciones fisiológicas de la planta madre y la estacionalidad están relacionados con el estado fisiológico, metabólico y genético del explante.

- Elección del medio y condiciones de cultivo: junto con el tipo de explante determina la respuesta que se obtendrá del mismo y también dependerá de los componentes del medio de cultivo como: sales, compuestos orgánicos, combinaciones y concentraciones de los reguladores de crecimiento y/o algunos suplementos (antioxidantes), así como del pH y la consistencia de los medios, sólidos o líquidos. Las condiciones del cultivo también son otro factor importante, el fotoperiodo u oscuridad, así como la temperatura a la que están sometidos los cultivos (Ruscitti y Giménez, 2011). Cabe destacar que, la elección de los reguladores de crecimiento, así como la combinación y concentración son de suma importancia ya que ellos son los que modularán la expresión genética del explante (George *et al.*, 2008; Sharry, *et al.*, 2015).
- Condiciones asépticas: Para lograr la asepsia completa de los cultivos es muy importante que los explantes de cualquier tejido vegetal se sometan a un protocolo de desinfección y que éste sea capaz de lograr la eliminación completa, sin organismos contaminantes (Ruscitti y Giménez, 2011).

Es importante resaltar que, la reproducción asexual que llevan a cabo las plantas por medio del cultivo de tejidos es posible gracias a que, varias células vegetales poseen la capacidad o habilidad (totipotencia), la cual permite que sus células hijas tengan características de células meristemáticas y con ello logren obtener el crecimiento y el desarrollo de un nuevo individuo completo con las características de las células madre, sin que medie ningún tipo de fusión de células sexuales o

gametos. Esta capacidad se denomina *totipotencialidad celular* y es característica de un grupo de células vegetales conocidas como células meristemáticas, presentes en los distintos órganos de la planta (Segretín, 2006).

3.5.2 La implementación del CTV para la propagación *in vitro* de agaves

El crecimiento muy lento de los agaves, así como sus bajas tasas de reproducción asexual y reproducción sexual, esta última limitada por problemas de polinización y viabilidad de las semillas, son factores que restringen su multiplicación masiva mediante métodos convencionales y, por ende, disminuyen el mejoramiento genético de las especies con un interés económico (Domínguez-Rosales *et al.*, 2008). Una de las alternativas para producir mayores cantidades de plantas homogéneas, y sin tener que recurrir a las plantas silvestres, es la propagación *in vitro*, la cual también se debe complementar con acciones de selección (de las plantas a propagar), el desarrollo de un protocolo de propagación de acuerdo con la especie, etapas de laboratorio, invernadero, adaptación y vivero, para finalmente lograr una producción de plantas sanas, con calidad fitosanitaria y fisiológica, en espacios reducidos y a un menor tiempo (Monja-Mio *et al.*, 2015., Bautista-Castellanos, 2020).

3.6 Antecedentes sobre la aplicación de la biotecnología en el género Agave

3.6.1 El concepto de biotecnología y el CTV

En definición, la biotecnología se refiere a “toda aplicación tecnológica que utilice sistemas biológicos y organismos vivos o sus derivados para la creación o modificación de productos o procesos para usos específicos” (Sharry *et al.*, 2015). Entre estas tecnologías, el cultivo y la propagación *in vitro* o micropropagación han sido de las primeras y más ampliamente difundidas de las aplicaciones prácticas de la biotecnología en plantas.

3.6.2 Uso de las herramientas de la biotecnología vegetal en el CTV

Los protocolos de micropropagación, incluyen procesos efectivos, los cuales deben seguir y aplicar una serie de etapas o fases para lograr su éxito y así conseguir la reproducción de las plantas de interés en un laboratorio de CTV, dentro de estas etapas se definen los requerimientos del medio cultivo, así como las condiciones necesarias para la obtención de explantes, al igual, se debe establecer el

mantenimiento *in vitro* del organismo micropropagado, además de incluir el procedimiento de adaptación a las condiciones *ex vitro* (George *et al.*, 2008., Read & Preece, 2014).

Cabe destacar que, para la selección de las plantas donadoras de explantes se deben tomar en cuenta varios aspectos importantes: 1) deben de ser plantas jóvenes, 2) vigorosas y 3) libres de enfermedades y plagas visibles (Loberant & Altman, 2010), Por otro lado, 4) el genotipo de las plantas, es otro factor importante, ya que existen especies que no responden al cultivo *in vitro* debido a su naturaleza recalcitrante, o también su establecimiento aséptico en laboratorio es muy complejo (Smith, 2013). Además, si las plantas donadoras son traídas bajo condiciones silvestres o de campo, tienen que pasar un tiempo en cuarentena para eliminar posibles plagas y enfermedades, por último, deben ser sometidas a un programa fitosanitario o de nutrición.

Tabla 3.1. Antecedentes sobre el cultivo y propagación *in vitro* de especies del género agave

Especie de Agave	Avance reportado	Medio de cultivo/Reguladores utilizados	Referencia
<i>Agave sp</i>	Regeneración de plantas a través de organogénesis indirecta	Linsmaier y Skoog con 1 mg L ⁻¹ de 2,4-D y 51 mg L ⁻¹ de cinetina para la generación de tejido calloso. Mismo medio con 0.2 mg L ⁻¹ de 2,4-D y 1 mg L ⁻¹ de cinetina para la generación de brotes a partir del callo.	Groenewald y col. (1977)
<i>A. fourcroydes</i>	Regeneración de plantas a través de	SH adicionado con BA en un rango de 2.2 a 2.2 µM	Robert y col. (1987)

	organogénesis indirecta		
<i>A. arizonica</i>	Regeneración de plantas a través de organogénesis indirecta	MS con 1.4 μ M de 2,4-D para la generación de tejido calloso. Diferenciación de brotes en medio con 44.4 μ M de BA y 0.5 o 0.5.4 μ M de ANA	Powers y Backhaus (1989)
<i>A. cantala</i> <i>A. fourcroydes</i> <i>A. sisalana</i>	Regeneración de plantas a través de organogénesis indirecta.	MS con 0.1 mg L ⁻¹ de 2,4-D y 0.1 mg L ⁻¹ de BA para la generación de tejido calloso y brotación	Binh y col. (1990)
<i>A. sisalana</i>	Regeneración de brotes a partir de meristemas basales (rizomas)	MS o SH con BA (22.2 μ M).	Das (1992)
<i>A. victoriareginae</i>	Embriogénesis somática directa en explantes de hoja.	MS con vitaminas L2 y 2,4-D (1.4 μ M) para la generación de embriones, MS o SH al 50 % para su germinación	Rodríguez-Garay y col. (1996)
<i>A. sisalana</i>	Regeneración de brotes a partir de meristemas basales y	MS, HS, Gamborg y de White adicionados con diversas concentraciones de BA, de cinetina, de NAA, de IAA y de	Nikam (1997)

	organogénesis indirecta.	2,4-D en combinación o solos.	
<i>A. amaniensis</i>	Cultivo de tejido calloso y producción de sapogeninas.	MS con Cinetina (23.2 μM)	Andrijany y col. (1999)
<i>A. parrasana</i>	Regeneración de brotes a partir de meristemos basales y organogénesis indirecta.	MS adicionado con BA (13.3, 26.6, 39.9 y 53.2 μM) y 2,4-D (0 y 0.04 μM)	Santacruz-Ruvalcaba y col. (1999)
<i>A. sisalana</i>	Regeneración de plantas a través de organogénesis indirecta.	MS, MS + (NH_4NO_3 : 1500 mg L^{-1}) y MS + hidrolizado de caseína (1000 mg L^{-1}), todos adicionados con 2,4-D (9.05 μM) y cinetina (4.6 μM).	Hazra y col (2002).
<i>A. victoriareginae</i>	Regeneración por embriogénesis somática y generación de brotes a partir de meristemos basales.	MS con fue con 2.26 μM de 2,4-D para la inducción de callo. MS con 2.2-4.4 μM de BA para la generación de brotes.	Martínez-Palacios y col. (2003)
<i>A. angustifolia</i>	Generación de brotes a través de organogénesis directa a partir	MS con 1 mg L^{-1} de BA	Enríquez del Valle <i>et al.</i> , (2005).

	de segmentos de médula de tallo.		
<i>A. Tequilana</i>	Regeneración de plantas a través de organogénesis indirecta y generación de brotes a partir de meristemos.	Para la formación de callo el mejor tratamiento fue con ANA. La regeneración a partir de meristemos y de callo se logró con 1.1 µM de 2,4-D y 44 µM de BA	Valenzuela-Sánchez y col. (2006)
<i>A. salmiana</i>	Generación de brotes a partir de meristemos.	MS con 2.0 mg L ⁻¹ BA y 0.25 mg L ⁻¹ AIA	Silos-Espino y col. (2007)
<i>A. Tequilana</i>	Regeneración por embriogénesis somática	Se utilizaron MS más combinaciones de 2,4-D/BA µM para la formación de callo. MS más distintas concentraciones de BA, cinetina, 2iP y TDZ para la diferenciación de embriones somáticos.	Portillo y col. (2007)
<i>A. vera-cruz</i>	Regeneración por embriogénesis somática	Se utilizó MS adicionado con 4.52 µM de 2,4-D para la formación de callo. MS adicionado con 5.37 µM de NAA más 0.91 µM de zeatina.	Teja Vathi y col. (2007)
<i>A. potatorum</i>	Regeneración por semilla germinada, proliferación de yemas axilares	• MS + 3.0 KIN • MS + 1.5 KIN	Domínguez Rosales <i>et al.</i> , 2008
Abreviaciones: RC: Reguladores de crecimiento; 2,4-D: Ácido diclorofenoxiacético; BA: Bencilaminopurina; AIB: Ácido indolbutírico; KIN: Cinetina; TDZ: Tidiazurón; AIA: Ácido indol-3-acético; MS: Murashige y Skoog; NAA: Ácido naftalenacético.			
Adaptado de: Domínguez-Rosales <i>et al.</i> , (2008)			

Como se observa en la tabla 3.1 los avances reportados por Domínguez-Rosales *et al.*, (2008) hacen referencia al cultivo y propagación *in vitro* de algunas especies del género, por otro lado, los diferentes trabajos mostrados señalan que la regeneración *in vitro* se ha logrado a través de la obtención de brotes adventicios a partir de meristemos axiliares localizados en el segmento basal de las plantas, o bien por medio de organogénesis o embriogénesis somática indirecta, es decir, a partir de tejido calloso, también generado también bajo condiciones *in vitro* (Domínguez-Rosales *et al.*, 2008., Ángeles *et al.*, 2017), éstas vías de micropropagación se explicarán más adelante, a continuación se ilustra en las figuras 3.5 y 3.6, como se lleva a cabo la obtención de nuevos individuos por medio de embriogénesis y organogénesis .

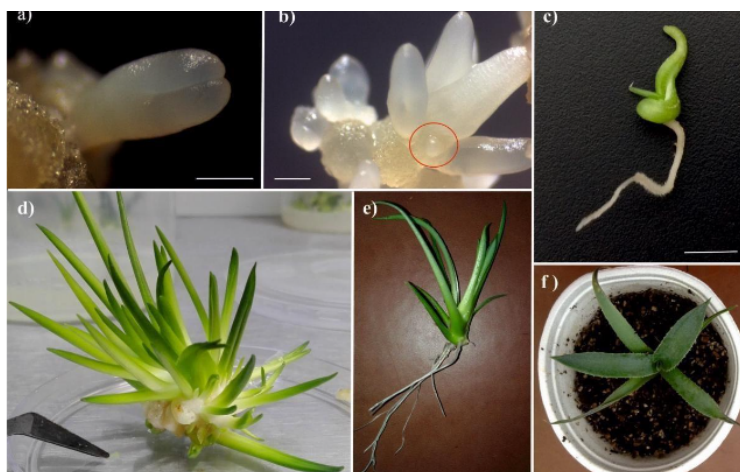


Figura 3.5. Embriogénesis somática de *A. salmiana* (Ángeles-Vázquez *et al.*, 2023)



Figura 3.6. Organogénesis directa de *Agave maximiliana* Baker (Santa-Cruz *et al.*, 2022)

En resumen, estos antecedentes confirman que, la biotecnología vegetal y sus técnicas de CTV pueden ser el método más efectivo para la obtención de plantas de agave y con ello obtener una producción masiva (Domínguez *et al.*, 2008).

3.6.3 Etapas de la micropropagación en un laboratorio de CVT

El proceso de propagación *in vitro* incluye:

- Obtención de plantas donadoras de tejidos,
- Establecimiento de cultivos asépticos,
- Multiplicación de propágulos,
- Enraizamiento de brotes bajo condiciones *in vitro*,
- Transferencia de las plantas micropropagadas a contenedores con sustrato para aclimatación, bajo condiciones de invernadero (Domínguez *et al.*, 2008., Sharry, *et al.*, 2015).

Más adelante se explicará el funcionamiento de c/u de los componentes del medio de cultivo.

3.6.4 Obtención de brotes de agave por medio de la propagación *in vitro*

En el caso del agave, para que los brotes formen raíces, se establecen en medios de cultivo sin reguladores de crecimiento (RC) o bien que contengan RC de tipo

auxina, como el ácido indolacético (AIA), el ácido naftalenacético (ANA) y ácido Indol-3-butírico (AIB); estos reguladores permiten y estimulan a las células en el tejido del tallo, con la finalidad de que éstas creen divisiones celulares, y posteriormente, formen centros meristemáticos que originen la diferenciación y desarrollo de raíces adventicias (Woodward & Bartel, 2005., Bautista-Castellanos *et al.*, 2020).

3.6.5 Proceso de enraizado del agave por medio de la propagación *in vitro*

De acuerdo con Enríquez-del-Valle, Carrillo-Castañeda y Rodríguez-de la O (2005) y Bautista-Castellanos, Valle, Velasco-Velasco y Rodríguez-Ortiz (2020), para llevar a cabo el enraizado *in vitro* de brotes de la especie *A. angustifolia*, el medio de cultivo debe de contener sales minerales al 100% y sin auxinas (RC), aunque, en un medio con 75% de sales y 0.75 mg L⁻¹ de AIB se ha reportado que los brotes forman mayor cantidad de raíces y en menor tiempo. Por otra parte, para la micropropagación de brotes del *Agave marmorata*, éstos formaron raíces en un medio de cultivo con las sales minerales al 100 % y 10 mg L⁻¹ de la auxina AIA (Aguilar-Jiménez & Rodríguez- de- la O, 2018).

Es importante destacar que, la respuesta de cada especie de agave a los reguladores de crecimiento, así como también a otros compuestos tales como las sales minerales, vitaminas, aminoácidos, entre otros es diferente, y, por lo tanto, la composición de los medios debe ser específica, sin embargo, muchos de ellos pueden responder a un mismo medio o a diferentes concentraciones. Por ello es importante hacer una investigación bibliográfica y, en caso de no contar con bibliografía específica para cada especie, esta búsqueda se puede realizar para el género. (Bautista-Castellanos *et al.*, 2020). Así mismo, para poder diseñar un medio de cultivo específico para una especie determinada es necesario hacer pruebas de concentración vs respuesta. Algunos autores como George y Sherrington (1984); George *et al.*, (2008) y en la revisión realizada por Bautista-Montes *et al.*, (2022), está última especializada en agaves; en sus libros y artículos muestran algunos protocolos y ejemplos para plantas ya sea cultivables o de modelos biológicos que permiten adecuarlos o adaptarlos, a paritr de la misma familia o género, haciendo más fácil determinar el tipo, la concentración y las combinaciones de los reguladores (RC) según el fin morfogenético que se tenga para cada especie de agave, cabe

destacar que, en cualquier protocolo de micropropagación, se busca obtener una respuesta regenerativa por cualquier vía, ya sea directa o indirecta, dependiendo de las necesidades de producción o investigación.

3.6.6 Traslado de una planta de agave micropropagada a un invernadero

Cabe mencionar que, las plantas micropropagadas presentan un ineficiente funcionamiento de sus estomas, una baja actividad fotosintética, además, sus hojas presentan escasa formación de cutícula, por lo que las raíces deben aumentar su eficiencia y conexión con los haces conductores del tallo (Chandra *et al.*, 2010., Bautista-Castellanos *et al.*, 2020). Las plantas con estas características tienen una limitada capacidad para su establecimiento en vivero o campo, en donde hay una menor humedad relativa, variaciones de temperatura en rangos más amplios, además las irradiaciones son altas (hasta $2\,000\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$), y la disposición de nutrientes es limitada, por lo que dependiendo de la especie las plantas se recomienda que el establecimiento se mantenga entre 30 a 90 días, en contenedores con sustrato de densidad aparente baja, 0.11 a $0.5\ \text{g cm}^{-2}$, que retenga humedad, pero que drene el exceso de agua para tener porosidad y aireación entre el 33 y 77 % (Block & Wever, 2008., Bautista-Castellanos *et al.*, 2020). Es recomendable que, dentro del establecimiento en invernadero se proporcione inicialmente una humedad relativamente alta, radiación solar disminuida de 30-50 % mediante sombra, éstas son condiciones necesarias para que las plantas realicen cambios morfológicos y fisiológicos, los cuales les permitan una adecuada aclimatación en campo (Deb e Imchen, 2009, Lesar *et al.*, 2012, Álvarez *et al.*, 2012, Bautista-Castellanos *et al.*, 2020).

3.6.7 Aclimatización de las plantas de agave micropropagadas e importancia del sustrato

Se tienen registros de plantas de agaves que han sido aclimatadas con éxito, además, se ha demostrado la importancia de las características del sustrato y el abastecimiento nutrimental, como lo es la aplicación de la solución Steiner, la cual es muy nutritiva, ya que se encuentran disueltos los nutrientes esenciales. Cabe destacar que, la solución universal Steiner es un fertilizante, y se compone de macronutrientes como: nitrógeno, fósforo y potasio, que son los elementos más utilizados para el desarrollo de las plantas, y de micronutrientes como: cloro, calcio,

magnesio, azufre, boro, hierro, manganeso, zinc y molibdeno, estos últimos elementos se requieren en menor proporción y, en algunas especies del género agave se han empleado con éxito, como: *A. angustifolia* (Enríquez-del Valle *et al.* 2012, Monja-Mio *et al.*, 2015., Bautista-Castellanos *et al.*, 2020), *A. potatorum*, *A. americana* var. *oaxacensis* (Enríquez-del-Valle *et al.* 2013, Cruz-García *et al.*, 2017., Bautista-Castellanos *et al.*, 2020).

3.7 Aplicaciones del cultivo *in vitro* en plantas

3.7.1 Propagación *in vitro* por CTV

La aplicación del cultivo *in vitro* más utilizada a nivel comercial es, sin duda, la propagación masiva o también llamada micropropagación, a través de la utilización de distintas técnicas de CTV, de las cuales se han podido obtener una gran cantidad de plantas en tiempos y espacios reducidos de distintas especies del género *Agave*. Además, la propagación *in vitro* ha demostrado ser la técnica más eficiente en comparación con cualquiera de los otros métodos convencionales de propagación que se utilizan para este grupo de plantas (Enríquez del Valle *et al.*, 2005; Aureoles-Rodríguez *et al.*, 2008; Domínguez-Rosales *et al.*, 2008; Ramírez-Malagón *et al.*, 2007., Pérez-Molphe *et al.*, 2012., Sharry, *et al.*, 2015).

3.7.2 Conservación de tejidos vivos y bancos de germoplasma

Otra aplicación del cultivo *in vitro* que resulta importante destacar, en el caso de los agaves, y que además es complementaria a las técnicas de propagación masiva, es la conservación por tiempo indefinido de tejidos vivos, esto hace referencia a tener almacenado material biológico en un banco de germoplasma, ya sea bajo criopreservación o por medio de técnicas de cultivo para mantener el crecimiento lento de plántulas, embriones somáticos, meristemos u otros tejidos de distintas especies. Éstos pueden mantenerse bajo condiciones controladas de luz y temperatura, con la finalidad de contar con reservas de tejidos en bancos de germoplasma *in vitro* y, a su vez conservar la variabilidad genética de una o varias especies, ya que, en condiciones normales, el mantenimiento de los cultivos viables por tiempo indefinido requiere de realizar varios subcultivos o hacer cambios a los medios de cultivo frescos de manera frecuente para renovar los nutrientes del medio, así como de dividir los tejidos que se han desarrollado. Esto genera altos

costos de producción debido al tiempo de trabajo que se requiere y a la cantidad de medios de cultivo que deben emplearse, además de que cada vez que los cultivos son manipulados aumenta el riesgo de pérdida de los mismos por contaminación microbiana (Pérez-Molphe *et al.*, 2012).

Para evitar estos inconvenientes, se han desarrollado sistemas de crecimiento retardado, los cuales tienen como objetivo prolongar los periodos entre subcultivos y con ello se busca obtener menores costos de producción, además de conservar a mediano plazo los cultivos viables *in vitro* y así tener acceso al material vegetal en cualquier momento que se requiera. Por otro lado, para lograr disminuir la tasa de crecimiento de los tejidos, sin afectar su viabilidad, se les suele aplicar un estrés osmótico controlado a través de la utilización de distintos componentes en el medio de cultivo como: concentraciones altas de sacarosa, manitol, sorbitol y, en algunos casos PEG. Además del control de las condiciones de luz y temperatura. De igual manera, los componentes del medio, como el manitol o sorbitol, reducen el potencial osmótico, y por tanto la disponibilidad de agua para los tejidos, esto sin alterar el balance bioquímico de las células vegetales y permitiendo así, un crecimiento más lento. A su vez, se pueden emplear otros reguladores de crecimiento para reducir la tasa de crecimiento, como lo son, el ácido abscísico o el ácido N-dimetilaminosuccinámico, estos compuestos se consideran inhibidores del crecimiento (Lynch, 1999., Sarasan *et al.*, 2006., Pérez-Molphe *et al.*, 2012).

Cabe destacar que, para que esta técnica de conservación pueda aplicarse, los tejidos almacenados deben mantener su capacidad de regenerar plantas completas (Pérez-Molphe *et al.*, 2012).

3.7.3 Desarrollo de protocolos de micropropagación para especies silvestres de agave

El primer reporte de micropropagación elaborado para un ejemplar del género *Agave* fue para la especie Henequén (*Agave fourcroydes*) (Robert *et al.*, 1987), el cual además ha sido implementado como base para aplicarlo a otras especies con algunas modificaciones (Robert *et al.*, 2006). A partir de esto, se han desarrollado protocolos de micropropagación, los cuales están enfocados principalmente en especies ornamentales como, productoras de fibras y las que se utilizan en la industria alimentaria como materia prima para la elaboración de bebidas alcohólicas

y jarabes (Debnath *et al.*, 2010; Kulus, 2014). Por otro lado, varios autores concuerdan en que la micropropagación puede ser el método más eficiente para la reproducción masiva de los agaves.

3.8 La micropropagación

3.8.1 El principio de la propagación *in vitro* o micropropagación de plantas

La micropropagación se basa en propagar asexualmente segmentos de plantas de interés, éstos pueden ser: hoja, tallo, semillas, raíces, ápices, meristemos, etc., con la finalidad de producir y regenerar nuevos brotes, por medio de dos vías de propagación: embriogénesis u organogénesis (directa e indirecta). Posteriormente, los nuevos brotes se desarrollarán y con el tiempo se obtendrán plantas genéticamente idénticas (Espinosa-Leal *et al.*, 2018). Cabe destacar que, se han reportado casos de éxito al implementar esta técnica de CTV para la obtención de plantas de agave mezcalero, agave tequilana y otras plantas de ornato.

Además, la micropropagación de agaves es una técnica ampliamente utilizada en la biotecnología vegetal para la producción de plantas de alta calidad y uniformidad genética, como el agave, que es la materia prima, y por ende tiene gran relevancia en la industria del mezcal y otros productos derivados, como se observó en el capítulo 2. A continuación, se presentan algunas empresas a nivel mundial que se dedican a la micropropagación de agaves:

1. Agroin Vitro S.A. de C.V.

- a) Ubicación: México
- b) Plantas micropropagadas: *Agave tequilana* (<https://www.agroinvitro.com/>)

2. Vitro Plus

- a) Ubicación: Países Bajos
- b) Plantas micropropagadas: Plantas de ornato y agrícolas, incluyendo el agave (<https://horticulture.beverinnovations.com/projects/vitro-plus/>)

3. Biotech International Ltd.

- a) Ubicación: India,
- b) Plantas micropropagadas: Varias especies, incluyendo agave.
(<https://www.risenshine.in/>)

4. Agroplasma SL

- a) Ubicación: España

- b) Plantas micropropagadas: Diferentes cultivos, entre ellos el agave
(<https://agroplasma.com/>)

Cabe mencionar que hay más empresas tequileras y de mezcal que tienen sus propios laboratorios de micropropagación.

3.8.1 Ventajas del uso de la micropropagación

- a) Es un sistema de propagación clonal, en el que se mantienen todas las características genotípicas y fenotípicas del material inicial seleccionado.
- b) El proceso se lleva a cabo en un laboratorio de CTV en condiciones y ambientes controlados, por lo que no se ve afectado por factores ambientales o de clima.
- c) Se puede obtener un gran número de plantas, debido a que la micropropagación genera material vegetal prácticamente ilimitado y su disponibilidad es constante.
- d) Requiere poco espacio, y el tiempo en el que puede realizarse el proceso es, por lo general muy corto (depende de la especie a propagar).
- e) Las plantas que se obtienen están libres de microorganismos fitopatógenos, e incluso con la aplicación de técnicas más específicas se pueden eliminar los virus y viroides. En el caso particular de los agaves, la propagación asexual por hijuelos tiene la desventaja de que éstos pueden ser portadores iniciales de microorganismos patógenos.

(Domínguez-Rosales *et al.*, 2008., Bautista-Montes *et al.*, 2022).

3.9 Etapas del proceso de Micropropagación

Al llevar a cabo la micropropagación de las especies de agave dentro de un laboratorio de CTV, es necesario seguir cada una de las diferentes fases o etapas que requiere este procedimiento, las cuales se describen a continuación:

3.9.1 Etapa 0: Preparación de la planta madre (donadora de explantes)

Para poder establecer los cultivos bajo condiciones de asepsia, es muy importante contar con explantes vigorosos, libres de plagas y enfermedades, por lo tanto, para obtener estos explantes es recomendable mantener a la planta madre, bajo condiciones controladas (cuarentena). En ese ambiente, las plantas se someten a

un programa fitosanitario y de control nutricional para permitir un crecimiento vigoroso y, sobre todo, libre de enfermedades (Read y Preece, 2014).

3.9.2 Etapa I: Establecimiento aséptico e inducción a la diferenciación morfológica

El establecimiento aséptico de los explantes es el primer reto importante al que se enfrenta el proceso de micropropagación. En esta primera etapa del cultivo, se requiere la eliminación de todo microorganismo que pueda ser fuente de contaminación (Read y Preece, 2014).

Asimismo, para lograr el establecimiento aséptico se utilizan distintos agentes y tratamientos químicos que reducen a niveles mínimos los patógenos que puedan estar presentes en la superficie del explante, a su vez se pueden probar diferentes concentraciones de los agentes desinfectantes, hasta encontrar la más eficiente (Smith, 2013., Read y Preece, 2014). Dentro de las técnicas de desinfección, se usan tratamientos químicos (hipoclorito de sodio o calcio, alcohol etílico al 70%, entre otros) que eliminan a los microorganismos presentes como bacterias y hongos, además los desinfectantes se emplean a ciertas concentraciones y tiempos de exposición, para asegurar su efecto y evitar dañar los tejidos, de igual manera es importante que tanto los medios, así como el instrumental que se va a emplear para el cultivo se encuentre esterilizado previamente, por lo general en autoclave vertical a 121° C durante 18 minutos (Bhjawani y Kumer, 2013., Read y Preece, 2014., Campos *et al.*, 2020).

En cuanto a la inducción para dar comienzo al proceso de diferenciación (morfogénesis), los explantes que fueron sometidos a algún método de desinfección, se deben incorporar a un medio de cultivo que estimule la producción de brotes adventicios, formación de callo o embriones. La respuesta morfológica dependerá de varios factores tales como:

- a) Constitución genética: El genotipo de la planta siempre tendrá un papel importante en la respuesta que se obtenga bajo las condiciones *in vitro* (Bhjawani y Kumar, 2013).
- b) Medio de cultivo: Los medios de cultivo deberán contener todos los elementos necesarios para el desarrollo y crecimiento de las células vegetales (George y Klerk, 2008., Phillips y Garda, 2019). La elección

correcta de éstos determinará en gran medida el éxito de la reproducción del cultivo de interés. Los medios de cultivo tienen componentes esenciales que se van modificando según las diferentes etapas, necesidades y requerimientos de la especie (Bhojwani & Kumar, 2013). Los principales elementos que lo conforman son:

3.9.3 Componentes del medio de cultivo

b.1) *Sales inorgánicas*: Macronutrientes y micronutrientes esenciales para el desarrollo de toda planta, las concentraciones de éstos se adecuan a los requerimientos del cultivo. Son importantes porque deben de satisfacer las necesidades nutricionales de la especie.

b.2) *Nutrientes orgánicos*: Suplementos de vitaminas y aminoácidos son usados como fuentes de nitrógeno reducido. Además, estos compuestos juegan un papel muy importante en el metabolismo primario, como en la síntesis de macromoléculas requeridas para el crecimiento, desarrollo y diferenciación de tejidos.

b.3) *Fuente de carbono*: Debido a que las plantas *in vitro* presentan deficiencia en su proceso de fotosíntesis se adiciona al medio fuentes de carbono como la sacarosa para satisfacer la fuente de energía que requieren.

b.4) *Agentes de soporte*: Para la elaboración de medios sólidos se utilizan agentes que solidifican los medios, a su vez, éstos deben permitir el intercambio de los elementos del medio con el tejido de la planta, además de cumplir con la función de proporcionar sostén a los pequeños fragmentos de tejidos u órganos utilizados.

b.5) *El pH*: El ajuste del pH determina la forma iónica de las sales, lo que permite que el tejido vegetal absorba de manera adecuada los nutrientes, además este componente interviene en la interacción de las células con los reguladores de crecimiento vegetal. Es importante ajustar el pH a cada medio de cultivo, de 5.7 a 5.8 utilizando HCl 1N o NaOH 1N según sea necesario.

b.6) *Reguladores de crecimiento vegetal (RCV)*: Son sustancias químicas de origen natural o sintético que en pequeñas concentraciones regulan el crecimiento y los patrones de desarrollo vegetal, así como la diferenciación de los tejidos, se consideran los elementos más importantes que modulan la

respuesta morfogénica *in vitro* (Ramírez-Villalobos, 2007., Machakova *et al.*, 2008). La clasificación de los reguladores de crecimiento vegetal y sus usos en cultivo de tejidos vegetales se enlistan en la tabla 3.2:

Tabla 3.2. Clasificación de reguladores de crecimiento y su aplicación en el cultivo de tejidos vegetales

Regulador de crecimiento vegetal	Usos y aplicaciones en micropropagación
Auxinas	-Junto con las citocinas regula el ciclo celular. -Inducen la citodiferenciación. -Inducción de la vía organogénica. -En conjunto con las citocininas inducen la embriogénesis somática. -Inducción y crecimiento de callo. -Enraizamiento <i>in vitro</i>.
Citocininas o Citoquininas	-Junto con las auxinas regula el ciclo celular. -Ayuda a la diferenciación y proliferación de brotes adventicios. -En conjunto con las auxinas inducen la embriogénesis somática. -Ayudan a la diferenciación y desarrollo de los embriones somáticos.
Giberelinas	-Estimulan la germinación de semillas <i>in vitro</i>. -Estimulan la germinación de embriones somáticos.
Ácido abscísico	-Interviene en la morfogénesis. -Es esencial en el crecimiento y desarrollo normal de los embriones somáticos.
(Smith, 2006., George <i>et al.</i> , 2008., Neumann <i>et al.</i> , 2009., Bhojwani & Kumar, 2013)	

3.9.4 Etapa II: Multiplicación de brotes adventicio o embriones somáticos

Si bien la respuesta morfogénica se induce en la Etapa I, en esta etapa (II) se hacen evidentes las estructuras regenerativas en los tejidos, la regeneración de plantas puede lograrse a través de distintas vías regenerativas; las cuales pueden

ser: organogénesis *in vitro* o la formación de embriones somáticos. Esta etapa tiene como objetivos la multiplicación de estas formas morfológicas. A continuación, se explicarán cada una de ellas.

3.10 Vías de Regeneración

3.10.1 Principio de regeneración celular por medio de la micropropagación

Como se mencionó anteriormente, el éxito en la propagación de una planta y la multiplicación de células dependerá de la expresión de la potencialidad celular total, es decir, que algunas células recuperen su condición meristemática (Segretin, 2006). A esta habilidad se le conoce con el nombre de “Totipotencialidad” celular, Haberlandt postuló que “toda célula vegetal individual es capaz de regenerar una planta entera a partir de un cultivo *in vitro* sin importar el grado de diferenciación alcanzado” (Sharry *et al.*, 2015).

La regeneración se puede lograr a través de diferentes vías morfogénéticas en la figura 3.7, se muestran estas vías y en la figura 3.8, se observa su aplicación en la la micropropagación de agave.

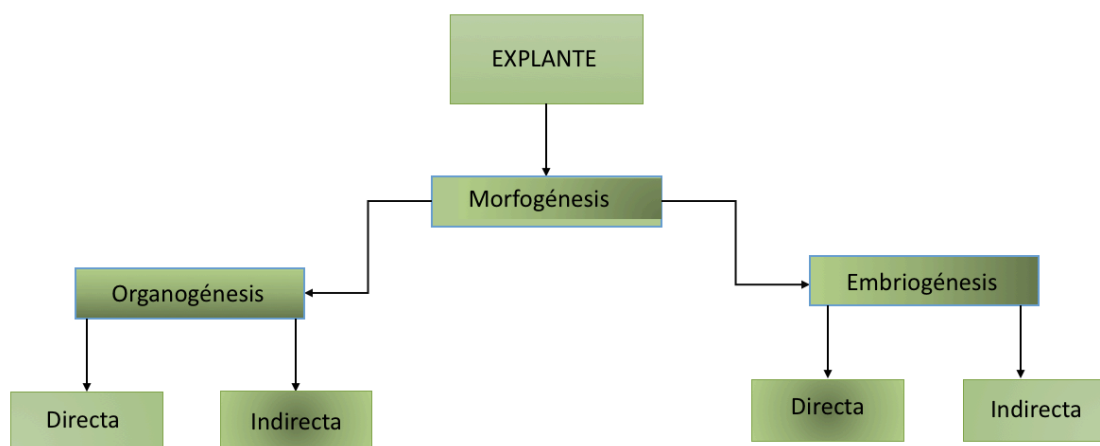


Figura 3.7. Esquema vías de regeneración

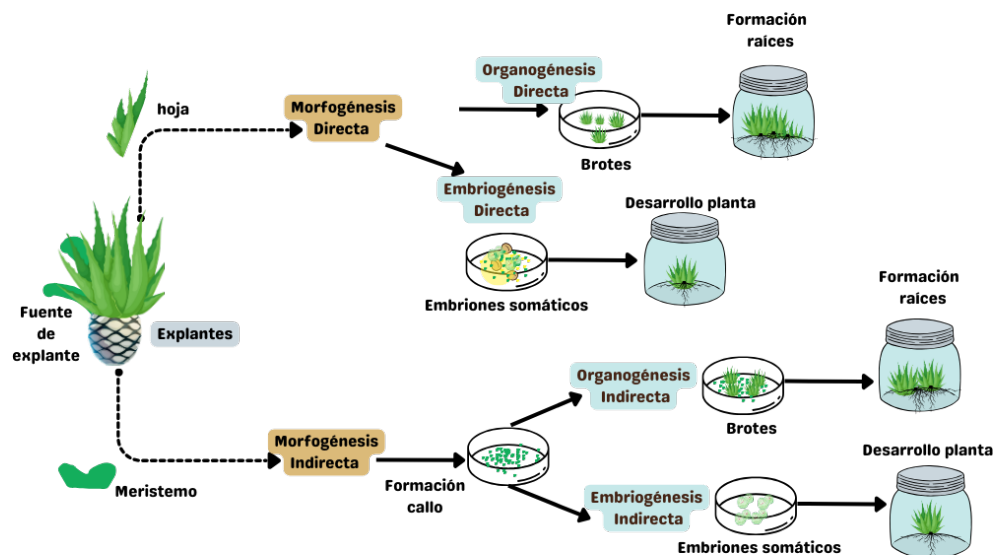


Figura 3.8. Respuesta de morfogénesis por vías de regeneración en especies de agave, inducidas por explantes como una hoja y tejidos provenientes de meristemos (adaptado de: Bautista-Montes *et al.*, 2022).

3.10.2 Organogénesis

La organogénesis se define como la vía regenerativa en la que tiene lugar la formación *de novo* de órganos adventicios a partir del explante, estos pueden ser brotes de hojas, raíces, entre otros. Esta vía de regeneración puede presentar dos procesos: la desdiferenciación y rediferenciación celular (Loberant y Altaman, 2010., Geneve, 2011).

En el proceso de desdiferenciación, las células hijas del explante regresan a un estado meristemático para que a partir de este estado logren adquirir el potencial organogénico y se logren diferenciar distintos tejidos u órganos hasta lograr la formación de una planta completa (Geneve, 2011; Bhojwani & Kumar, 2013). Esto se puede llevar a cabo por dos formas:

- 1) *Directa*: La formación de los brotes adventicios se da directamente del tejido del explante.
- 2) *Indirecta*: Interviene el crecimiento de una masa de células indiferenciadas a la que se les conoce como “callo”, a partir del cual se rediferenciarán los brotes adventicios.

Un protocolo completo de regeneración por organogénesis implica una serie de etapas: la inducción de la organogénesis (directa o indirecta), el desarrollo de los

brotos adventicios, el alargamiento y maduración de los brotes, y por último el enraizamiento de éstos (Loberant & Altman, 2010) En la figura 3.7, se presentan las dos vías organogénicas.

3.10.3 Embriogénesis

La embriogénesis somática es la vía regenerativa por la cual las células somáticas se convierten en estructuras que se asemejan a embriones cigóticos, esto sin que ocurra la fusión de los gametos, además se obtiene un embrión muy semejante a un embrión sexual ya que esta vía sigue una serie de etapas embrionarias (Jiménez, 2005., Loberant y Altman, 2010).

Estas estructuras conocidas como embriones somáticos tienen la misma morfología que los cigóticos, ya que no presentan conexión vascular con los tejidos del explante y, a diferencia de la organogénesis, los embriones son bipolares, es decir, que presentan una parte aérea y radicular, por lo que, no es necesario que atraviesen la etapa de enraizamiento, a diferencia de los brotes adventicios (Jiménez, 2005; Kumar & Shiong, 2012; Bhojwani & Kumar, 2013).

La regeneración embriogénica, al igual que la organogénica, puede tener lugar por dos vías o formas:

- 1) *Directa*: en donde los embriones se desarrollan a partir del mismo explante.
- 2) *Indirecta*: en la cual, primero se lleva a cabo la formación de “callo” para que se produzca un cambio en la dirección de las divisiones celulares y posteriormente se dé lugar a la formación y desarrollo de los embriones somáticos (Von Arnold *et al.*, 2002; Loberant & Altman, 2010).

Cabe destacar que, un protocolo completo de regeneración por esta vía involucra cuatro etapas: la inducción de la embriogénesis (directa o indirecta), el desarrollo de los embriones, su maduración y, por último, la germinación y con ello, se logra la obtención de plantas completas y funcionales (Bhojwani & Kumar, 2013). En la figura 3.9. se presentan los diferentes estados de la maduración de embriones somáticos de *Agave angustifolia*.

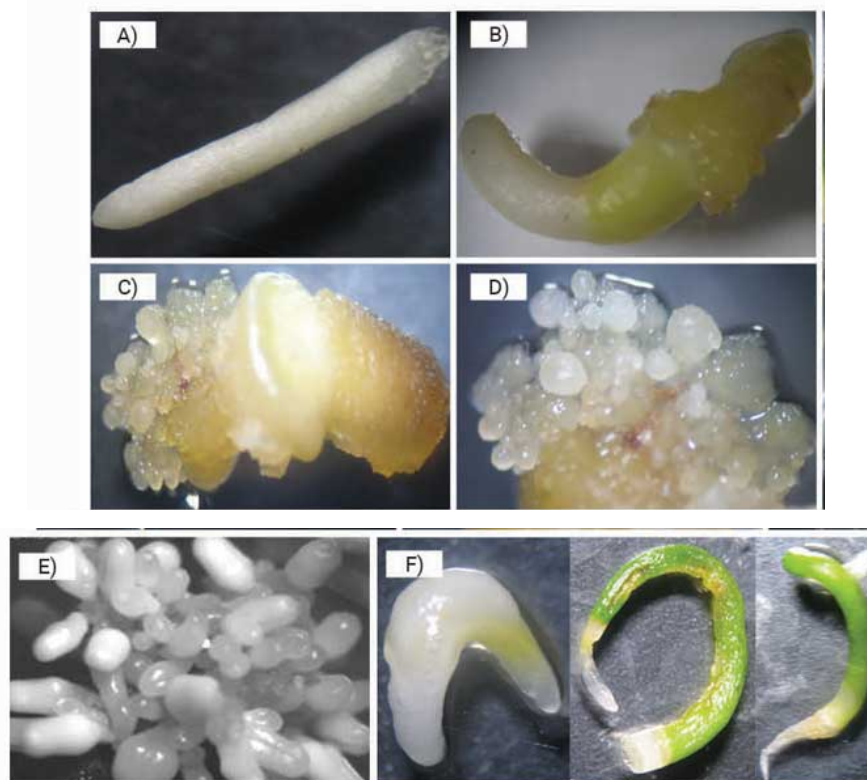


Figura 3.9. Embriogénesis somática indirecta de la especie *A. angustifolia* Haw. A) se observa el eje embrionario, B) Se induce la formación de callo, C), D) y E), se observa la inducción y maduración de embriones somáticos, F) se muestran el desarrollo de los embriones 3 meses después haber iniciado su cultivo (Arzate-Fernández *et al.*, 2016).

3.10.4 Etapa III: Alargamiento, acondicionamiento y enraizamiento *in vitro*

En esta etapa se busca la individualización de los brotes adventicios o la germinación de los embriones somáticos, cuando se logra individualizar a las plántulas y se alcanza su alargamiento, ahora también se puede inducir la formación de raíces adventicias. El enraizamiento puede realizarse tanto en condiciones *in vitro* como *ex vitro*, sin embargo, esta etapa tiene como objetivo tener a la orden las plantas completas, para así pasar a la siguiente etapa que es su aclimatación en condiciones ambientales controladas.

Por otro lado, para lograr la formación de una plántula individual, es necesario separar los brotes adventicios y disminuir la concentración de las citocininas en el medio o bien, agregar una citocinina más débil, como la kinetina, para evitar la proliferación de los brotes, y así lograr el alargamiento y su posterior enraizamiento, esto se puede lograr no sólo con el cambio en el tipo y/o concentración de las citocininas, igualmente se le puede agregar al medio una concentración baja de

ácido giberélico, disminuir la cantidad de las sales y/o adicionar auxinas como el AIA o AIB que favorecen la emergencia de las raíces adventicias.

En el caso de la germinación de los embriones, ésta se logra eliminando gradualmente o en su totalidad la auxina como el 2,4-D o Dicamba que estimula la embriogénesis somática. En algunos casos, la adición de AG3 o ABA permite la maduración de los embriones y su germinación, logrando la planta completa.

3.10.5 Etapa IV: enraizamiento *ex vitro* y aclimatización de las plantas

Esta etapa es, sin duda, la más difícil o la que puede determinar el éxito de la micropropagación, ya que, si las plántulas obtenidas no enraizaron *in vitro*, se les pueden aplicar varios tipos de sustratos y reguladores de crecimiento (principalmente auxinas) para promover la rizogénesis. Los sustratos incluyen: perlita (también llamada agrolita) y/o vermiculita, peat moss, tierra negra, arena de río, tezontle de diferentes grosores, entre otros. El sustrato o sustratos elegidos deberán humedecerse con el medio nutritivo o en agua. Los medios empleados deberán estar preparados con baja concentración de sales, y pueden utilizarse sales del medio WPM (McCown y Lloyd, 1981) y GD (Gresshoff y Doy, 1972), medio de Houland, o hasta el mismo medio MS del 25% al 50% lo que permite un incremento en el porcentaje de enraizamiento de las plántulas. Sin embargo, las raíces producidas por este método son usualmente gruesas y no poseen “pelos radiculares”. Comúnmente, y con el fin de proceder al enraizamiento de los brotes adventicios, éstos deberán contar con al menos uno o dos pares de hojas verdaderas, a su vez, se puede estimular la formación de raíces de forma inmediata, colocando los vástagos durante periodos cortos en soluciones con concentraciones elevadas de auxinas. La auxina más utilizada es el IBA, que puede utilizarse a concentraciones de 1-10 μM durante pocas horas. Alternativamente, se pueden emplear niveles más bajos de auxinas (0,1 a 1 μM), pero manteniendo la inducción por un periodo más prolongado (3 a 7 días). Posteriormente, los vástagos se transfieren a los contenedores seleccionados, conteniendo el sustrato más adecuado según la especie para permitir el desarrollo de las raíces. Después de 20 días, es posible la obtención de una adecuada cantidad de raíces funcionales que permitan continuar hacia la etapa de aclimatización. El enraizamiento *ex vitro* permite que el enraizamiento y la aclimatización se logren simultáneamente y que

tenga lugar el desarrollo y crecimiento de plantas, ya que se logra la formación de raíces funcionales debido a que se establece una conexión vascular continua entre el vástago y la raíz. Sin embargo, es importante señalar que, se presenta estrés asociado a la transpiración de las plantas durante las etapas iniciales del trasplante, debido a que sus estomas todavía no son funcionales, y se puede reducir considerablemente la tasa de supervivencia. Por ello, es conveniente contar con instalaciones de invernadero o cámaras de crecimiento con ambientes controlados adecuados para brindar temperatura y humedad relativa moderadas que permitan lograr plantas robustas en forma progresiva. Bajo condiciones *ex vitro*, generalmente se utilizan diferentes substratos, mezclas de tierra y arena y/o abonos, los cuales es conveniente que estén debidamente desinfectados. En algunas especies, se ha visto favorecida la aclimatación utilizando micorrizas en las plántulas al ser transferidas a condiciones de invernadero.

3.11 Innovaciones biotecnológicas de los agaves mezcaleros

3.11.1 Sistemas de Inmersión Temporales

Con el paso del tiempo, la ciencia ha creado diversas tecnologías siempre en la búsqueda de alternativas que hagan más eficientes los procesos de producción. En este sentido los laboratorios de micropropagación incrementan la multiplicación de plantas a escalas comerciales y disminuyen costos de producción con el uso de los sistemas de inmersión temporal (SIT) y luces tipo LED (Pérez de León *et al.*, 2020).

- Sistemas de Inmersión Temporal (SIT) en agaves

Los SIT son sistemas semiautomatizados, que utilizan medios de cultivos líquidos que permiten la inmersión de las plantas en tiempos y ciclos alternos, por lo que, se aprovechan mejor los nutrientes disponibles en el medio de cultivo. Estos sistemas tienen varias ventajas tales como: simplificar el proceso de micropropagación, reducir los costos de producción (al eliminar el uso de los gelificantes) y el número de horas de trabajo, aumentar el número de especies vegetales a escala comercial, y además la regeneración de plantas requiere menos espacio (Pramita *et al.*, 2018., Kunakhonnuruk *et al.*, 2019., Pérez de León *et al.*, 2020).

Por otra parte, se han reportado varios tipos de biorreactores del tipo SIT, éstos modelos se han basan en los diseños originales tales como: RITA® (Recipiente para

Inmersión Temporal) de Teisson y Alvard, BIT® (Biorreactor de Inmersión Temporal) de Escalona *et al.*, (1999) y BIOMINT® de Robert *et al.*, (2006), y dentro de estos modelos se encuentran: MATIS®, SETIS®, PLANTIMA® y ORBITABIÓN®, (Orellano *et al.*, 2016); así mismo, existen algunos prototipos que no han sido registrados o se encuentran en el proceso, como los Biorreactores de Inmersión por gravedad (BIG), PLANTFORM, entre otros. El uso del SIT se ha extendido cada vez más en diversos laboratorios de cultivo *in vitro* para la propagación de agaves (Pérez de León *et al.*, 2020). imágenes

La utilización de los SIT es ideal para la propagación a escala comercial de diferentes especies vegetales, sin embargo, su éxito radica principalmente en el tiempo y la frecuencia de inmersión a los que son sometidos los explantes (Orellano *et al.*, 2016., Pérez de León *et al.*, 2020). Algunos investigadores señalan que es necesario realizar más investigaciones con el fin de mejorar los sistemas de producción, al igual que establecer protocolos funcionales para cada una de las especies de interés, pero sobre todo se recomienda trabajar en la trazabilidad de los protocolos descritos para alcanzar una propagación a escala comercial, además de mejorar la calidad de plántulas *in vitro* de agaves mezcaleros, ya que son plantas con bajos requerimientos de agua, y se puede correr el riesgo de obtener plantas híper hidratadas que afecten la calidad de las mismas (Pérez de León *et al.*, 2020).



Figura 3.10. SIT SETIS. Imagen recuperada de:
<https://goldbio.com/uploads/documents/e180bada1cb34c1d27fac8da859b8a93.pdf>

3.11.2 Marcadores moleculares

En cuanto a estudios moleculares para este género son muy pocos y los que hay se han abocado al uso de marcadores moleculares que, determinan la diversidad genética y la caracterización de especies o ecotipos por regiones. En este sentido existe un vasto campo de aplicación que, además se ha convertido en auxiliar de investigaciones de diversa índole, entre ellas identificar las características genéticas entre individuos (Torres-Morán *et al.*, 2006). Asimismo, el cultivo de tejidos vegetales puede utilizarse para determinar la fidelidad genética entre explantes y brotes regenerados *in vitro*, como en investigaciones sobre el origen y mecanismos de la variación somaclonal, al igual que en la identificación de fenotipos mutantes y también como control de la propagación vegetativa y de la embriogénesis somática (Torres-Morán *et al.*, 2006).

En este sentido y como ejemplo, Gil-Vega *et al.*, (2001) reportaron los resultados de un análisis sobre la diversidad genética del *Agave tequilana* var. Azul usando marcadores RAPD. En dicho estudio, se extrajeron 10 plantas procedentes de cuatro áreas rurales diferentes, las cuales a su vez, pertenecen a las dos regiones de México con mayor producción, y se obtuvo que, únicamente el 0.8% de los marcadores resultaron ser polimórficos, del mismo modo se reporta que, 39 de las 40 plantas incluidas en este estudio se mostraron isogénicas, dicho de otro modo, las plantas estudiadas presentaron niveles muy bajos de polimorfismo, y esto se debe a la propagación exclusivamente vegetativa que se lleva a cabo para obtener nuevos individuos a partir de un mismo material biológico inicial, por lo que, es favorecida la susceptibilidad a plagas y enfermedades, dentro del mismo estudio los autores analizaron las relaciones genéticas entre la variedad “azul” y las variedades “chato” y “siguin” (Gil-Vega *et al.*, 2001., Domínguez-Rosales *et al.*, 2008., Barrientos-Rivera *et al.*, 2020).

Por otro lado, Keb-Llanes *et al.*, (2002), plantearon un método rápido de extracción de ADN a partir de tejidos de agave, el cual logró la extracción simultánea de ADN de entre 80 a 100 muestras diarias, con una disminución de costos y desperdicio de reactivos, gracias al ADN obtenido de este protocolo, éste pudo emplearse en el

análisis tipo ALFP. Los investigadores trabajaron con las especies de *Agave deserti*, *A. angustifolia*, *A. americana*, *A. sisalana* y tres variedades de henequén (*A. fourcroydes*) (Domínguez-Rosales *et al.*, 2008).

3.11.3 Biotecnología de Alimentos

Finalmente, otra área en la que se están implantando estudios con las plantas del género agave, es la biotecnología de Alimentos.

Por ejemplo, se han llevado a cabo estudios sobre los fructanos, los cuales se clasifican como carbohidratos no reductores y solubles en agua, además, están compuestos por unidades de fructosa con una molécula de glucosa terminal, a su vez, esta estructura puede ser de forma lineal, ramificada o cíclica, de igual manera, son los principales compuestos fotosintéticos producidos por los agaves. Asimismo, se ha indicado que los fructanos favorecen el crecimiento y actividad de microorganismos benéficos como *Bifidobacteria* y *Lactobacilli* en el intestino ya que, inhiben el crecimiento de bacterias patógenas, por lo que los fructanos son considerados prebióticos. Por otro lado, juegan un papel muy importante al ser la principal fuente de carbohidratos para la producción de los diferentes destilados de agave (Domínguez *et al.*, 2008).

Capítulo 4. Costos de producción de la micropropagación del *Agave potatorum*

Para validar si las técnicas de CTV son mejores que los sistemas tradicionales, es importante hacer una comparación y determinar las ventajas y desventajas de ambos sistemas. En este capítulo se presenta un ejercicio de cálculo sobre los costos de producción que conlleva la propagación *in vitro*, tomando como base un protocolo de micropropagación adecuado para esta especie, y de esta forma, ejemplificar la propagación masiva de plantas en un laboratorio de cultivo de tejidos, con el objetivo de resaltar las ventajas que ofrecen estas técnicas biotecnológicas, en comparación con la producción tradicional en un vivero.

Abreviaturas: Kg (Kilogramos), Mg (medio germinación), Mb (medio propagación), Mc (medio callo), Mr (medio enraizamiento).

4.1 El análisis de costos como una herramienta para el CTV

Es importante señalar que, la producción intensiva de los agaves se ha hecho a través de la germinación de semillas, al ser micropropagados sus explantes en un laboratorio de CTV, como es el caso del *A. tequilana*, sin embargo, el cálculo de los costos de producción que esta actividad conlleva no es fácil de determinar y cabe mencionar que, no está completamente documentado. Para determinar las ventajas de esta técnica es importante realizar el cálculo de los costos al realizar la propagación *in vitro* de plantas de agave, por lo que, en este capítulo se propone hacer un ejercicio de cálculo para obtener los costos de producción, y con base a los resultados elaborar una tabla comparativa respecto a los precios de los agaves obtenidos en un vivero o por método tradicional.

Para comenzar, el análisis de costos es un aliado para la dirección y gestión administrativa de cualquier empresa, ya que se puede constatar el uso de los recursos, tales como, la mano de obra directa, materiales directos y gastos indirectos de fabricación, de igual manera permite determinar el costo estándar de elaboración del producto, y con ello se puede fijar un precio adecuado dentro del mercado, en este caso de una nueva planta de agave micropropagada (Pineda-Santos, 2017).

4.1.1 Costos directos e indirectos

Cabe destacar que, el costo de un producto se obtiene a partir de los materiales o costos directos, costos indirectos y la mano de obra que participa directamente en su elaboración o fabricación. Asimismo, los costos directos son aquellos que están

relacionados con el objeto desde el punto de vista económico, a diferencia de los costos indirectos, los cuales no se pueden atribuir o relacionar de manera económica con el objeto. Por otro lado, los costos generados por la mano de obra directa se basan en la cantidad de tiempo que un trabajador dedica a la fabricación o elaboración del objeto, dicho de otro modo, es el pago o salario por realizar dicha actividad (Horngren *et al.*, 2012., Pineda-Santos, 2017). Por último, el costo estándar se obtiene con la finalidad de fijar los precios de venta del objeto, además, éste facilita las medidas de control de las operaciones al igual que, ayuda a estandarizar los procesos dentro de la cadena productiva (Uribe-Marín, 2011, UNIVÍA, 2017, Pineda-Santos, 2017).

4.1.2 Descripción del proceso para la micropropagación de *A. potatorum*

Primeramente, el conocimiento del proceso productivo y su incidencia en el procesamiento de la información contable permiten definir los principales aspectos a considerar para el registro del cálculo y análisis de los costos de producción en la micropropagación de *A. potatorum*, por lo consiguiente, es muy importante establecer las diferentes etapas de la micropropagación de esta especie, y para ello se recurrió al diseño de un protocolo de propagación *in vitro* establecido en el laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Facultad de Química, a continuación se presenta dicho protocolo.

4.2 Etapas de la micropropagación de *A. potatorum*

El protocolo de la propagación *in vitro*, para esta especie establece qué, durante la micropropagación *in vitro* de *A. potatorum* por la vía de embriogénesis somática u organogénesis, se distinguen cuatro etapas o fases indispensables:

- *Fase 0*: Fase preparatoria de las plantas donadoras de explantes o la obtención de semillas.
- *Fase I*: Establecimiento de los cultivos asépticos, germinación de semillas, inducción de brotes adventicios e inducción de callo (dependiendo del proceso morfogénético que se elija).
- *Fase II*: Multiplicación de brotes adventicios o embriones somáticos.
- *Fase III*: Enraizamiento de brotes adventicios o germinación de embriones somáticos.

- Fase IV: Aclimatación de las plántulas.

En la siguiente figura 4.0, se ilustran las fases o etapas que se llevaron a cabo dentro del proceso de micropropagación para la obtención de nuevas plantas de *A. potatorum*, fotografías obtenidas del reporte de servicio social y estancia.

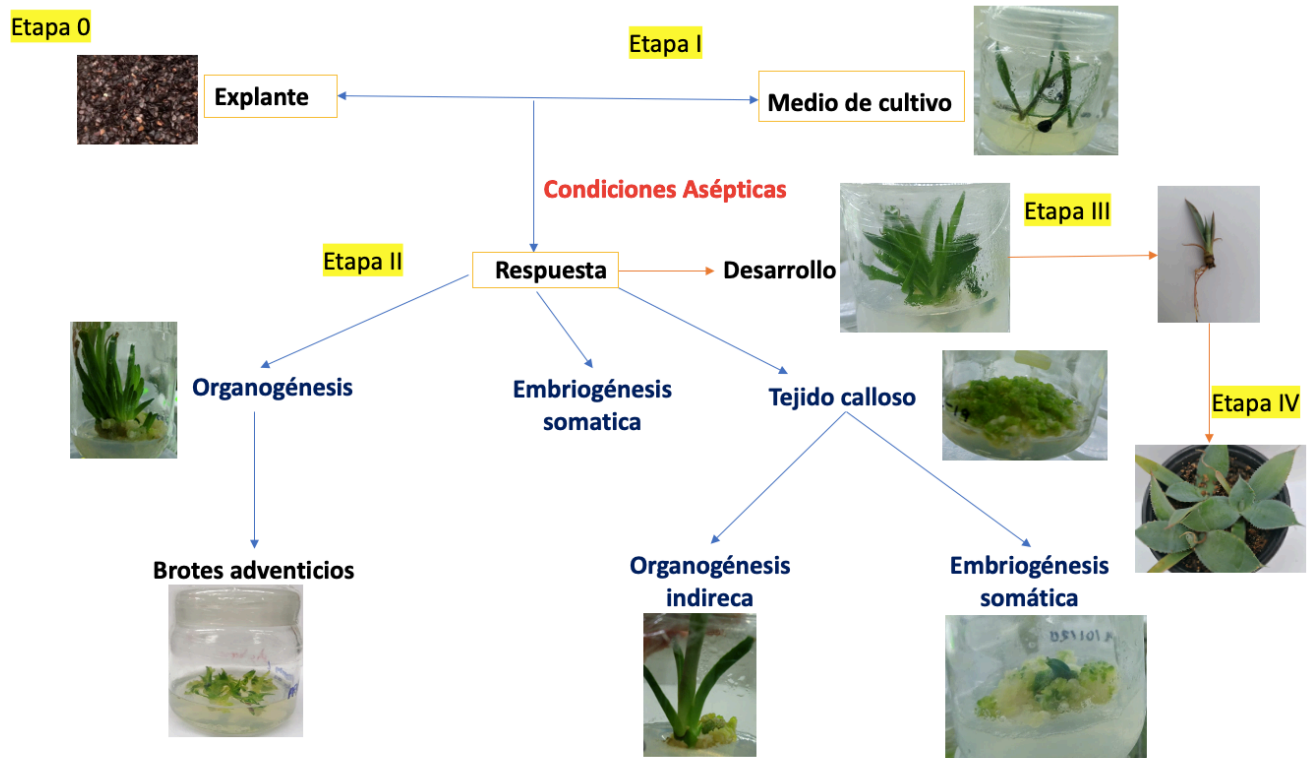


Figura 4.0. Esquema de micropropagación del *Agave tobalá* (Jara, 2020)

A continuación, en la tabla 4.1, se describen las actividades de cada una de las etapas, así como los medios utilizados para la micropropagación y los tiempos estimados para cada etapa, con base en los datos del informe de servicio social de Jara, 2020.

Tabla 4.0. Etapas y objetivos para la micropropagación de *A. potatorum*.

ACCIONES	ETAPA 0	ETAPA I	ETAPA II	ETAPA III	ETAPA IV
Objetivo	Preparación de plantas donadoras de explantes.	Establecimiento de cultivos asépticos, germinación de semillas e inducción de brotes adventicios/callos embriogénicos.	Multiplicación de brotes adventicios o embriones somáticos.	Enraizamiento de brotes adventicios o germinación de embriones somáticos.	Aclimatación de las plántulas.
Acciones	Ejecución del programa de fertilización y sanitario de plantas en invernadero.	1. Preparación de medio (Mg-1 Mb-1 y Mc-1). 2. Desinfección de semillas o hijuelos. 3. Siembra de explantes. 4. Incubación de cultivos. 5. Subcultivos (dos) cada 2 meses. 6. Incubación de cultivos.	1. Preparación de medio de cultivo (Mb-1, Mb-2 y Mc-1) 2. Subcultivos de los explantes y plantas germinadas (3 subcultivos, cada 2 meses). 3. Incubación de los cultivos.	1. Preparación del medio de cultivo (Mr-1 y Mc-2). 2. Subcultivos de brotes adventicios y callos embriogénicos (2 subcultivos cada 2 meses). 3. Incubación de cultivos.	1. Preparación de medios cultivo para embriones y plantas obtenidas (MS s/r). 2. Subcultivo (un subcultivo por un mes). 3. Inoculación de plantas obtenidas <i>in vitro</i> con micorrizas.

Tiempo de cada etapa	1 mes	4 meses	8 meses	4 meses	2 meses
Índice de contaminación, germinación y multiplicación	Contabilización de los índices y obtención de un porcentaje (%).	- Índice de contaminación (0%). - Índice de germinación (95 %). - Índice de callogénesis (83 %). - Índice de brotes (8 brotes / explante)	Incremento del callo en dos meses (140%). Índice de multiplicación de brotes (10 brotes por brote).	Índice de germinación de los embriones (6 embriones/gramo). Índice de enraizamiento (60 %).	Índice de supervivencia en condiciones de invernadero (100).
Total de callo, brotes de plantas y plántulas	Contabilización de semillas e hijuelos.	- 95 semillas germinadas de cada una se obtienen 5 explantes, en total 49. - 50 semillas sembradas se obtienen 42 semillas con callo. - 495 explantes de las que se obtienen 3960 brotes.	Total de plantas 39,600. Total de callo 6.4 Kg de callo.	Total de plantas enraizadas 23, 760 plantas enraizadas. Total de embriones germinados 38,400 y por lo tanto, total de plántulas.	23, 760 plantas de brotes adventicios y 38, 400 plantas de embriones somáticos.

4.3 Determinación de los costos directos e indirectos

La determinación de los costos directos e indirectos se logró efectuar gracias a la información obtenida del curso “Finanzas para no financieros” de la Dirección de Educación Continua que forma parte de la Facultad de Contaduría y Administración de la UNAM, impartido del 13 al 28 de mayo 2022 por el Mtro. Tomás H. Rubio Pérez. Es importante resaltar que, algunos costos no se especifican porque sería muy amplia la información, es por ello que en la tabla 4.2 solo se muestran los gastos involucrados en la tabla 4.1 de este mismo protocolo. Por otro lado, se llevó a cabo la clasificación de los gastos de operación para la obtención de plántulas de *A. potatorum* y, en la tabla 4.2. se puede observar los tipos de gastos involucrados en las diferentes etapas o fases para la obtención de nuevas plantas.

Tabla 4.1. Clasificación de gastos variables y gastos fijos en el proceso de propagación *in vitro* de *A. potatorum*.

Gastos Variables	Gastos Fijos
Componentes de medios de cultivo para cada etapa: Sales, reguladores de crecimiento, fuente de carbono, aminoácidos, agentes gelificantes y antioxidantes.	Depreciación de los equipos de laboratorio: Campana de flujo laminar, autoclave, esterilizador, mechero, balanza analítica, horno de microondas, refrigerador, parrilla de agitación, medidor de pH.
Contenedores: Bolsas, frascos, arroceras	Sueldo trabajador
	Uso de laboratorio e invernadero
	Equipo de seguridad para el trabajo (Cofia, cubrebocas, bata y guantes).

Para observar el desarrollo y la gestión del proceso de micropropagación, se dispuso a hacer uso de un cronograma de actividades, el cual involucra todas las tareas y etapas (fases) que se llevan a cabo durante el periodo la regeneración morfológica dentro de un laboratorio de CTV para la obtención de nuevas plantas de *A. potatorum*, el cual también se elaboró con los datos obtenidos del servicio social de Jara, 2020 y los resultados de García, 2019, dentro del mismo se puede observar el tiempo de duración (meses), la cantidad de medios de cultivo requeridos (L) y el total de brotes o plantas obtenidos al final de cada etapa o fase. Del mismo

modo, las actividades descritas y presentes hacen del cronograma un indicador para el cálculo de los costos de producción y que finalmente determina el costo por unidad (planta regenerada).

Tabla 4.2. Calendarización de acuerdo con el protocolo de micropropagación del *Agave potatorum*

[illegible]

SEMANAS	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	
ETAPAS/ME- DIOS DE CULTIVO																				
Etapla III: Enraizamiento y pretratamiento para la aclimatación	En esta etapa se siembran los 9120 brotes permitiéndolo su desarrollo en el primer subcultivo, para el segundo y tercer subcultivo se dividen los brotes por tamaño lográndose un total 11500 enraizadas en 900 frascos. En el cuarto subcultivo se tendrá el mismo número de plantas y solamente se dejarán durante un mes para su próxima aclimatación.												1° sub		2° sub		3°sub			
													255	25.5 L	900	90 L	900	90 L		
													Fcos	Med	Fcos	Med	Fcos	Med		
Etapla IV: Aclimatación y crecimiento de plantas bajo condiciones <i>in vitro</i>	Adaptación			Crecimiento			Alargamiento			Durante esta etapa las plantas se pasan a maceta y durante un mes se fertilizan, se permite su adaptación a condiciones de invernadero, además de ayudar a su fortalecimiento a través de la fertilización.								Aclima- tación		
	Aclimatación y crecimiento de plantas bajo condiciones de invernadero																	11,500	207 costa les (40 Kg)	
	Sustrato / Fertilización																	Env.	Sus.	

4.4 Resultados de los costos por unidad y comparación con los precios del mercado

En la siguiente tabla se puede observar el costo calculado por unidad, de una nueva planta de *A. potatorum*, con base al diagrama de la micropropagación (fig. 4.1), para ello, se consideraron los costos variables, fijos y los rendimientos reportados en el trabajo de servicio social por propagación *in vitro*, cabe señalar que, para establecer este precio se tomó en cuenta una utilidad del 50%.

Finalmente, se han logrado destacar las ventajas y desventajas, que tiene la micropropagación del agave tobalá dentro un laboratorio de cultivo de tejidos vegetales, en cuanto a su precio a la venta, se consideró que los nuevos ejemplares se obtuvieron bajo condiciones *in vitro*, por lo que se realizó una comparación con los otros agaves que están a la venta, y los cuales se obtienen por un sistema tradicional, los precios de las empresas que comercian con esta especie, y el precio de los agaves micropropagados se presentan en la siguiente tabla 4.3

Tabla 4.3. Costo por unidad de planta de *A. Potatorum*, ventajas y desventajas, en comparación con otros costos del mercado para esta misma especie.

Sistema de Producción	Empresa	Precio (en pesos mexicanos) por unidad	Descripción de la planta	Ventajas / Desventajas
Cultivo de Tejidos	UNAM, Facultad de Química, LAB. CTV.	\$37.99	-Plantas obtenidas <i>in vitro</i> y adaptadas a suelo. -Tamaño de la planta: 10 cm de alto x 22 cm de ancho. Libre de patógenos y sin daños.	<u>Ventajas:</u> -Planta libre de patógenos. -Producción de la planta homogénea a gran escala y continua. Se pueden entregar mensualmente. -Conservación de la variabilidad genética por prevenir de semillas. -Propagación más rápida y eficiente. -No transmite enfermedades y se entregan adaptadas embolsadas. -Precios competitivos según la cantidad y número requeridos. -Es sustentable la obtención de plantas, ya que no se depreda la especie porque no se extraen de los hábitats naturales. <u>Desventajas:</u>

				-La variación de los precios, pueden cambiar debido a que varios reactivos están sujetos al cambio del dólar, ya que los componentes de los medios de cultivo son importados. Así mismo, puede variar el costo de los plásticos utilizados como contenedores debido a que, dependen del precio del petróleo. -Un sistema que, al principio puede ser costoso por el establecimiento del laboratorio que resulta tener un costo elevado. -Durante el proceso de subcultivo se pueden presentar problemas de contaminación y de hiperhidratación que resulten en una baja en la producción, sin embargo, se puede mejorar en las siguientes etapas.
	Etsey	\$147.87 más envío	10 semillas	<u>Ventaja:</u> Envío por paquetería a nivel nacional <u>Desventaja:</u> Se desconoce el origen de la semilla, sus características (homogéneas), puede ser depredada de su hábitat natural, al igual que, se desconocen sus condiciones de salubridad.
Vivero	Ocompra	\$950.00	15 cm de altura s/maceta	<u>Ventaja:</u> Envío por paquetería <u>Desventaja:</u> Se desconoce el origen de la planta y su precio no es competitivo dentro del mercado.
Vivero Agave rayado de Santa Cruz	Verdi Arizona y Sonora	\$200.00	12.7 cm de altura c/maceta	<u>Ventaja:</u> Cuenta con un permiso especial por parte de la Secretaría del Medio ambiente y recursos naturales para la reproducción de cactáceas y suculentas <u>Desventaja:</u> Se desconoce el origen de la planta, si es que provienen de semilla.
Vivero Oaxaca San Juan	Productores forestales y agronómicos	\$8.00 - \$12.00	4-12 cm s/maceta	<u>Ventaja:</u> Precio competitivo <u>Desventaja:</u> Origen desconocido, la plantas pueden ser trasladadas a campo y morir por enfermedad.

Chilateca, Ocotlán				
Vivero	Vivero de maguey Oaxaca	\$7.00	10-10 cm s/maceta	<u>Ventaja:</u> Precio económico <u>Desventajas:</u> Origen desconocido, por otro lado, son plantas pequeñas no hay aseguramiento de su supervivencia cuando se pasen a campo.
Maguey mezcalero *Se desconoce la procedencia	Mercado Libre	\$35.00	10 cm s/maceta	<u>Ventaja:</u> Precio competitivo y envío por paquetería nacional. <u>Desventaja:</u> Origen desconocido, no hay garantía de supervivencia.
Maguey vivero	Mercado Libre, vendedor instinto	\$100.00	20 cm s/maceta	<u>Ventaja:</u> Tamaño de la planta y envío por paquetería nacional. <u>Desventaja:</u> Origen desconocido, no hay garantía de supervivencia y pueden ser depredadas del campo.
Vivero de Oaxaca de Juárez	Ocompra.com	\$300.00	30 cm s/maceta	<u>Ventaja:</u> Tamaño de la planta y envío por paquetería. <u>Desventaja:</u> Origen desconocido, no hay garantía de supervivencia y pueden ser depredadas del campo.

***Nota:** Se desconoce la procedencia de la nueva planta, si se obtuvo por vivero o micropropagación.

Como se puede observar en los resultados de la tabla 4.3, el precio de las plantas obtenidas mediante la propagación *in vitro* es competitivo, accesible y negociable. Cuenta con más ventajas que desventajas, para poder establecerse en el mercado, siendo lo más importante el hecho de que ayudaría a reducir la depredación de la especie y la conservación de la misma, al ser individuos provenientes de semilla. Por último, el establecimiento del protocolo de micropropagación y la obtención de plantas regeneradas, son el primer eslabón en la cadena para emplearlas como materia prima en la producción de mezcal o también para llevar a cabo la conservación de la especie.

IV. CONCLUSIONES

- Los agaves son plantas representativas de nuestro país, cuentan con una fisiología y un sistema metabólico que les permite sobrevivir a climas adversos, son endémicas de varios estados de la república, y además son ampliamente empleadas en la industria de alimentos y bebidas, incluso presentan usos medicinales y de ornamenta.
- El mezcal es una bebida espirituosa y originaria de nuestro país, el cual también se ha vuelto un destilado de alto valor, apreciado y consumido en varias partes del mundo, sin embargo su crecimiento en exportación e importación como se reporta en el último informe estadístico (2032) elaborado por el COMERCAM y las proyecciones realizadas por SAGARPA, SIAVI (2017) estiman un incremento en la producción de mezcal para el año 2030, esta situación pone en riesgo a varias especies de *agave*, y en particular a los ejemplares silvestres que se reproducen únicamente por la vía sexual (por semilla) como es el caso del *Agave potatorum* Zucc.
- El cultivo de tejidos vegetales se presenta como alternativa viable para la regeneración y recuperación de los agaves, como lo es para el originario de los Valles de Tehuacán-Cuicatlán, *A. potatorum*, por medio de su micropropagación se puede obtener una gran cantidad de plantas, en espacios reducidos y disponibilidad en cualquier momento del año, estos nuevos individuos pueden conservar la variabilidad genética al ser

organismos originados a partir de semillas. Por otro lado, actualmente, existen innovaciones tecnológicas que mejoran día con día, como los SIT, que permiten contar con cultivos más homogéneos, y en menor tiempo.

- En el ejercicio de costos se ejemplificó el sistema de producción *in vitro* en un laboratorio de CTV, y por medio de la organogénesis o embriogénesis somática, se llevó a cabo la producción y obtención de plantas, con base en el protocolo y cronograma de propagación *in vitro*, para *A. potatorum*. Lo cual indica que, partiendo de 100 semillas se pueden llegar a obtener 11,500 plantas en un periodo de 61 semanas, cabe destacar que los tejidos regenerados están libres de patógenos, cuentan con variabilidad genética y presentan viabilidad. El empleo de esta herramienta biotecnológica y con la optimización de sus procesos se anticipa una mejora continua de los protocolos de micropropagación para esta especie ya sea, modificando los componentes de los medios de cultivo, implementado los sistemas de SIT, y adecuando las condiciones del laboratorio, entre otras.
- La importancia de conocer los costos de producción para la obtención de nuevos individuos del agave tobalá, aporta planeación y gestión, lo que beneficia a la producción, para así realizar ajustes o estrategia. Así como el establecer un precio adecuado y competitivo en el mercado, gracias a ello, se pueden fijar los precios de los agaves propagados, al igual que constatar las ventajas que presenta la micropropagación vs otros métodos.
- Es necesario que las grandes empresas mezcaleras implementen una estructura en la cadena productiva para que la producción sea lo más sustentable posible, el objetivo de un desarrollo sustentable es proteger al ecosistema, ya que si la sobreexplotación de estas especies continua y no se regula esta práctica se va a tener un agotamiento en el sistema mezcalero y esto tendrá repercusiones ambientales y económicas. De igual manera, se requiere mantener un equilibrio para evitar la extracción masiva de la especie por la sobredemanda del mercado, y del mismo modo que la economía de las comunidades que se dedican a esta actividad no se vea afectada, ya que es la principal fuente de ingresos de los pequeños productores de mezcal, en estados que presentan altos índices de pobreza.

V. REFERENCIAS

- Agencia de servicios a la comercialización y desarrollo de mercados agropecuarios (ASERCA). (2018). Charanda bebida alcohólica de Uruapan, Estado de Michoacán. Recuperado de <https://www.gob.mx/aserca/articulos/charanda-bebida-alcoholica-regional-de-uruapan-estado-de-michoacan>
- Aguado-Santacruz, G. A., Aguado-Rodríguez, D. L., Moreno-Gómez, B., Arroyo-González, D., Centeno-Jamaica, D., Aguirre-Mancilla, C. L., & García-Moya, E. (2022). ENDOMICROBIOTA BACTERIANA DE AGAVE PULQUERO (*Agave salmiana*). I. AISLAMIENTO, FRECUENCIA E IDENTIFICACIÓN MOLECULAR. *Revista Fitotecnica Mexicana*, 45(2), 243. <https://doi.org/10.35196/rfm.2022.2.243>
- Aguilar, M. (2017). Zihuaquio, Guerrero: Comunidad Mezcalera sin marcas certificadas. Recuperado de <https://mezcologia.mx/zihuaquio-guerrero-comunidad-mezcalera-sin-marcas-certificadas/>
- Aguilar-Jiménez, D., & Rodríguez-de la O, J.L. (2018). Micropropagación y aclimatación de Maguey Pitzometl (*Agave marmorata* Roezl) en la Mixteca Poblana. *Revista Colombiana Biotecnología*, 20(2), 124-131. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v20n2.77084>
- Aguirre-Dugua, X., & Eguiarte, L.E. (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(1), 36-44.
- Aguirre-Rivera, J.R., Charcas-Salazar, H., & Flores-Flores, J.L. (2001). *El maguey mezcalero potosino*. COPOCYT, Gobierno del Estado de San Luis Potosí e Instituto de Investigación de Zonas Desérticas, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, México. 87.
- Alimentos enriquecidos con fibra de agave. (2017, 30 mayo). Recuperado 7 de marzo de 2022, de <https://comedores-industriales.com.mx/alimentos-enriquecidos-fibra-agave/>
- Álvarez, C., Sáez, P., Sáez, K., Sánchez-Olate, M., & Ríos, D. (2012). Effects of light and ventilation on physiological parameters during *in vitro* acclimatization of *Gevuina avellana* mol. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 110(1), 93-101.
- Andrijany, V.S., Indrayanto, G., & Soehono, L.A. (1999). Simultaneous effect of calcium, magnesium, copper and cobalt ions on sapogenin steroids content in callus cultures of *Agave amaniensis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 55(1), 103-108.
- Ángeles-Vázquez, B. V., Mercado- Flores, Y., García-Mendoza, A.J., Rodríguez Garay, B., Anducho-Reyes, M.A., & Álvarez-Cervantes, J. (2017). Embriogénesis somática:

Una alternativa para el cultivo masivo del maguey pulquero *Agave salmiana* var. *salmiana*. *Ciencias Multidisciplinarias* (SIMCI). p. 43.

- Angeles-Vázquez, B. V., Álvarez-Cervantes, J., Tovar-Jiménez, X., & Rodríguez-Garay, B. (2023). Regeneración de plantas por embriogénesis somática indirecta de agave *Salmiana Otto ex Salm- Dyck Subsp. Salmiana* usando embriones cigóticos obtenidos por polinización in-casa como explantes. *POLIBOTÁNICA*, 56, 171-182. <https://doi.org/10.18387/polibotanica.56.9>
- Arrizón-Gaviño, J. (2020). *Bebidas fermentadas de agave*. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. (CIATEJ). Recuperado de: <https://ciatej.mx/el-ciatej/comunicacion/Noticias/Bebidas-fermentadas-de-agave/157>
- Arzate-Fernández, A., Brumbley, S. M., Escutia, J. L. P., & Reyes-Díaz, J. (2014). IDENTIFICACIÓN DE GENES DE SOBREEXPRESIÓN DURANTE EL PROCESO DE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN *Agave angustifolia* HAW. *Proyecto de Investigación. Universidad Autónoma del Estado de México.*, 2. Recuperado de <http://ri.uaemex.mx/handle/20.500.11799/49667>
- Arzate-Fernández, A. M., Piña-Escutia, J. L., Norman-Mondragón, T. H., Reyes-Díaz, J. I., Guevara-Suárez, K. L., & Vázquez-García, L. M. (2016). REGENERACIÓN DE AGAVE MEZCALERO (*Agave angustifolia* HAW.) A PARTIR DE EMBRIONES SOMÁTICOS ENCAPSULADOS. [Imagen] *Revista Fitotecnia Mexicana*, 39(4), 359-366. <https://doi.org/10.35196/rfm.2016.4.359-366>
- Aureoles-Rodríguez, F. Rodríguez- de la O, J., Legaria-Solano, J., Shagún-Castellanos, J., y Peña-Ortega, M. (2008). Propagación *in vitro* del Maguey bruto (*Agave inaequidens* Koch), una especie amenazada de interés económico. *Chapingo, Serie horticultura*, 14(3), 263-269.
- Bancomext Centro-Oaxaca. (2001). Guía de exportación del mezcal al mercado americano. Oaxaca: Bacomext. Recuperado de http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/lri/salvatierra_g_a/apendiceF.pdf
- Barrientos-Rivera, G., Hernández-Castro, E., Sampedro-Rosas, M. L., & Segura-Pacheco, H. R. (2020). Conocimiento tradicional y academia: productores de maguey y mezcal de pequeña escala en las regiones Norte y Centro de Guerrero, México. *Sociedad y ambiente*, (23), 1-28. <https://doi.org/10.31840/sya.vi23.2173>
- Bautista-Castellanos, A. I., Valle, J. R. E., Velasco-Velasco, V. A., & Rodríguez-Ortiz, G. (2020). Enraizado de brotes in vitro y aclimatación de plantas de *agave potatorum*

agropecuarios, 7(3). <https://doi.org/10.19136/era.a7n3.2618>

- Bautista-Montes, E., Hernández-Soriano, L., & Simpson, J.(2022). Advances in the Micropropagation and Genetic Transformation of Agave Species. *Plants*, 11, 1757. <https://doi.org/10.3390/plants11131757>
- Berjak, P., y Pammenter, N.W. (2010). Semillas ortodoxas y recalcitrantes. *Manual de Semillas de Árboles Tropicales*. Universidad de Natal Sudáfrica, 143-155.
- Betancourt-Radilla, R. (2020). Peligra por la violencia la producción de mezcal de Zihuaquio, advierten. El sur periódico de Guerrero. Recuperado de: <https://suracapulco.mx/peligra-por-la-violencia-la-produccion-de-mezcal-de-zihuaquio-advierten/>
- Bhojwani, S. S., & Dantu, P. K. (2013). Plant Tissue Culture: An Introductory text. *Springer eBooks*. <https://doi.org/10.1007/978-81-322-1026-9>
- Binh, L. T., Muoi, L. T., Oanh, H. T. K., Thang, T. D., & Phòng, Đ. T. (1990). Rapid propagation of agave by in vitro tissue culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 23(1), 67-70. <https://doi.org/10.1007/bf00116091>
- Biodiversity Heritage Library. (2018). *Anatomía de A. potatorum* [Ilustración]. Creazilla. <https://creazilla.com/nodes/>
- Blok, C., & Wever, G. (2008). Experience with selected physical methods to characterize the suitability of growing media for plant growth. *Acta horticulturae*, (779), 239-250. <https://doi.org/10.17660/actahortic.2008.779.29>
- Campos-Ruíz, J., Arteaga-Cuba, M., Ruiz, & Campos-Ruíz, S. (2020). Establecimiento de un protocolo de desinfección y micropropagación *in vitro* de “caoba” *Swietenia macrophylla* King (Meliaceae). *Arnaldoa*, 27(1), 141-156. <https://doi.org/10.22497/1500>
- Canuto, R.A. (2012). *Dehydrogenases*. InTech Design Team. Croatia. 366 p.
- Cervantes-Ramírez, M.C. (2002). Plantas de importancia económica en las zonas áridas y semiáridas de México. *Instituto de Geografía*. Recuperado de <http://www.librosoa.unam.mx/handle/123456789/1414>
- Cervantes-Dueñas, A. (2016). Presencia de saponinas en Agave spp. de México. *BIOZ. Revista electrónica de Biología*, 1(1), 2-4.
- Chandra, S., Bandopadhyay, R., Kumar, V., & Chandra, R. (2010). Acclimatization of tissue cultured plantlets: from laboratory to land. *Biotechnology Letters*, 32(9), 1199-1205. <https://doi.org/10.1007/s10529-010-0290-0>

- Chavoya-Cruz, M. (2020). Mezcal: Origen, historia y consumo del auténtico destilado nacional desde el siglo XVI. *Relatos e historias en México*, 143. Recuperado de <https://relatosehistorias.mx/nuestras-historias/mezcal-ancestral-artesanal-e-industrial>
- Cházaro, M., Valencia, O., Hernández, M. (2007). Agaves silvestres usados en la elaboración de bebidas alcohólicas. *Agaves del Occidente de México*. Guadalajara, México: CUCBA-CUCSH, 123-126.
- CIATEJ (Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y diseño del Estado de Jalisco). (2014). Manual para la estandarización de los procesos de producción de mezcal guerrerense. Recuperado de: <https://ciatej.mx/dyd/manualmezcalguerrerense.pdf>
- CIATEJ (Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y diseño del Estado de Jalisco). (2020). La producción de Mezcal en el estado de Michoacán. Gobierno de Michoacán, 47-87.
- CIATEJ (Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y diseño del Estado de Jalisco)., & Arrizón-Gaviño, J. (2020). Bebidas fermentadas de agave. Recuperado de: <https://ciatej.mx/el-ciatej/comunicacion/Noticias/Bebidas-fermentadas-de-agave/157>
- Colunga-García Marín, P., & Zizumbo Villarreal, D. (2007). El tequila y otros mezcales del centro-occidente de México: domesticación, diversidad y conservación de germoplasma. *CICY-CONACYT-CONABIO-INE* .113-129.
- Colunga-García Marín, P., Zizumbo-Villarreal, D. & Martínez-Torres, J. (2007). Nombres comunes de 102 taxa de Agave reportados por su uso en México como alimento humano, bebida fermentada, bebida destilada fibra o forraje. *En lo ancestral hay futuro: del tequila, los mezcales y otros Agaves*,19-38.
- Comisión Nacional para el conocimiento y el uso de la diversidad (CONABIO). (2006). *Mezcales y diversidad*. 2ª ed. Consejo Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México. Recuperado de https://bioteca.biodiversidad.gob.mx/janium-bin/janium_zui.pl?jzd=/janium/Documentos/ETAPA06/AP/5324/Mezcales.jzd&fn=5324
- Comisión Nacional para el Desarrollo de los Pueblos Indígenas (CDI). (2015). Mezcal, alimentos y bebidas de los pueblos indígenas de México, 103.
- Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). (2021). Biodiversidad mexicana: Magueyes. Recuperado de <https://www.biodiversidad.gob.mx/diversidad/alimentos/magueyes>
- Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). (2021). Biodiversidad mexicana: Qué nos aportan los agaves. Recuperado de https://www.biodiversidad.gob.mx/diversidad/alimentos/que-nos-aportan/N_agaves

- Copeland, L. O., & McDonald, M. B. (1999). Principles of Seed Science and Technology. *Springer eBooks*. <https://doi.org/10.1007/978-1-4615-1783-2>
- COMERCAM (Consejo Mexicano Regulador de la Calidad del Mezcal). (2015). Informe de actividades.
- COMERCAM (Consejo Mexicano Regulador de la Calidad del Mezcal). (2023). *Producción de mezcal por año* [Imagen]. Informe estadístico 2023. https://comercam-dom.org.mx/wp-content/uploads/2023/05/INFORME-2023_PUBLICO.pdf
- COMERCAM (Consejo Mexicano Regulador de la Calidad del Mezcal). (2023). *Producción de mezcal por categoría* [Imagen]. Informe estadístico 2023. https://comercam-dom.org.mx/wp-content/uploads/2023/05/INFORME-2023_PUBLICO.pdf
- COMERCAM (Consejo Mexicano Regulador de la Calidad del Mezcal). (2023). *Producción nacional de mezcal por clase* [Imagen]. Informe estadístico 2023. https://comercam-dom.org.mx/wp-content/uploads/2023/05/INFORME-2023_PUBLICO.pdf
- COMERCAM (Consejo Mexicano Regulador de la Calidad del Mezcal). (2023). *Producción nacional por especie de agave (maguey)* [Imagen]. Informe estadístico 2023. https://comercam-dom.org.mx/wp-content/uploads/2023/05/INFORME-2023_PUBLICO.pdf
- Consejo Mexicano Regulador de la Calidad del Mezcal, A.C. (COMERCAM). (2023). Informe Estadístico. Recuperado de: https://comercam-dom.org.mx/wp-content/uploads/2023/05/INFORME-2023_PUBLICO.pdf
- CONABIO (2006). *Distribución de los agaves en México* [Imagen]. Mezcales y diversidad. https://bioteca.biodiversidad.gob.mx/janium-bin/janium_zui.pl?jzd=/janium/Documentos/ETAPA06/AP/5324/Mezcales.jzd&fn=5324
- Consulmex. NOTISEM, SER. (2016). Denominación de origen del mezcal. Recuperado de <https://consulmex.sre.gob.mx/mcallen/images/stories/PDF/2016/spmezcal.pdf>.
- Cruz-García, H., Campos-Ángeles, G.V., Enríquez-del Valle, J.R., Velasco-Velasco, V.A., & Rodríguez-Ortiz, G. (2017). Senescencia foliar en plantas micropropagadas de *Agave americana* durante su aclimatización. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 8(1), 381-391.
- Dahlgren, R. M. T., H. T. Clifford y P. F. Yeo. (1985). The Families of The Monocotyledons: Structure, Evolution and Taxonomy. *Kew Bulletin*, 42(1) <https://doi.org/10.1007/978-3-642-61663-1>

- Das, T. (1992). Micropropagation of Agave Sisalana. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 31(3), 253-255. <https://doi.org/10.1007/bf00036233>
- Deb, C. R., & Imchen, T. (2009). An efficient in vitro hardening technique of tissue culture raised plants. *Biotechnology(faisalabad)*, 9(1), 79-83. <https://doi.org/10.3923/biotech.2010.79.83>
- Debnath, M., Pandey, M., Sharma, R., Thakur, G.S., Lal, P., Debnath and M. Pandey. (2010). Biothechnological intervention of agave sisalana: a unique fiber yielding plant with medicinal property, *Journal of Medicinal Plants Research* 4(3), 177-187.
- Delgado-Lemus, A. (2008). Aprovechamiento y disponibilidad especial de *Agave potatorum* en San Luis Atolotlán, Puebla, México. Tesis de maestría. Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México. México, Morelia.
- Delgado-Lemus, A., Torres, I., Blancas, J. & Casas, A. (2014). Vulnerability and risk management of Agave species in the Tehuacán Valley, México. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, (10), 53-67. DOI: 10. 1186/1746-4269-10-53.
- Domínguez-Rosales, M. S., González-Jiménez, M. D. L. L., Rosales-Gómez, C., Quiñones-Valles, C., Delgadillo-Díaz de León, S., Mireles-Ordaz, S. J., & Pérez- Molphe Balch, E. (2008). El cultivo *in vitro* como herramienta para el aprovechamiento, mejoramiento y conservación de especies del género agave. *Investigación y Ciencia*, 16(41),53-62. ISSN: 1665-4412. Recuperado de <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=67404109>
- Domínguez-Rosales, M., Alpuche- Solís, Á., Vasco-Mández, N., Pérez-Molphe, B. (2008). Efecto de citocinas en la propagación *in vitro* de agaves mexicanos. *Fitotecnica Mexicana*. 31(4), 317-322.
- Duque-Sánchez, J.C. (2013). *Evaluación de tres métodos de reproducción del penco azul (Agave americana), en la parroquia tocachi, cantón Pedro Moncayo provincia pichincha* [Título profesional, Universidad politécnica Salesiana sede Quito] Repositorio de tesis de la Universidad politécnica Salesiana.
- Eguiarte, L. E., Souza, V., & Silva-Montellano, A. (2000). Evolución de la familia Agavaceae: filogenia, biología reproductiva y genética de poblaciones. *Botanical sciences*, (66), 131-150. <https://doi.org/10.17129/botsci.1618>
- Enciclovida. (2021). *Agave shrevei*. <https://enciclovida.mx/especies/191500-agave-agave-shrevei>;
- Enciclovida. (2021). Maguey Lechuguilla de la Sierra (*Agave bovicornuta*). (2021). <https://enciclovida.mx/especies/191089-agave-agave-bovicornuta>;

- Enciclovida. (2021). Mezcal cenizo (Agave colorata). (2021). <https://enciclovida.mx/especies/191141-agave-colorata>
- Enríquez-del Valle, J.R., Carrillo-Castañeda, G., & Rodríguez-de la O, J.L. (2005). Sales inorgánicas y ácido indolbutírico en el enraizado *in vitro* de brotes de *Agave angustifolia*. *Revista Fitotecnia Mexicana*, (28), 175-178.
- Enríquez-del Valle, J.R, Cruz-Valdez, I., Carrillo-Castañeda, G. (2012). Acclimatization of *Agave angustifolia* Haw. Vitroplants in inert substrates and fertigated with different nutrimental dose. *Acta Horticulturae* (947), 101-104.
- Enríquez-del Valle, J.R., Miguel-Luna, M.E., Velasco-Velasco, V.A., Villegas-Aparicio, Y., Carrillo-Rodríguez, J.C & Rodríguez-Ortiz, G. (2013). Composición del medio de cultivo y la incubación para enraizar brotes de *Agave*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* (6), 1151-1159.
- Erazo-Parga, M., & Cárdenas-Romero, R. (2013). Ecología. Impacto de la problemática ambiental actual sobre la salud y el ambiente. *Ecoe ediciones*, 63-85. ISBN: 958-648-828-4
- Escalona, M., Lorenzo, J., González, B., Daquinta, M., González, J., Desjardins, Y., & Borroto, C. (1999). Pineapple (*Annanas comosus* 1. Merr) micropropagation in temporary immersion systems. *Plant Cell Reports* 18 (9), 743-748.
- Escamirosa-Tinoco, C., Cruz, D. L. G., & Argüello, L. A. L. (2017). EFECTO DEL DÉFICIT DE PRESIÓN DE VAPOR EN EL CRECIMIENTO DE PLANTAS DE agave potatorum zucc. BAJO AMBIENTE CONTROLADO y EN CAMPO. *Universidad & Ciencia*, 6, 18-26. Recuperado de <https://revistas.unica.cu/index.php/uciencia/article/view/698>
- Escamirosa-Tinoco, C., Martínez, G.A., y Guzmán, D.L. (2019). Estudios preliminares para la creación de indicación una geográfica protegida, para el mezcal tobalá proveniente de *A. potatorum* zucc., en una microrregión marginada de Oaxaca, México. *Universidad & Ciencia*, 8, Recuperado de <https://revistas.unica.cu/uciencia>
- Esparza-Ibarra, E., Violante-González, J., Monks, S., Cadena-Iñíguez, J., Araujo-Andrade, C., & Rössel-Kipping, E. D. (2015). *Los agaves mezcaleros del altiplano potosino y zacatecano*. Recuperado de <https://digitalcommons.unl.edu/biodiversidad/20/>
- Esparza-Ibarra, E.L. (2015). *Anatomía del agave*. [Imagen]. DigitalCommons@University of Nebraska-Lincoln. <https://digitalcommons.unl.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1019&context=biodiversidad>

- Espinosa-Barrera, L.A. (2015). Generalidades e importancia de los agaves en México. *Herbario CICY* 7, 161-163, Recuperado de: https://www.cicy.mx/Documentos/CICY/Desde_Herbario/2015/2015-10-22-Espinosa_Barrera-Generalidades_e_importancia_de_los_agaves_en_Mexico.pdf
- Espinosa-Leal, C., Puente-Garza, C. A., & García-Lara, S. (2018). In vitro plant tissue culture: means for production of biological active compounds. *Planta*, 248(1), 1-18. <https://doi.org/10.1007/s00425-018-2910-1>
- Esqueda V., M., M. L. Coronado, A., A.H. Gutiérrez S. & T. Fragoso G. (2011). *Agave angustifolia* Haw. Técnicas para el trasplante de vitroplantas a condiciones de agostadero. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. México, 20. Recuperado de: <https://www.gob.mx/snics/acciones-y-programas/agave-agave-spp>
- Evaluación del contenido de azúcares en piñas de agave mezcalero producido en la región SE del Estado de Durango. (2016). Informe técnico final. Recuperado 14 de abril de 2023, de http://sappi.ipn.mx/cgpi/archivos_anexo/20060256_2900.pdf
- Ewaid, D., & Kretschmar, U. (1996). The influence of micrografting in vitro on tissue culture behavior and vegetative propagation of old European larch trees. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 44(3), 249-252. <https://doi.org/10.1007/bf00048531>
- FAO. (2017). La estrategia _de la _FAO sobre el cambio climático. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Rome, Italy. 52 pp. <http://www.fao.org/3/i7175s/i7175s.pdf>
- Far out flora. (2021). *Agave tobalá* [Imagen]. FAR OUT FLORA. <https://faroutflora.com/tag/agave/>
- Fenner, M. (2000). Seeds: The Ecology of Regeneration in plant Communities. *CABI Publishing*, 410. <https://doi.org/10.2307/2261509>
- Flash, E. (2021). Lechuguilla, desde lo profundo de la sierra de Chihuahua. *Destilados campesinos de México*. Recuperado de <http://www.destiladoscampesinos.com/2021/05/22/lechuguilla-desde-lo-profundo-de-la-sierra-de-chihuahua/>
- Fonseca Varela, M. (2020). *Función de producción en el tiempo de agave (potatorum zucc) y mezcal: estudio de caso en Caltepec, Puebla*. (Tesis de maestría). Institución de enseñanza e investigación en ciencias agrícolas. Recuperado de: http://colposdigital.colpos.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/10521/4326/Fonseca_Varela_M_MC_ISEI_Economia_2020.pdf?sequence=1&isAllowed=y

- Freeman, C.E., Tiffany, R.S., & Reid, W.H. (1977). GERMINATION RESPONSES OF AGAVE LECHUGUILLA, *A. parryi*, and *Fouquieriasplendens*. *The southwestern Naturalist* (22), 195-204.
- Gallardo-Valdes, J. (2017). Breviario mezcalero. [Imagen]. <https://www.circular.org.mx/editorial/breviario-mezcalero>
- García-Mendoza, A.J., & Galván, R. (1995). Riqueza de las Familias *Agaváceae* y *Nolinaceae* en México. *Boletín de la sociedad Botánica de México* (56), 7-24.
- García-Mendoza, A.J. (2007). Los Agaves de México. *Ciencias-Universidad Nacional Autónoma de México* 14(87), 15-23. <https://www.revistacienciasunam.com/images/stories/Articles/87/02/Los%20agaves%20de%20Mexico.pdf>
- García-Mendoza, A.J. (2010). Revisión taxonómica del complejo *Agave potatorum* zucc. (Agavaceae): nuevos taxa y neotipificación. *Acta botánica mexicana* (91), 71-93. Recuperado de <https://www.scielo.org.mx/pdf/abm/n91/n91a8.pdf>
- García-Mendoza, A.J (2012). México, país de magueyes. *La Jornada: Suplemento la Jornada del campo* (53). Recuperado de <https://www.jornada.com.mx/2012/02/18/cam-pais.html>.
- García-Mendoza, A. J., Franco-Martínez, I. S., & Sandoval-Gutiérrez, D. (2019). Cuatro especies nuevas de *Agave* (Asparagaceae, Agavoideae) del sur de México. *Acta Botánica Mexicana* (126), 1461. DOI: 10.21829/abm126.2019.146
- Garrido, J. L. H., Rey, P. J., & Herrera, C. M. (2005). Fuentes de variación en el tamaño de la semilla de la herbácea perenne *Helleborus foetidus* L. (Ranunculaceae). *Anales Del Jardin Botánico De Madrid*, 62(2). <https://doi.org/10.3989/ajbm.2005.v62.i2.10>
- Geneve, R. (2011). Propagation from Nonmeristematic Tissues-Organogenesis. *Plant tissue culture, development and biotechnology*, 245-259.
- Gentry, H. S. (1982). *Agaves of Continental North America*. <https://doi.org/10.2307/j.ctv1t4m2h4>
- George, E.F. y Sherrington, P.D. (1984) *Plant Propagation by Tissue Culture: A Handbook and Dictionary of Commercial Laboratories*. Exgetics Ltd., England.
- George, E., Hall, M., & De Klerk, G. (2008). *Plant Propagation by tissue culture. The background*. Springer. 279 pp.
- George, E. F. (2007). *Plant propagation by tissue culture*. Springer eBooks. <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5005-3>
- George, E.F. (2008). *Plant propagation by Tissue culture*. 3rd Edition, 175-204.

- Geydan, T. D., & Melgarejo, L. M. (2005). Metabolismo ácido de las crasuláceas. *Acta Biológica Colombiana*, 10(2), 3-15. <https://www.redalyc.org/pdf/3190/319028577010.pdf>
- Gil-Vega, K., M. González Ch., Martínez, O., Simpson, J., & Vandermark, G. (2001). Analysis of genetic diversity in *Agave tequilana* var. azul using RAPD markers. *Euphytica* (119), 225-341.
- Gresshoff, P.M., y Doy, C.H. (1972). Development and Differentiation of Haploid *Lycopersicum esculentum* (Tomato). *Planta*, 107, 161-170. <https://doi.org/10.1007/BF00387721>
- Groenewald, E., Wessels, D., & Koeleman, A. (1977). Callus formation and subsequent plant regeneration from seed tissue of an agave species (Agavaceae). *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 81(4), 369-373. [https://doi.org/10.1016/s0044-328x\(77\)80105-0](https://doi.org/10.1016/s0044-328x(77)80105-0)
- Gutiérrez-Hernández, G.F., Vázquez-Ramos, J.M., García-Ramírez, E, Franco-Hernández, O., Arellano-Vázquez, J.L., y Durán-Hernández, D. (2011). Efecto del envejecimiento artificial de semillas de maíces criollos azules en su germinación y huella genómica. *Revista fitotecnica mexicana* (34), 77-84.
- Hazra, S., Das, S., & Das, A. (2002). Sisal plant regeneration via organogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 70(3), 235-240. <https://doi.org/10.1023/a:1016517617039>
- Hernández, G. F. G., Ortiz-Hernández, Y. D., Ríos, L. J. C., & Bolaños, T. A. (2020). Composición química y germinación de semillas de tobalá (agave potatorum). *Interciencia: Revista de ciencia y tecnología de América*, 45(5), 223-228. Recuperado de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7506309>
- Horngren, C.T., Datar, S.M, & Rajan, M.V. (2012). Contabilidad de costos: un enfoque gerencial. *Pearson Educación eBooks*. Recuperado de <http://190.57.147.202:90/jspui/handle/123456789/989>
- Huezcas-Garrido, L., Alanís-García, E., Ariza-García, J.A., & Zafra-Rojas, Q.Y. (2022). Subproductos de interés nutricional y funcional de *Agave salmiana*. *Rev. Chil Nutr* 2022: 49 (2), 250-262.
- Iglesias-Mancera, E. (2020). La tradición mezcalera en la sierra del Tigre: La comunidad de Puerta de Agujas. *Destilados Campesinos de México*. Recuperado de <http://www.destiladoscampesinos.com/2020/09/18/la-tradicion-mezcalera-en-la-sierra-del-tigre-la-comunidad-de-puerta-de-agujas/>.
- IIEG (Instituto de Información Estadística y Geográfica del Estado de Jalisco). (2021). *Raicilla, la bebida más artesanal de México*. Recuperado de <http://www.iieg.gob.mx>

- Illsley-Granich, C., Tlacotempa, A., Rivera, G., Morales, P., García, J., Casarrubias, L., Calzada, M., Calzada, R., Carraca, C., Flores, J., Omar, E. (2005). *Maguey papalote: para todo mal, mezcal; para todo bien, también. La riqueza de los bosques mexicanos: más allá de la madera*. Recuperado de: https://www.cifor.org/publications/pdf_files/Books/BLopez0501S0.pdf
- Illsley-Granich, C. (2009). Claves para saborear los sabores del mezcal. *Artes de México: Mezcal Arte tradicional* (98), 16-31.
- IMPI (Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial). (2019). *El IMPI protege a la "Raicilla" como Denominación de Origen*. Recuperado de <https://www.gob.mx/impi/articulos/el-impi-protege-a-la-raicilla-como-denominacion-de-origen-207030?idiom=es>
- Isidro-Morales, G., Martínez-Gutiérrez, A., Cortés-Martínez, C.I., Aquino-Bolaños, T., Escamirosa-Tinoco, C., & Hernández-Tolentino, M. (2017). Crecimiento de *Agave potatorum* cultivado en ambientes contrastantes y fertirrigación. *Revista Mexicana de Agroecosistemas*, 4(2), ISSN:2007-9559.
- ISTA (International Seed Testing Association). (2015). *International Rules for Seed Testing*. International Seed Testing Association. Zurich, Switzerland, 296.
- Jara, F. (2020). Clonación y micropropagación de plantas de interés económico con características sobresalientes con clave UNAM 2019/16-2662.
- Jara, F. (2020). Evaluación de diferentes componentes orgánicos en la regeneración vía organogénesis del agave mezcalero *Agave potatorum*. Reporte de estancia estudiantil. Facultad de Química. UNAM.
- Jiménez, V. (2005). Review: Involvement of plant hormones and plant growth regulators on *in vitro* somatic embryogenesis. *Plant Growth Regulation* (47), 91-110 <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-31312001000200008>
- Juárez, C., García González, A. S., & López, M. G. (2020, 2 junio). Jarabe de agave, alternativa natural. Recuperado 7 de marzo de 2022, de <https://thefoodtech.com/ingredientes-y-aditivos-alimentarios/jarabe-de-agave-alternativa-natural/>
- Jurado-Guerra, P., Melgoza-Castillo, A., Morales-Nieto, C.R., Royo-Márquez, M., y Ortega-Ochoa, C. (2009). Propagación de algunas plantas nativas de los agostaderos de Chihuahua. *Folleto Técnico* (23), 30.
- Justo, M. B., Oropeza, L. G., Hernández, R., & Negrete, L. A. P. (2001). Azúcares en agaves (*Agave tequilana* Weber) cultivados en el Estado de Guanajuato. *Acta Universitaria*, 11(1), 33-38. <https://doi.org/10.15174/au.2001.325>

- Keb-Llanes, M. A., González, G., Chí-Manzanero, B., & Infante, D. (2002). A rapid and simple method for small-scale DNA extraction in Agavaceae and other tropical plants. *Plant Molecular Biology Reporter*, 20(3), 299. <https://doi.org/10.1007/bf02782465>
- Kropp, H., Halasey, A. (2018, February 05). Plantas CAM, (Javier Benítez, Trans.) [Imagen]. ASU - Ask A Biologist. Recuperado May 15, 2022 de <https://askabiologist.asu.edu/plantas-c-a-m>
- Kulus, D. (2014). Micropropagation of selected Agave species. *Interdisciplinary Journal* (1), 75-84.
- Kunakhonnuruk, B., Inthima, P. Y Kongbangkerd, A. (2019). *In vitro* propagation of Rheophytic Orchid, *Epipactis Flava Seidenf.* A comparison of semi-solid, Continuous Immersion and Temporary Immersion Systems. *Biology*. 8(4), 2-8.
- Kuniyal, C.P., Purohit, V., Butola, J.S, & Sundriyal, R.C. (2013). Seed size correlates seedling emergence in *Terminalia bellerica*. *South African Journal of Botany* (87), 92-94.
- Langlé-Argüello, L.A., Gutiérrez-Hernández, G.F., Martínez-Gutiérrez, G.A. (2017). Efecto del tiempo de almacenamiento y procedencia de semillas de *Agave potatorum* Zucc. En la germinación y viabilidad. *Revista Mexicana de Agroecosistemas*, 7(2), p. 49.
- Lazarotto, M., Piveta, G., Muniz, M.F.B. and Reiniger, L.R.S. (2011) Adequacao do teste de tetrazolio para avaliacao da qualidade de sementes de *Ceiba speciosa*. *Semina: Ciências Agrárias*, 32, 1243-1250. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2011v32n4p1243>
- Lesar, H., Hlebec, B., Ceranic, N., Kastelec, D., & Luthar, L. (2012). Acclimatization of terrestrial orchid *Bletilla striata* Rchb. f. (Orchidaceae) propagated under *in vitro* conditions. *Acta agriculturae Slovenica* (99), 69-75.
- León, C.L. (2014). *Forma de reproducción asexual del agave, formación de hijuelos (Maguey y sus partes)* [Imagen]. Revista de Geografía Agrícola. <https://www.redalyc.org/pdf/757/75749287005.pdf>
- Loberant, B., & Altman, A. (2010). Micropropagation of plants. In: *Flickinger, M. Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology*, 1-17.
- López, L., Merino, Y., Enríquez, J., Rodríguez, G. y Lagunas, Z. (2018). Organogénesis *in vitro* en tejidos de tallo de *Agave marmorata* y *Agave angustifolia*. *Revista Mexicana de Agroecosistemas*, 5(2), 98-105.

- López-Cruz, J.Y., Martínez-Gutiérrez, G.A., & Caballero-García, A. (2016). *Diagnóstico de la situación del agave-mezcal y opciones de desarrollo local en las comunidades indígenas de Oaxaca*. Instituto Politécnico Nacional-CIIDR, Unidad Oaxaca. Recuperado de <http://ru.iiec.unam.mx/3385/1/240-Lopez-Martinez-Caballero.pdf>
- Lynch, P. T. (1999). Tissue culture techniques in in vitro plant conservation. En *CRC Press eBooks* (pp. 67-88). <https://doi.org/10.1201/9781482273038-11>
- Mandujano-Bueno, A., Pons-Hernández, J.L., Paredes Melesio, R., & García-Meza, P. (2018). Diversidad genética de maguey (*Agave* spp.) en las sierras y llanuras del norte de Guanajuato. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 9(3), 513.
- Machakova, I., Zazimalova, E., y George, E. (2008). Plant growth regulators I: Introduction; Auxins, their analogues and inhibitors. In: George, E., Hall, M. & De Klerk, G. Plant propagation by tissue culture. The background. *Springer* (pp. 175-204). https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5005-3_5
- Magos López, N. A. (2016). *Las plantas del futuro (Fotosíntesis CAM)*. Universidad Veracruzana. Recuperado 18 de marzo de 2023, de <https://www.uv.mx/cienciauv/blog/plantasdelfuturofotosintesisacam/>
- Magnitskiy, S.V., y Plaza, G.A. (2007). Fisiología de semillas recalcitrantes de árboles tropicales. *Agronomía Colombiana*, 25 (1), 96-103.
- Martínez, S., Beltrán, M., Valdéz, C., Arias, R., Troyo, E., Murillo, A., Galindo, J., & Ortega- Rubio, A. (2007). Assessment of sustainability performance on the utilization of Agave (*Agave salmiana ssp crassispina*) in Zacatecas, México. *The international Journal of Sustainable Development and World Ecology*, 14(4), 362-371.
- Martínez Estévez, M. (2021). Conservación in vitro de germoplasma, un método para salvar el acervo genético en plantas. *Desde el Herbario CICY*, 13, 83-86. Recuperado de http://www.cicy.mx/sitios/desde_herbario/
- Martínez-Palacios, A., M., Ortega-Larroccea., y Chavez, V.M. (2003). Somatic embryogenesis and organogenesis of *Agave victoriae-reginae*: considerations for its conservation, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, (74). 135-142.
- Martínez-Ramírez, S., Trinidad, A., Bautista, G., y Pedro, E.C. (2013). Crecimiento de plántulas dos especies de mezcal en función del tipo de suelo y nivel de fertilización. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 34(6), 387-393.
- Martínez-Tenorio, S. (Consultores: Dra. Teresita Cisneros Méndez, Ing. Víctor Vicente Lara Echegaray, Adevid Linares Martínez). (2013). *Diagnóstico Sistema Producto maguey-mezcal del estado de Oaxaca*. Universidad Autónoma Chapingo (UACH).

- McCown, B.H. and Lloyd, G. (1981). Woody Plant Medium (WPM)—A Mineral Nutrient Formulation for Microculture of Woody Plant Species. *HortScience* (16), 453-453.
- Mellado-Mojica, E. y M. G. López. (2012). Fructan metabolism in A. tequilana Weber blue variety along its developmental cycle in the field. *J. Agric. Food Chem.* 60: 11704-11713.
- Molina-Guerrero, J. A., Botello-Álvarez, J. E., Estrada-Baltazar, A., Navarrete-Bolaños, J., Jiménez-Islas, H., Cárdenas-Manríquez, M., & Rico-Martínez, R. (2007). Compuestos volátiles en el mezcal. *Revista Mexicana De Ingenieria Quimica*, 6(1), 41-50. Recuperado de <https://www.redalyc.org/pdf/620/62060106.pdf>
- Monja-Mio, K. M., Pool, F. B., Herrera, G. H., Esqueda-Valle, M., & Robert, M. L. (2015). Development of the stomatal complex and leaf surface of Agave angustifolia haw. 'Bacanora' plantlets during the *in vitro* to *ex vitro* transition process. *Scientia Horticulturae*, 189, 32-40. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.03.032>
- Montero-Villanueva, M., Montero-Orozco, J., & Figueroa-López, A. (2017). Agave Angustifolia. *Tecno-Agave: Revista de la cadena del agave y sus derivados* (50), 6-25. Recuperado de <https://www.agared.org/sites/default/files/informes2017/2.%20Tecnoagave%20Num.%2050-%20Noviembre-%20Diciembre%202017.pdf>.
- Neumann, K., Kumar, A. y Imani, J. (2009). Plant cell and tissue culture. A tool in biotechnology. Basics and application. *Springer*, 325.
- Nikam, D. T. (1997). High frequency shoot regeneration in *Agave sisalana*. *Plant Cell, and Organ Culture* (51), 225-228.
- Nobel, P. S., Quero, E., & Linares, H. (1988). Differential growth responses of agaves to nitrogen, phosphorus, potassium, and boron applications. *Journal of Plant Nutrition*, 11(12), 1683-1700. <https://doi.org/10.1080/01904168809363925>
- Nogales, L., & Centro de Estudios sobre el Maguey y Mezcal (CEMMEZ). (2020). Cuáles son los otros mezcales. Recuperado de <https://mezecologia.mx/los-otros-mezcales/>
- Nogales, L., & Centro de Estudios sobre el Maguey y Mezcal (CEMMEZ). (2020). Otros destilados del agave. Recuperado de <https://mezecologia.mx/los-otros-mezcales/>
- Norma Oficial Mexicana NOM-144-SCFI-2000, Bebidas alcohólicas-Charanda-especificaciones. Recuperado de <http://legismex.mty.itesm.mx/normas/scfi/scfi144.pdf>
- Norma Oficial Mexicana NOM-168-SFCI-2004, Bebidas alcohólicas-Bacanora-Especificaciones de elaboración, envasado y etiquetado. Recuperado de

https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4917328&fecha=14/12/2005#gsc.tab=0

- Norma Oficial Mexicana NOM-159-SCFI-2004, Bebidas alcohólicas-sotol-especificaciones y métodos de prueba. Recuperado de <http://www.ordenjuridico.gob.mx/Documentos/Federal/wo45110.pdf>
- Norma Oficial Mexicana NOM-251-SSA1-2009, Prácticas de higiene para el proceso de alimentos, bebidas o suplementos alimenticios. Recuperado de <https://www.dof.gob.mx/normasOficiales/3980/salud/salud.htm>
- Norma Oficial Mexicana NOM-070-SCFI-2016, Bebidas alcohólicas-Mezcal-Especificaciones. Recuperado de <https://www.dof.gob.mx/normasOficiales/3980/salud/salud.htm>
- Orellano, J., Dellagiovanna, A., Imanishi, L., & Faedo, N.E. (2016). Sistema de Inmersión Temporal: Automatización de Propagación *in vitro* de Plantas Utilizando Herramientas Libres.
- Oronoz, M. (1983). Tratado elemental de Botánica. *Científico Latino Americana*. Larios, 663-644.
- Ortiz-Hernández, Y.D. (2020). *Germinación de semillas de A. potatorum* [Imagen]. Comunicaciones Reports. https://www.interciencia.net/wp-content/uploads/2020/06/02_6712_Com_Ortiz_v45n5_6.pdf
- Osuna-Fernández, H.R., Osuna-Fernández, A. M., & Fierro-Álvarez, A. (2017). *Manual de propagación de plantas superiores*. Primera edición digital. Universidad Nacional Autónoma de México, Universidad Autónoma Metropolitana, 4.
- Palma, F., Pérez, P., y Meza, V. (2016). *Diagnóstico de la Cadena de Valor Mezcal en las Regiones de Oaxaca*. COPLADE-Gobierno del Estado de Oaxaca. Recuperado de <https://www.oaxaca.gob.mx/coplade/wp-content/uploads/sites/29/2017/04/Perfiles/AnexosPerfiles/6.%20CV%20MEZCAL.pdf>
- Palma, F., Pérez, P., y Meza, V. (2016). *Mapa de actores clave del sistema producto maguey-mezcal (artesanal/industrial)* [Imagen]. Gobierno de Oaxaca. <https://www.oaxaca.gob.mx/coplade/wp-content/uploads/sites/29/2017/04/Perfiles/AnexosPerfiles/6.%20CV%20MEZCAL.pdf>
- Pardo-Núñez, J. (2019). Las mujeres en la producción de mezcal. CIATEJ (Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C). Recuperado de <https://ciatej.mx/el-ciatej/comunicacion/Noticias/Las-mujeres-en-la-produccion-de-mezcal-/129>

- Paredes-López, O. (2002). Tequila, ciencia y tradición. *La jornada*. Recuperado de <https://www.jornada.com.mx/2002/07/01/cien-paredes.html>
- Peña, C. (2019). *Tuxca: el mezcal de la tierra de fuego*. Recuperado de <https://www.colimanoticias.com/tuxca-el-mezcal-de-la-tierra-de-fuego/>
- Peña-Valdivia, C. B., Sánchez-Urdaneta, A. B., Trejo, C., & Cárdenas, E. (2006). Temperature and mechanical scarification on seed germination of «Maguey» (*Agave Salmiana* Otto ex Salm-Dyck). *Seed Science and Technology*, 34(1), 47-56. <https://doi.org/10.15258/sst.2006.34.1.06>
- Pérez de León, A., Caamal Velázquez, J.H., Alamilla Magaña, J.C., Criollo Chan, M.A., Chanatasig-Vaca, C.I., & Garruña-Hernández, R. (2020). Alternativas innovadoras en la micropropagación de agaves mezcaleros. *Temas de Ciencia y Tecnología*. 24 (71), 41-48.
- Pérez-García, E., & Meave, J., Gallardo, C. (2001). Vegetación y flora de la región de Nizanda, Itsmo de Tehuantepec, Oaxaca, México. *Acta Botánica Mexicana* (56), 19-88.
- Pérez-Hernández, E., Chávez-Parga, M.D.C., & González-Hernández, J.C. (2016). Revisión del agave y el mezcal. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 18(1), 148-164. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v18n1.49552>
- Pérez-Molphe Balch, E., Esparza-Araiza, M.J., & Pérez-Reyes, M. (2012). Conservación *in vitro* de germoplasma de *agave spp.* bajo condiciones de crecimiento retardado. *Revista fitotecnica mexicana*, 35(4), 79-287.
- Pérez-Negrón, E., & Casas, A. (2007). Use, extraction rates and spatial availability of plant resources in the Tehuacán-Cuicatlán Valley, Mexico: The case of Santiago Quioitepec, Oaxaca. *Journal of Arid Environments*, 70(2), 356-379. <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2006.12.016>
- Phillips, G., y Garda, M. (2019). Plant tissue culture media and practices: an overview. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 53(3), 242-257.
- Pinterest. (2021). Denomination of origins map [imagen]. Recuperado 11 de enero 2021, de <https://www.pinterest.es/pin/denomination-of-origins-map--64035625926593642/>
- Pineda, S., & Marcela, M. (2017). Costos estándares para la producción in vitro de plántulas de camote y yuca en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Escuela Agrícola Panamericana. *Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano*. Recuperado de <https://bdigital.zamorano.edu/handle/11036/6158>
- Portillo, L., Santacruz-Ruvalcaba, F., Gutiérrez-Mora, A., & Rodríguez-Garay, B. (2007). Somatic embryogenesis in agave tequilana Weber cultivar azul. *In Vitro Cellular &*

Developmental Biology – Plant, 43(6), 569-575. <https://doi.org/10.1007/s11627-007-9046-5>

- Powers, D. E., & Backhaus, R. A. (1989). In vitro propagation of agave arizonica Gentry & Weber. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 16(1), 57-60. <https://doi.org/10.1007/bf00044072>
- Pramita, A., Kristanti, A. N., Sugiharto, S., Utami, E. S. W., & Manuhara, Y. S. W. (2018). Production of biomass and flavonoid of *Gynura procumbens* (Lour.) Merr shoots culture in temporary immersion system. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 16(2), 639-643. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2018.05.007>
- PROY-NOM-257-SE-2021, Bebidas alcohólicas-Raicilla-Denominación, especificaciones, información comercial y métodos de prueba. https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5650295&fecha=27/04/2022#gsc.tab=0
- Pukacka, S., & Ratajczak, E. (2006). Antioxidative response of ascorbate–glutathione pathway enzymes and metabolites to desiccation of recalcitrant acer saccharinum seeds. *Journal of Plant Physiology*, 163(12), 1259-1266. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2005.10.003>
- Ramales-Orsorio, M., & Barragán-Ramírez, M. (2002). La industria del mezcal y la economía oaxaqueña. *Observatorio de la Economía Latinoamericana*. ISSN: 1696-8352. Recuperado de <https://www.eumed.net/cursecon/ecolat/mx/>
- Ramírez-Malagón, R., Aguilar-Ramírez, I., Borodanenko, A., Pérez-Moreno, L., Barrera-Guerra, J. L., Núñez-Palenius, H. G., & Ochoa-Alejo, N. (2007). In vitro propagation of ten threatened species of mammillaria (Cactaceae). *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 43(6), 660-665. <https://doi.org/10.1007/s11627-007-9076-z>
- Ramírez-Tobías, H.M., Peña-Valdivia, C. B., Reyes-Agüero, J.A., Sánchez- Urdaneta, A.B., & Valle-Guadarrama, S. (2012). Seed germination temperatures of eight Mexican Agave species with economic importance. *Plant Species Biology*, 27(2), 124-137.
- Ramírez-Villalobos, M. (2007). *Establecimiento in vitro de explantes de maguey mezcalero (Agave angustifolia Haw)* [Tesis de ingeniería biotecnológica, Instituto Tecnológico de Sonora México]. Repositorio de tesis del Instituto Tecnológico de Sonora México.
- Read, P. E., & Preece, J. E. (2014). Cloning: plants – Micropropagation/Tissue culture. En *Elsevier eBooks* (pp. 317-336). <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-52512-3.00224-2>

- Robert, M. L., Herrera, J. L., Contreras, F., & Scorer, K. N. (1987). In vitro propagation of agave fourcroydes lem. (Henequen). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 8(1), 37-48. <https://doi.org/10.1007/bf00040731>
- Robert, M., Herrera-Herrera, J., Herrera-Herrera, G., Herrera-Alamillo, M., & Fuentes-Carrillo, P. (2006). A New Temporary Immersion Bioreactor System for Micropropagation. *Methods in Molecular Biology Plant Cell Culture Protocols* (319).
- Robert, M., Herrera, J., Castillo, E., Ojeda, G., & Herrera, M. (2006). An efficient method for the micropropagation of Agave species. *Plant Cell Culture Protocols. Humana Press*, 165-178.
- Robert, M.L.J.L., & Arce-Montoya, M. (2007). La biotecnología aplicada al mejoramiento genético de los agaves. In Colunga-García Marín, P., Larqué-Saavedra, A., Eguiarte, L., & Zizumbo-Villareal, D. (Eds.). *En lo ancestral hay futuro: del tequila, los mezcales y otros agaves*, Instituto Nacional de Ecología.
- Rodríguez-Garay, B., Gutiérrez-Mora, A., & Acosta-Dueñas, B. (1996). Somatic embryogenesis of agave Victoria-reginae moore. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 46(1), 85-87. <https://doi.org/10.1007/bf00039700>
- Rosales-Mata, S., Sigala-Rodríguez, J. A., & Bustamante-García, V. (2013). Producción y trasplante de planta de Agave en vivero. *Inifap (Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias)*, 70(Primera edición), https://www.researchgate.net/publication/273727453_Produccion_y_trasplante_de_planta_de_Agave_en_vivero/link/5509c62c0cf20f127f90a9d3/download?_tp=eyJjb250ZXh0Ijp7ImZpcnN0UGFnZSI6InB1YmxpY2F0aW9uIiwicGFnZSI6InB1YmxpY2F0aW9uIn19.
- Rubluo, A., Chávez, V. M., Martínez, A., & Martínez-Vázquez, O. (1993). Strategies for the recovery of endangered orchids and cacti through in-vitro culture. *Biological Conservation*, 63(2), 163-169. [https://doi.org/10.1016/0006-3207\(93\)90505-u](https://doi.org/10.1016/0006-3207(93)90505-u)
- Ruscitti, M., Beltrano, J., & Giménez, D. (2011). Catedra de fisiología vegetal, curso de fisiología vegetal. Departamento de Ciencias Biológicas Facultad de Ciencias Agrarias y forestales. Universidad Nacional de la Planta. Recuperado de https://aulavirtual.agro.unlp.edu.ar/pluginfile.php/76847/mod_resource/content/1/in%20vitro.pdf
- SADER (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural). (2015). Sotol, bebida célebre del desierto. Recuperado de <https://www.gob.mx/agricultura/es/articulos/sotol-bebida-celebre-del-desierto-orgullodemexico>

- SADER (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural). (2015). El comiteco. Recuperado de <https://www.gob.mx/agricultura/es/articulos/el-comiteco-orgullodemexico>
- SADER (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural). (2015). Raicilla, prima del mezcal y del tequila. Recuperado de <https://www.gob.mx/agricultura/es/articulos/raicilla-prima-del-mezcal-y-del-tequila>
- SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación). (2017). *Planeación Agrícola Nacional 2017-2030: Potencial Agave Tequilero y Mezcalero*, 1-16.
- Sánchez, L.A. (2005). *Oaxaca, Tierra de Maguey y Mezcal 2ª*. Instituto Tecnológico de Oaxaca, Oaxaca México. p. 235. Recuperado de <https://www.cyd.conacyt.gob.mx/?p=articulo&id=286>
- Sánchez-Mendoza, S., Bautista-Cruz, M.A., Córdova-Campos, O., Crisanto-Martínez, M., & Alavés-Jarquín, F. (2017). Tamaño de semilla y tratamientos pregerminativos en el crecimiento de agaves silvestres. *Revista Mexicana de Agroecosistemas*, 4(7), 8-10.
- Sánchez-Mendoza, S., Bautista-Cruz, M.A., & Córdova-Campos, O. (2017). Sustratos y tratamientos pregerminativos en el crecimiento inicial de agaves silvestres. *Revista Mexicana de Agroecosistemas*, 4(7), 28-29.
- Santacruz-Ruvalcaba, F., Gutiérrez-Pulido, H., Rodríguez-Garay, B. (1999). Efficient in vitro propagation of *Agave parrasana* Berger. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* (56), 163-167.
- Santacruz-Ruvalcaba, F., Castañeda-Nava, J. J., Villanueva-González, J. P., García-Sahagún, M. L., Portillo, L., & Contreras-Pacheco, M. L. (2022). Micropropagación de agave Maximiliana Baker por proliferación de yemas axilares. *Polibotánica*, 54, 139-151. <https://doi.org/10.18387/polibotanica.54.9>
- Sarasan, V., Cripps, R., Ramsay, M. M., Atherton, C., McMichen, M., Prendergast, G., & Rowntree, J. K. (2006). Conservation in vitro of threatened plants—Progress in the past decade. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 42(3), 206-214. <https://doi.org/10.1079/ivp2006769>
- Scheinvar, G.E. (2008). *Genética de poblaciones silvestres y cultivadas de dos especies mezcaleras: Agave cupreata y Agave potatorum* [Tesis de maestría, Universidad Nacional Autónoma de México]. Repertorio de tesis del Instituto de Ecología de la UNAM.
- Secretaría de Economía. (2020, 2 febrero). México y la Unión Europea acuerdan proteger nuevas denominaciones de bebidas espirituosas. Recuperado 11 de agosto de

- 2022, de <https://www.gob.mx/se/articulos/mexico-y-la-union-europea-acuerdan-protger-nuevas-denominaciones-de-bebidas-espirituosas-233897?idiom=es>
- SEMARNAT (Secretaría de Medio Ambiente Y Recursos Naturales). (2010). Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna sivistres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio. Lista de especies en riesgo. México. Recuperado de https://www.profepa.gob.mx/innovaportal/file/435/1/NOM_059_SEMARNAT_2010.pdf
 - Segretin, M.E. (2006). Cultivos celulares y sus aplicaciones II (cultivos de células vegetales) *Argen Bio.* Recuperado de: https://www.argenbio.org/images/La_biotechnologia/Cap_2/Cultivos celulares II.pdf
 - Sharry S., Adema, M., & Abedini, W. (2015). Plantas de probeta, Manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos *in vitro*. Editorial de la Universidad de la Planta. pp. 7
 - SIAP (Servicio de Información, Agroalimentaria y Pesquera). (2017). Recuperado de <https://www.gob.mx/snics/acciones-y-programas/agave-agave-spp>
 - SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). (2018). El quiote y sus flores, las delicias del maguey. Recuperado de <https://www.gob.mx/siap/articulos/el-quite-y-sus-flores-las-delicias-del-maguey?idiom=es>
 - SIAVI (Sistema de Información Arancelaria Vía Internet). (2017). Recuperado de: <http://www.economia-snci.gob.mx>
 - Silos-Espino, H., et al., (2007). Chemical composition and *in vitro* propagation of *Agave salmiana* 'Gentry'. The Journal of Horticultural Science and Biotechnology. 82, pp. 355-359.
 - SNICS (Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas). (2018). *Prueba de viabilidad de semillas* [Imagen]. Gobierno de México. <https://www.gob.mx/snics/articulos/como-saber-que-tan-viable-es-una-semilla?idiom=es#:~:text=El%20Laboratorio%20Central%20de%20Referencia,la%20viabilidad%20de%20la%20semilla.>
 - SNICS (Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas). (2017). Agave (Agave spp.) Generalidades de la Red Agaváceas. Recuperado de <https://www.gob.mx/snics/acciones-y-programas/agave-agave-spp>
 - SNICS (Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas). (2018). ¿Cómo saber que tan viable es una semilla? Recuperado de: <https://www.gob.mx/snics/articulos/como-saber-que-tan-viable-es-una->

[semilla?idiom=es#:~:text=El%20Laboratorio%20Central%20de%20Referencia,la%20viabilidad%20de%20la%20semilla](#)

- Smith, R. (2013). Plant tissue culture. Techniques and Experiments. *Academic Press. Elsevier*. 188 pp.
- Somos 125. Quitupan (2018). Recuperado de <https://www.facebook.com/profile/100064915711302/search?q=Quitupan>
- Tobías, H. M. R., Vázquez, R. N., Aguirre-Rivera, J. R., Flores, J., De-Nova, J. A., & Gálvez, R. J. (2015). Seed viability and effect of temperature on germination of *Agave angustifolia* subsp. *tequilana* and *A. mapisaga*; two useful agave species. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 63(5), 881-888. <https://doi.org/10.1007/s10722-015-0291-x>
- Torres, I., Casas, A., Delgado, L.A., & Rangel-Landa, S. (2013) Aprovechamiento, demografía y establecimiento de *Agave potatorum* en el Valle de Tehuacán, México: *Aportes ecológicos y etnobiológicos para su manejo sustentable*. *Zonas Áridas* (15), 92-109.
- Torres, I., Blancas, J., León, A., Casas, A. (2015). TEK, local perceptions of risk, and diversity of management practices of *Agave inaequidens* in Michoacán, Mexico. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 11(1), 1.
- Torres-Morán, M., Morales-Rivera, M.M., De la cruz-Larios, L., & Villalobos-Arámbula, A.R. (2006). Identificación de polimorfismo entre hijuelos y plantas micropropagadas de *Agave tequilana* y *Agave cocui* usando ISTRs. *Scientia-CUCBA* 8(2), 205-206.
- Trippi, V. S. (2007). El envejecimiento de los clones. *Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria (ANAV)*, 93–111. Recuperado de http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/27742/Documento_completo.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Universidad Virtual de América (UNÍVIA). (2017). Diferencia entre Costos y Gastos. Recuperado de <https://univia.info/diferencia-entre-costos-y-gastos/>
- Uribe-Marín, R. (2011). Costos para la toma de decisiones, *McGraw-Hill Interamericana*, 296, ISBN: 9789584104212
- Vadillo, G., Suni, M., & Cano, A. (2004). Viabilidad y germinación de semillas de puya *Raimondii* harms (Bromeliaceae). *Revista Peruana de Biología*, 11(1), 71-78. <https://doi.org/10.15381/rpb.v11i1.2435>
- Valenzuela-Sánchez, K. K., Juárez-Hernández, R. E., Cruz-Hernández, A., Olalde-Portugal, V., Valverde, M. E., & Paredes-López, O. (2006). Plant regeneration of agave

- tequilana by indirect organogenesis. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 42(4), 336-340. <https://doi.org/10.1079/ivp2006788>
- Valenzuela-Zapata, A. G., & Nabhan, G. P. (2003). Tequila: A natural and cultural history. *Choice Reviews Online*, 42(01), 42-0300. <https://doi.org/10.5860/choice.42-0300>
 - Vázquez-Díaz, E., García-Nava, J.R., Peña-Valdivia, C.B., Ramírez-Tobías, H.M., & Morales-Ramos, V. (2011). Tamaño de la semilla, emergencia y desarrollo de la plántula de maguey (*Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck). *Rev. Fitotecnica Mex*, 34 (3), 167-173.
 - Vázquez, G. (2006). *Aprovechamiento integral del maguey pulquero (Agave salmiana) en Santa María Tlahuitoltepec Mixe Oaxaca* [Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma Chapingo] Repositorio de tesis de la Universidad Autónoma Chapingo.
 - Vásquez, M. (2021). El “mezcal” secreto de Jalisco y colima. (2021). Recuperado de <https://agavache.com/el-mezcal-secreto-de-jalisco-y-colima/>
 - Vázquez-García, J.A., Cházaro-Basañez, M.J., Hernández-Vera, G., Vargas-Rodríguez, Y.L., Zamora-Tavares, M.P. (2007). Taxonomía del género *Agave* (*Agavaceae*) en el occidente de México: una panorámica preliminar. *Agaves del Occidente de México*. Universidad de Guadalajara, 145-191.
 - Vera-Guzmán, A.M., García, P., & López, M.G. (2009). COMPUESTOS VOLÁTILES AROMÁTICOS GENERADOS DURANTE LA ELABORACIÓN DE MEZCAL DE *Agave angustifolia* y *Agave potatorum*. *Revista Fitotecnica Mexicana*, 32(4), 273-279. <https://doi.org/10.35196/rfm.2009.4.273-279>
 - Vicente-Ramírez, I., & Del Real-Laborde, J. I. (2007). Métodos de propagación del *Agave tequilana* Weber var. Azul. Conocimiento y prácticas agronómicas para la producción de *Agave tequilana* Weber en la zona de denominación de origen del tequila. *Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias*, 57-67.
 - Von Arnold, S., Sabala, I., Bozhjov, P., Dyachok, J., y Filonova, L. (2002). Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 69, 223-249.
 - Wesche, E. P. (2000). Química de Alimentos de Origen Vegetal. Universidad de las Américas -Puebla. Recuperado de: <http://webserver.pue.udlap.mx/~pwesche/3.4.html>
 - Woodward, A. W., & Bartel, B. (2005). AuxIn: Regulation, action, and interaction. *Annals of Botany*, 95(5), 707-735. <https://doi.org/10.1093/aob/mci083>
 - Zizumbo-Villarreal, D., Colunga-García Marín, P., Vargas-Ponce, O., Rosales-Adame, J. J., & Nieto-Olivares, R. C. (2009). Tecnología agrícola tradicional en la producción de vino mezcal (mezcal y tequila) en el sur de Jalisco, México. *Revista de Geografía*

Agrícola, (42),65-82. ISSN: 0186-4394. Recuperado de
<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=75712192006>