



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**Propagación *in vitro* de *Agave kavandivi*
(Asparagaceae)**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGA

P R E S E N T A

GABRIELA MARTÍNEZ MARTÍNEZ



DIRECTOR DE TESIS

M. en C. LAURA PATRICIA OLGUÍN SANTOS

Ciudad Universitaria, Cd. Mx. 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

HOJA DE DATOS

1. Datos del alumno

Gabriela Martínez Martínez.
gabymtz@ciencias.unam.mx
Universidad Nacional Autónoma de México.
Facultad de Ciencias.
Biología.
312156099.

2. Datos del tutor

M. en C. Laura Patricia Olguín Santos.
Invernadero de la Facultad de Ciencias.
Universidad Nacional Autónoma de México.

3. Datos del sinodal 1

Dra. Margarita Collazo Ortega.
Laboratorio de Desarrollo en Plantas de la Facultad de Ciencias.
Universidad Nacional Autónoma de México.

4. Datos del sinodal 2

Dr. Abisaí Josué García Mendoza.
Jardín Botánico del Instituto de Biología.
Universidad Nacional Autónoma de México.

5. Datos del sinodal 3

Ing. Hipólito César Chávez Rendón.
Jardín Etnobotánico de Oaxaca.
Gobierno del Estado de Oaxaca.

6. Datos del sinodal 4

M. en C. Alma Yadira Martínez Rendón.
Laboratorio Regional de Biodiversidad y Cultivo de Tejidos Vegetales.
Instituto de Biología, sede Tlaxcala.
Universidad Nacional Autónoma de México.

7. Datos del trabajo escrito

Propagación *in vitro* de *Agave kavandivi* (Asparagaceae)
138 pp.
2021.

Este trabajo se realizó en el Invernadero de la Facultad de Ciencias de la UNAM dentro de las actividades del taller “Biología de Reproducción, Propagación y Fisiología de Angiospermas que viven en ambientes contrastantes” bajo la dirección de la M. en C. Laura Patricia Olgún Santos.

DEDICATORIA

A mis padres y hermana

AGRADECIMIENTOS

Institucionales

A la UNAM, máxima casa de estudios de México e Iberoamérica, por abrirme las puertas del conocimiento científico y cultural durante el estudio de mi Licenciatura.

A la Facultad de Ciencias, por permitirme el uso de sus instalaciones y a todos sus profesores por las oportunidades brindadas durante mi formación.

A los profesores del Taller “Biología de la Reproducción, Propagación y Fisiología de Angiospermas que viven en ambientes contrastantes” dirigido por la Dra. Guadalupe Judith Márquez y conformado por la Dra. Margarita Collazo Ortega, el Dr. Javier Andrés Juárez Díaz, la Dra. Sonia Vázquez Santana y la M. en C. Laura Patricia Olgún Santos, por brindarme sus conocimientos y haberme guiado durante los cuatro niveles del taller para la realización de este proyecto.

A la M. en C. Laura Patricia Olgún Santos, Técnico Académico del Invernadero de la Facultad de Ciencias por el inigualable esfuerzo como directora de tesis y por brindarme su conocimiento en el área de cultivo de tejidos vegetales, así como permitirme el acceso a las instalaciones y equipo del Invernadero.

Al Dr. Abisaí Josué García Mendoza, Técnico Académico Titular y Curador de la Colección Nacional de Agaves del Jardín Botánico del Instituto de Biología de la UNAM, por la donación de semillas de *Agave kavandivi*, utilizadas para la realización de este trabajo, la revisión del manuscrito y valiosas sugerencias.

A la Dra. Margarita Collazo Ortega, Profesora Titular A, del Laboratorio de Desarrollo en Plantas de la Facultad de Ciencias UNAM, por la valiosa revisión del trabajo escrito durante los cuatro niveles del taller y la revisión de la tesis como sinodal.

Al Ing. Hipólito César Chávez Rendón, responsable de las Colecciones del Jardín Etnobotánico de Oaxaca, por su gran apoyo y dedicación como sinodal durante el proceso de revisión del escrito, que permitió enriquecer el trabajo.

A la M en C. Alma Yadira Martínez Rendón, Técnico Académico Titular A, T. C. del Laboratorio Regional de Biodiversidad y Cultivo de Tejidos Vegetales, Instituto de Biología, UNAM. Sede Tlaxcala, por su gran apoyo y dedicación como sinodal durante el proceso de revisión del escrito, que permitió enriquecer el trabajo.

Al Dr. Javier Andrés Juárez Díaz, Coordinador del Invernadero de la Facultad de Ciencias, por asesorarme durante los cuatro niveles del taller y permitirme el uso de las instalaciones del Invernadero.

A la Dra. Ana Laura López Escamilla, a la M en C. Alma Yadira Martínez Rendón, del Laboratorio Regional de Biodiversidad y Cultivo de Tejidos Vegetales, Instituto de Biología, UNAM. Sede Tlaxcala y al Biól. Morris Strauch Milstein por su revisión y sugerencias del resumen en inglés de este trabajo.

A la Dra. Ana Laura López Escamilla, Técnico Académico del “Laboratorio Regional de Biodiversidad y Cultivo de Tejidos Vegetales”, Instituto de Biología, UNAM. Sede Tlaxcala, por la revisión del manuscrito, sus valiosas sugerencias y los materiales proporcionados que me facilitaron la realización de los experimentos.

A la M. en B. María Eugenia Muñiz Díaz de León, Técnico Académico del Departamento de Biología Comparada, responsable del Taller Biología de plantas 1 y 2 del edificio Tlahuizcalpan de la Facultad de Ciencias, por permitirme el uso de las instalaciones, equipo e instrumental del Taller, así como por el uso del microscopio estereoscópico con cámara para la toma de las imágenes correspondientes a la prueba de viabilidad de las semillas.

A la M. en C. Argelia Díaz Rico, Técnico Académico del Departamento de Ecología y Recursos Naturales, por su apoyo técnico al mantener los cultivos dentro de las cámaras de ambiente controlado.

A la Biol. Karla Miriam Sandoval Lozano, por su apoyo en la enseñanza de las técnicas del cultivo *in vitro* de agaves, durante las primeras etapas de este proyecto.

Al proyecto PAPIME PE211817, a la Dra. Judith Márquez Guzmán responsable, y a los participantes en el Invernadero el Dr. Javier Andrés Juárez Díaz y la M. en C. Laura Patricia Olgún Santos, por los recursos que permitieron la infraestructura adecuada en el Invernadero de la Facultad de Ciencias para la realización de este trabajo.

Personales

A la Escuela Nacional de Lenguas, Lingüística y Traducción (ENALLT) y a todos sus profesores, por transmitirme sus conocimientos en los idiomas que me facilitaron el acceso a diferentes medios de comunicación y potencializaron mi aprendizaje, en especial al Dr. Agustín Pérez Fonseca por su revisión del resumen en inglés de este trabajo.

A mis padres Miguel Martínez Melgar y Celia Isabel Martínez Aguilar, por su apoyo incondicional durante toda mi trayectoria como estudiante y en la vida misma. Infinitas gracias porque con su apoyo logré terminar mi carrera profesional. Gracias por darme los obsequios más valiosos: mi familia y mi educación.

A mi hermana Diana Martínez Martínez, por ser mi compañera, por apoyarme en todo momento en la realización de este proyecto y por ayudarme a vencer las dificultades. Gracias porque vamos juntas en este camino de la Ciencia y por todo el cariño que me has dado siempre.

A mis abuelitos Eugenio Martínez Chipole, Juana Melgar García, Daniel Martínez García y Tomasa Aguilar Gil, por haberme impulsado en el estudio desde muy temprana edad y

estar siempre al pendiente de ello. Gracias por enseñarme que los sueños se cumplen y por ese cariño tan único que siempre han brindado a mi familia.

A todos mis profesores de educación básica por impulsarme a llegar muy lejos y depositar su confianza en mí. Gracias por los retos, las pruebas, los reconocimientos que sin duda sembraron en mí las ganas de seguir estudiando y por el conocimiento que me brindaron, ya que éste ha sido una herramienta fundamental durante mi trayectoria.

A mis profesores de la Escuela Nacional Preparatoria por todo el conocimiento en Ciencias y Humanidades que adquirí de ellos y que ha sido fundamental en mi formación como científica. En especial a la Biól. Rosalba Amaya Luna, por contagiarme su amor por la Biología y darme el ejemplo de su gran ética profesional.

Al M. en C. Noé Pacheco Coronel, profesor de *Biología de Animales I* y *El zoológico como centro de conservación*, por su gran pasión en la enseñanza de dichas asignaturas, en la educación ambiental, por su ejemplo de profesionalismo y ética que me han marcado para conducirme en la Biología y por permitirme explotar mi conocimiento de plantas en busca del trabajo multidisciplinario.

A mis profesores M. en C. Oscar Hinojosa Espinosa de Biología de Plantas I; Dr. Daniel Sánchez Carbajal de Biología de Plantas II; M. en C. Octavio González Caballero de Cultivo de Tejidos Vegetales; M. en C. Emiliano Mora Carrera de Ecología de la Polinización; Biól. Gabriel Olalde Parra y Dr. Héctor Javier Tapia Salcido de Cactología y Dra. Olivia Yáñez Ordóñez de Biogeografía, porque su conocimiento me abrió un nuevo panorama y me dejó una huella muy especial que me hizo pensar en nuevos horizontes y perspectivas.

Al Dr. Matias Baranzelli, Profesor de la asignatura Ecología Evolutiva de las Interacciones bióticas y mi instructor durante el Servicio Social, por su enseñanza en métodos estadísticos, por su ayuda con la lectura y recomendaciones de este manuscrito. y por encaminarme hacia la investigación, más allá de ser un excelente guía en el ámbito científico se convirtió en un gran amigo, me enseñó a creer en mi misma y a valorar mucho más mi trabajo.

Al Dr. Marco Tulio Solano de la Cruz del Instituto de Ecología, por su apoyo en mis proyectos y por sus consejos para el laboratorio. Gracias por su disposición sin esperar algo a cambio más que ver a los estudiantes superarse.

A los miembros del Laboratorio de Interacción Planta Animal del Instituto de Ecología, por abrirme la puerta hacia el mundo de la investigación, brindarme su confianza, su apoyo e integrarme en su equipo. En especial al Dr. Juan Enrique Fornoni Agnelli, al Dr. José Rubén Pérez Ishiwara y a la Dra. Guadalupe Andraca por su gran apoyo en la última etapa de mi Licenciatura.

A mi prima y M. en C. Yesica Rosalina Cruz Martínez por darme su ejemplo como científica, por sus consejos y su ayuda con la lectura y recomendaciones de este manuscrito. Gracias por estar presente en todas las etapas de mi vida.

A mis amigos y compañeros de laboratorio en el Invernadero de la Facultad de Ciencias Salvador Guillen Tinoco, Saraí Zamora Cortés, Germán Pérez Chávez y Karla Miriam Sandoval Lozano, por los días de trabajo juntos, por integrarme en el equipo y enseñarme lo indispensable para desarrollar un trabajo de tesis.

A la Dra. Ana Laura López Escamilla por guiarme durante la última etapa de mi Licenciatura, por sus consejos y sugerencias en la realización de este proyecto. Gracias por su acercamiento con los alumnos, su interés en la superación de cada uno y por convertirse en nuestra familia académica.

A la M. en C. Alma Yadira Martínez Rendón por todos sus consejos y sugerencias en la realización de este proyecto y durante el Congreso Mexicano de Botánica 2019. Gracias por la disposición y el interés de buscar lo mejor para los alumnos, ayudarnos a conducirnos en la Ciencia y por convertirse en nuestra familia académica.

A la M. en C. Laura Patricia Olguín Santos, mi asesora de Tesis, por guiarme durante la última etapa de mi Licenciatura, por integrarme en su equipo, brindarme su apoyo hasta el término de este proyecto y convertirse en una gran amiga. Gracias por buscar el bienestar de los estudiantes así como el cumplimiento de sus metas sin importar las eventualidades que se presenten en el camino.

INDICE

ABREVIATURAS.....	11
RESUMEN.....	12
INTRODUCCIÓN.....	14
ANTECEDENTES	16
Subfamilia Agavoideae.....	16
Género <i>Agave</i>	17
Taxonomía del género <i>Agave</i>	18
Usos de los agaves.....	19
Propagación de agaves.....	19
Problemas de conservación en agaves.....	20
<i>Agave kavandivi</i>	21
Cultivo de tejidos vegetales	24
Micropropagación	24
Medio de cultivo	27
Componentes adicionales del medio de cultivo.....	28
Respuestas morfogénicas	31
Limitantes del cultivo <i>in vitro</i>	34
Trabajos <i>in vitro</i> con especies del género <i>Agave</i>	39
JUSTIFICACIÓN.....	47
OBJETIVOS	47
MATERIALES Y MÉTODOS	48
Material biológico.....	48
Escarificación, desinfección y siembra de semillas	48
• Siembra 1: MS50%	49
• Siembra 2: MS50% + L-Arg	50
Elongación de plántulas	50
Obtención de explantes.....	51
Inducción de brotes	52
• Ensayo 1 (MS+BA/2,4-D, 4 tratamientos)	52
• Ensayo 2 (MS+BA/2,4-D, 7 tratamientos)	52
Elongación y enraizamiento de brotes.....	54

Aclimatización	54
Análisis estadístico.....	57
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	61
Escarificación, desinfección y germinación de semillas.....	61
• Siembra 1: MS50%	61
• Siembra 2: MS50% + L-Arg	61
Elongación de plántulas	69
Inducción de brotes.....	71
• Ensayo 1 (MS + BA/2,4-D, 4 tratamientos)	71
• Ensayo 2 (MS + BA/2,4-D, 8 tratamientos)	84
Elongación y enraizamiento de brotes.....	97
• Ensayo 1	97
• Ensayo 2	103
Aclimatización	108
CONCLUSIONES.....	120
PERSPECTIVAS	122
ANEXOS.....	123
LITERATURA CITADA.....	127

ABREVIATURAS

2,4-D	Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético
AIA	Ácido indol-3-acético
ANA	Ácido 1-naftalenacético
b/exp	Brotes generados por explante
BA	N ⁶ -Benciladenina
DDS	Días Después de la siembra
CA	Carbón activado
HML	Hoja más larga
IBA	Ácido indol-3-butírico
KIN	Kinetina
L-Arg	L-Arginina
MS	Medio Murashige y Skoog
MS+CA	MS adicionado de carbón activado 1.5 gL ⁻¹
MS50%	Medio MS a la mitad de su concentración de macronutrientes, micronutrientes y sacarosa.
OD	Organogénesis directa
OI	Organogénesis indirecta
RCV	Reguladores de Crecimiento Vegetal
Z	Zeatina

RESUMEN

Agave kavandivi es una especie microendémica de Oaxaca, con una población que ha disminuido y es susceptible al saqueo de ejemplares silvestres debido a su potencial ornamental. Estos factores pueden contribuir a su desaparición y frente a esto, el cultivo de tejidos vegetales es una alternativa para su propagación y conservación. El objetivo de este trabajo fue establecer el primer protocolo de propagación *in vitro* de la especie. Se utilizaron dos tipos de explantes obtenidos de plántulas germinadas *in vitro*: segmentos basales de hojas y tallos. Para la inducción de brotes se utilizó el medio Murashige y Skoog adicionado con Benciladenina (BA) y Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) en dos ensayos: (1) BA (0 y 1 mgL⁻¹) + 2,4-D (0, 0.1 y 0.5 mgL⁻¹) y (2) BA (0, 1, 2 y 3 mgL⁻¹) + 2,4-D (0 y 0.1 mgL⁻¹), este último precedido por el remojo de los explantes en una solución antioxidante. Los brotes surgieron de la base de los explantes: en los tallos, por organogénesis directa a partir de los 40 días de inducción; mientras que, en las hojas, a los 36 días por organogénesis directa e indirecta. El mejor tratamiento en los tallos fue con BA 3 mgL⁻¹ (17.6 brotes/explante) y en las hojas BA/2,4-D 1/0.1 mgL⁻¹ (21 brotes/explante), siendo estos los explantes más regenerativos. Los brotes se subcultivaron en medio Murashige y Skoog con carbón activado 1.5 gL⁻¹ para promover su elongación y enraizamiento. El mayor porcentaje de enraizamiento de brotes procedentes de hoja se obtuvo con 2,4-D 0.1 mgL⁻¹ (100%) y en los de tallo el 58% con BA 1 mgL⁻¹. La mezcla de sustrato peat moss+agrolita promovió la mayor sobrevivencia *ex vitro*, la altura, el ensanchamiento y surgimiento de nuevas hojas y el aspecto arrosetado de las plantas. En este trabajo se muestra el potencial regenerativo de los tallos y

segmentos basales de hojas. Fue posible determinar las condiciones óptimas para la propagación *in vitro* de *A. kavandivi*, contribuyendo así al conocimiento que puede aplicarse para la conservación de esta especie.

ABSTRACT

Agave kavandivi is a microendemic species from Oaxaca with a population that has decreased and is vulnerable to looting of wild specimens due to its ornamental potential. Owing to its population decrease, plant tissue culture is a useful tool for its propagation and conservation. The aim of this study was to establish the first protocol of micropropagation for this species. Two types of explants obtained from seedlings germinated *in vitro* were used: basal segments of leaves and stems. The explants were placed in Murashige and Skoog culture medium (MS) with cytokinin Benzyladenine (BA) and auxin 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) in two tests: (1) BA (0 y 1 mgL⁻¹) + 2,4-D (0, 0.1 y 0.5 mgL⁻¹) and (2) BA (0, 1, 2 y 3 mgL⁻¹) + 2,4-D (0 y 0.1 mgL⁻¹), the second one with antioxidants presoak. Shoots developed from the base of the explants: in the stems, by direct organogenesis after 40 days of induction; while, in the leaves after 36 days by direct and indirect organogenesis. The best treatment on stems was with BA 3 mgL⁻¹ (17.6 shoots/explant) and BA/2,4-D 1/0.1 mgL⁻¹ (21 shoots/explant) on leaves, which were the most regenerative explants. Shoots were subcultured in MS added with activated charcoal to promote its elongation and rooting. The highest percentage of rooted shoots was obtained from leaf explant with 2,4-D 0.1 mgL⁻¹ (100%) and shoots from stems reached 58% with BA 1 mgL⁻¹. Peat moss+agrolite soil mixture promoted the greatest *ex vitro* survival, height, widening and emergence of new leaves and the

rosette morphology of the plants. This work shows the regenerative potential of *A. kavandivi* leaves and stems and the optimal conditions to its micropropagation were determined, contributing to the conservation of this species.

INTRODUCCIÓN

La pérdida de biodiversidad es un problema a nivel mundial producto de las acciones antrópicas, entre ellas la destrucción de hábitats, la sobreexplotación de especies, la invasión por especies exóticas y el mercado ilegal de individuos silvestres, que afecta sobre todo a aquellas con poblaciones pequeñas y alta especificidad de hábitat. Muchas especies con estas características generalmente no están dentro de un programa de conservación, lo que las vuelve vulnerables a la extinción local y total (CONABIO, 2020; García-Mendoza y Chávez-Rendón, 2013).

Las plantas son uno de los grupos más vulnerables debido a que muchas especies presentan alto grado de endemismo, dependen del estado de conservación del ecosistema, de la calidad del suelo (Royo-Márquez *et al.*, 2014) y son ampliamente utilizadas en diferentes culturas. En este contexto, las especies de la subfamilia Agavoideae (Asparagaceae), conocidos como agaves o magueyes, son uno de los ejemplos más representativos, ya que son un amplio grupo de plantas, con numerosos endemismos y requerimientos especiales de hábitat y a su vez son una fuente de recursos muy importante en México (Aguilar-Jiménez y Rodríguez de la O, 2018).

Los agaves son plantas de gran importancia ecológica, ya que son componentes fisionómicos muy importantes de los ambientes áridos y semiáridos, colaboran en

la retención del suelo y participan en interacciones únicas como la polinización (Flores-Abreu *et al.*, 2019), esto los vuelve elementos clave de las comunidades en las que habitan. Económicamente también son muy importantes, ya que son empleados para la elaboración de bebidas alcohólicas, obtención de fibras, ornato y remedios medicinales (García-Mendoza, 2007). El uso desmedido y la extracción ilegal, las características intrínsecas del grupo en relación con su propagación asexual como la baja tasa de crecimiento y proporción de hijuelos y bulbilos, y reproducción sexual como la escasa viabilidad de semillas además de la depresión por endogamia en algunas especies (Domínguez-Rosales *et al.*, 2008a; Eguiarte *et al.*, 2000), son agentes que ponen en riesgo a 22 de las 261 especies que se encuentran en México (SEMARNAT, 2019). Debido a lo anterior, se han implementado métodos de propagación que permiten generar plantas para su reintroducción, uso comercial e investigación, con el fin de contribuir a su conservación. Entre ellas destacan *Agave angustifolia* mediante conservación *ex situ* y *Agave salmiana* mediante conservación *in situ* (Colunga-García-Marín *et al.*, 2007). Sin embargo, algunos de estos métodos no son tan eficientes ya que el número de ejemplares generados no es suficiente para mantener las poblaciones silvestres ni satisfacer su demanda o se logra en periodos muy prolongados, por lo que se busca establecer nuevas técnicas de propagación que permitan mejorar y/o complementar las que ya existen.

Recientemente la propagación *in vitro* ha demostrado ser una alternativa que tiene la ventaja de generar un mayor número de individuos en menor tiempo a partir de diminutos segmentos vegetales, aumentar la tasa crecimiento sin dependencia de

las condiciones ambientales externas, mantener el genotipo inicial seleccionado y obtener plantas libres de microorganismos patógenos debido a las condiciones asépticas del cultivo. Esta técnica se ha empleado exitosamente en especies ornamentales, asegurando un fenotipo uniforme y hasta especies en peligro de extinción, manteniendo su variabilidad genética (Ferl y Paul, 2000). El presente trabajo tuvo por objetivo establecer el primer protocolo de propagación *in vitro* de *Agave kavandivi*, especie endémica de Oaxaca.

ANTECEDENTES

Subfamilia Agavoideae

La subfamilia Agavoideae (Asparagaceae) es endémica de América, está integrada por nueve géneros y 340 especies. México es el centro de origen y de mayor riqueza y diversidad, de las 261 especies que se encuentran en la República Mexicana, el 70% son endémicas (García-Mendoza, 2011). Agavoideae abarca casi todos los ambientes, incluyendo áreas tropicales y templadas (Rzedowski, 1981) y forma parte importante de los ecosistemas áridos y semiáridos de México, donde se presenta un alto grado de endemismo.

Esta subfamilia incluye plantas con o sin tallos aparentes, con hojas en roseta, suculentas, coriáceas o herbáceas, flores bisexuales y semillas de color negro (Gentry, 1982). Presenta biología reproductiva contrastante, considerando que, algunas especies son policárpicas, es decir, que presentan múltiples eventos reproductivos en su ciclo de vida; mientras que otras son monocárpicas, si producen sólo una inflorescencia en su vida (Eguiarte *et al.*, 2000).

Género *Agave*

El género *Agave* se distribuye desde el sur de los Estados Unidos hasta el norte de Sudamérica (García-Mendoza, 2002). Se conforma de aproximadamente 210 especies, de las cuales 159 están presentes en México (75% del total), de éstas 129 son endémicas, lo que representa el 81% de las que se distribuyen en México y el 61% de las especies del mundo. Oaxaca es el estado con mayor diversidad mundial de agaves al contar con al menos 40 de las 159 especies del territorio mexicano (García-Mendoza *et al.*, 2019).

Incluye plantas adaptadas a condiciones de aridez, con una forma característica de roseta y poseen raíces muy ramificadas, cutícula gruesa, hojas suculentas y metabolismo fotosintético tipo CAM (Domínguez-Rosales *et al.*, 2008b) (Figura 1).

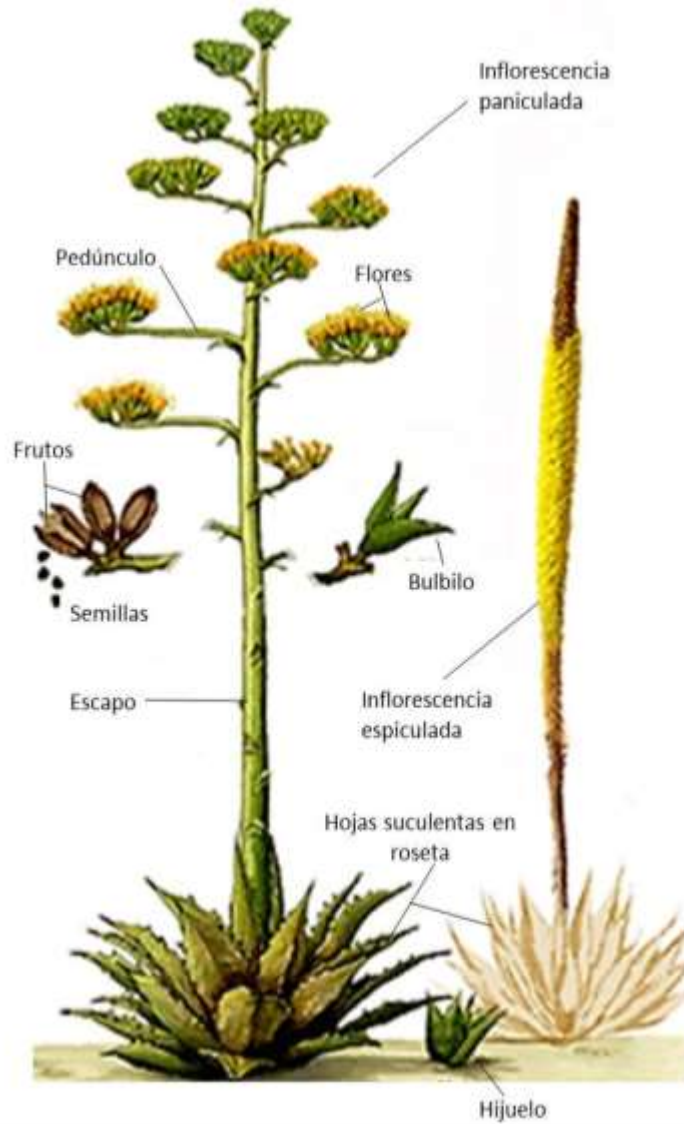


Figura 1. Morfología del género *Agave* (Tomado y modificado de CONABIO, 2020).

Taxonomía del género *Agave*

Gentry (1982) subdividió el género *Agave* en dos subgéneros, *Littaea* y *Agave*. *Littaea* se reconoce por las inflorescencias espiciformes o racemosas, mientras que *Agave* presenta inflorescencias paniculadas con las flores agrupadas en umbelas laterales. Los taxones que integran al subgénero *Littaea* son perennes, tienen tallos decumbentes, hojas estriadas, lineares con el margen finamente denticulado y flores campanuladas. El mismo autor propuso ocho grupos, entre ellos el grupo

Striatae, constituido por siete especies endémicas de México: *Agave dasylirioides*, *A. stricta*, *A. striata* subsp. *striata* y *A. striata* subsp. *falcata*, *A. tenuifolia*, *A. petrophila*, *A. rzedowskiana* y *A. albopilosa*. *Agave kavandivi* es una nueva especie perteneciente al grupo Striatae (García-Mendoza y Chávez-Rendón, 2013).

Usos de los agaves

Los agaves satisfacen necesidades de los pobladores de las zonas áridas y semiáridas del país, llegan a ser el soporte de importantes actividades económicas generadoras de riqueza como la industria tequilera, mezcalera y de fibras naturales (Domínguez-Rosales *et al.*, 2008a). Las diferentes partes de las agaváceas pueden ser utilizadas como alimento, bebida, fibras, construcción, ornato y cercas vivas (García-Mendoza, 2011).

En cuanto a usos medicinales, Guerra y colaboradores (2008) demostraron con estudios *in vitro* la actividad de sapogeninas (esteroides vegetales) presentes en *Agave brittoniana* Trel. (ssp. *brachypus*), cuyas hojas son tradicionalmente utilizadas en el tratamiento de enfermedades parasitarias, frente a la infección producida por *Trichomonas vaginalis*. Aunque el grupo Striatae carece de sapogeninas en las hojas (Gentry, 1982), este atributo aparentemente está presente en *A. kavandivi* (García-Mendoza y Chávez-Rendón, 2013).

Propagación de agaves

Los agaves se reproducen por vía sexual y asexual. La reproducción sexual se lleva a cabo mediante la formación de semillas, y la reproducción asexual ocurre gracias a la capacidad de la planta de producir clones en diferentes partes de la

roseta conocidos como hijuelos que se desarrollan mediante rizomas, estolones, en la base del tallo o entre las hojas, esto favorece el establecimiento exitoso por dependencia inicial de la planta madre (Angeles Vázquez *et al.*, 2017; Ramírez *et al.*, 2014). Por otra parte, los bulbilos son hijuelos aéreos que surgen de los meristemas axilares de la inflorescencia después de la floración, sin embargo, esto toma de 20 a 30 años de crecimiento vegetativo. Otra vía de propagación se basa en separar artificialmente un trozo de hoja denominado esqueje y colocarlo en tierra apropiada para enraizar (Angeles Vázquez *et al.*, 2017; Ramírez *et al.*, 2014).

Problemas de conservación en agaves

En algunas especies la reproducción sexual es limitada debido al lento crecimiento de la planta, la falta de polinización, la baja producción de semillas y los problemas de viabilidad de éstas (Domínguez-Rosales *et al.*, 2008a). Por lo tanto, la propagación a través de esta vía en general es poco frecuente (Lock, 1962).

La producción en masa de los agaves por métodos convencionales basados en la reproducción asexual presenta bajas tasas de propagación, incluso cada planta adulta puede formar pocos estolones cada año (Binh *et al.*, 1990) y la depresión por endogamia parece ser importante en los dos subgéneros *Agave* y *Littaea* (Eguiarte *et al.*, 2000), aunado a las enfermedades causadas por agentes patógenos cuando se encuentran en campo (Sánchez-Islas y Portillo, 2014). La falta de sistemas eficientes de propagación es un factor que limita el aprovechamiento racional de varias especies de *Agave* (Domínguez-Rosales *et al.*, 2008b), por estos factores, se buscan alternativas de propagación para la conservación de diferentes especies.

En este contexto, las especies que no son cultivadas, y que tienen hábitats más restringidos, han sido descuidadas al grado de que muchas se encuentran en riesgo de extinción. La NOM-059-SEMARNAT-2010 reconoce la existencia de 22 especies dentro del género, cuya supervivencia se ve amenazada (SEMARNAT, 2019). Esta situación se debe principalmente a la destrucción de su hábitat, la sobreexplotación de las poblaciones silvestres y el saqueo ilegal de plantas jóvenes para ser usadas con fines ornamentales (Domínguez-Rosales *et al.*, 2008a).

Agave kavandivi

Agave kavandivi García-Mend. *et* Chávez-Rendón, sp. Nov (Anexo 1), es endémica del estado de Oaxaca, recibe su epíteto específico en alusión a la montaña de donde proviene: “Kava Ndivi”, que en lengua mixteca de Yosondúa se traduce al español como “peña de la tórtola”. Forma parte del matorral rosetófilo y su distribución se restringe a la cuenca del Río Verde. Se desarrolla en taludes de rocas calizas, con inclinación de 40-70° (Figura 2a), en un intervalo altitudinal de 1300 a 2300 msnm. Su hábitat está poco impactado por actividades humanas, sin embargo, crece en laderas donde han ocurrido desprendimientos de terreno. Las pocas poblaciones conocidas, con número de individuos limitado y alta especificidad de hábitat, son factores que pueden contribuir a la desaparición de las poblaciones silvestres (García-Mendoza y Chávez-Rendón, 2013).

Es una especie colonial con roseta compacta y hemiesférica; tallos decumbentes; hojas cónico-subuladas con margen recto, finamente denticulado con espina terminal; inflorescencias en espiga y semillas negras, engrosadas y ornamentadas

con costillas transversales en la cara distal convexa (García-Mendoza y Chávez-Rendón, 2013) (Figura 2b).



Figura 2a. *Agave kavandivi* en su hábitat natural (Oaxaca: distrito de Tlaxiaco, municipio de Santiago Yosondúa). Fotografía de Abisaí García Mendoza.

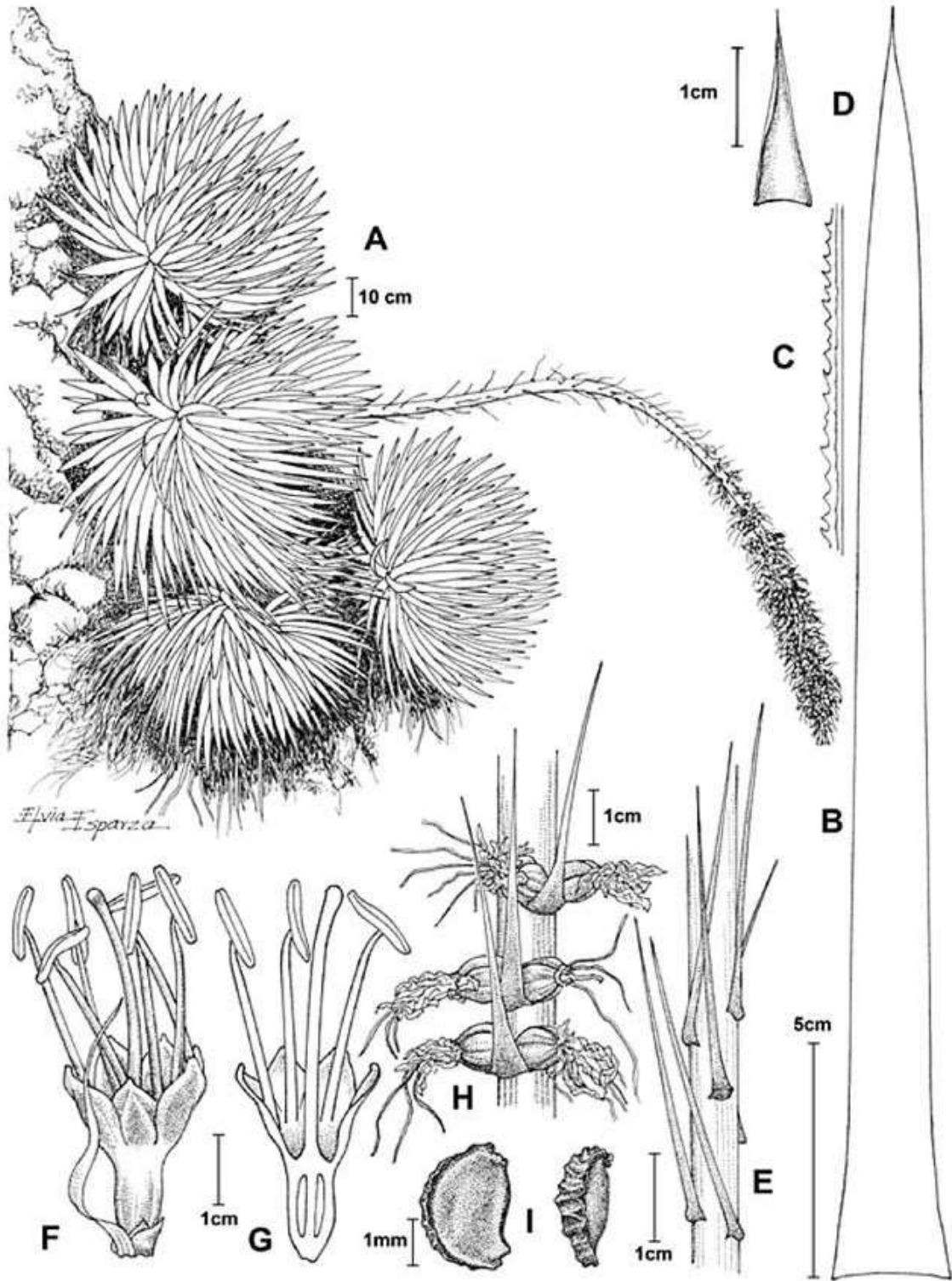


Figura 2b. Morfología de *Agave kavandivi*. **A**, hábito y roseta con inflorescencia; **B**, hoja; **C**, detalle del margen; **D**, ápice de la hoja; **E**, brácteas del pedúnculo; **F**, vista lateral de la flor; **G**, flor disecada; **H**, detalle de la infrutescencia; **I**, semillas. (Tomado de García-Mendoza y Chávez Rendón, 2013).

Cultivo de tejidos vegetales

El cultivo de tejidos vegetales o *in vitro* es una rama de la Biotecnología, la cual utiliza un conjunto de técnicas para crecer células, tejidos u órganos vegetales bajo condiciones asépticas en medios de cultivo con reguladores de crecimiento vegetal y permite ejercer un control relativo sobre los procesos morfogénéticos, fisiológicos y bioquímicos de los tejidos. Consiste en cultivar pequeños segmentos de plantas, denominados explantes e inducirlos a organogénesis y/o embriogénesis somática (Calva y Ríos, 1999; Abdelnour-Esquivel y Vicent-Escalant, 1994). Se basa en el principio de la totipotencialidad celular, que señala que la célula vegetal contiene el material genético para regenerar una planta completa. Tiene diversas aplicaciones, algunas de ellas son el mejoramiento genético, la obtención de plantas libres de virus, conservación de germoplasma y la micropropagación (Fert y Paul, 2000).

Micropropagación

Se refiere a la multiplicación masiva *in vitro*, se practica con éxito en especies hortícolas, ornamentales y leñosas, mostrando importantes ventajas con respecto a sistemas convencionales de propagación, entre las que destacan el incremento acelerado del número de plantas derivadas por genotipo, la reducción del tiempo de multiplicación, la posibilidad de multiplicar grandes cantidades de plantas en un espacio reducido, a bajos costos y en tiempos económicamente costeados, también permite tener un mayor control sobre la sanidad del material que se propaga, la facilidad de transportar el material *in vitro* con menos restricciones aduaneras y multiplicar una variedad o especie de la cual sólo existen pocos individuos (Villalobos y Thorpe, 1993).

Los diferentes procedimientos involucrados en la micropropagación pueden organizarse en cinco etapas, las cuales se describen a continuación (George y Debergh, 2008).

Etapa 0. Selección de la planta madre.

Es la elección de las plantas donantes con características deseables, donde es importante considerar la edad ontogénica y fisiológica, la estación en la cual se colecta el material vegetal, el tamaño y el estado sanitario general para evitar la contaminación por hongos y bacterias durante el establecimiento del cultivo *in vitro*. Así como seleccionar el tipo de explante, en general, los órganos jóvenes y aquellos con tejidos meristemáticos, ya sean yemas axilares, embriones o semillas son los que tienen mejor respuesta que los adultos.

Etapa 1. Establecimiento del cultivo aséptico.

Consiste en mantener a los explantes viables y asepticos. Se puede lograr tomando acciones preventivas como la verificación de patógenos a través de medios de cultivo para el crecimiento de bacterias y hongos y la desinfección superficial de los explantes empleando sustancias como etanol al 70%, peróxido de hidrógeno, nitrato de plata, hipoclorito de sodio. Aun así, los patógenos endógenos y los propios durante el manejo en laboratorio son capaces de permanecer latentes y se expresan cuando son transferidos al medio de cultivo, que pueden manejarse mediante el empleo de bacteriostáticos o antibióticos en el medio de cultivo.

Etapa 2. Inducción y multiplicación.

Consiste en generar la mayor cantidad de brotes (tallos sin raíz) debido a los efectos del medio de cultivo, los reguladores de crecimiento vegetal y mediante las vías de regeneración organogénesis y embriogénesis somática. En esta etapa es importante evitar la formación de callo para disminuir el riesgo de variación.

Etapa 3. Elongación y enraizamiento.

Para promover la elongación de los brotes, es necesario transferirlos (subcultivarlos) en un medio sin reguladores de crecimiento vegetal, mientras que la formación de raíces adventicias se puede efectuar tanto en condiciones *in vitro* como *ex vitro* empleando auxinas, medio solidificado con agar y nutrimentos reducidos al 50%, sustratos como perlita y/o vermiculita humedecidas con medio nutritivo o agua. En especies ornamentales se ha observado que la diferenciación del sistema radical bajo condiciones *in vitro* no es económicamente costeable, por lo que se puede sustituir esta fase por el enraizamiento de brotes en cámaras de humidificación. Sin embargo, si el sistema radical ha sido diferenciado *in vitro*, no se recomienda que las plantas se pasen directamente a las condiciones de invernadero sin una paulatina aclimatización.

Etapa 4. Aclimatización.

La aclimatización de las plantas obtenidas por micropropagación a condiciones *ex vitro* se puede lograr con estrategias que permitan el cambio gradual de las condiciones ambientales. Comúnmente consisten en enjuagar las raíces para eliminar los restos de agar, que pueden ser una fuente de contaminación por la

presencia de azúcar y otros nutrientes en el medio, y sumergirlas en una solución fungicida, posteriormente se realiza el trasplante a un sustrato estéril en recipientes transparentes cerrados que se abren o perforan gradualmente para permitir el intercambio de aire con el exterior hasta que las plantas puedan sobrevivir *ex vitro*. Este proceso puede iniciarse dentro de los cuartos de incubación y posteriormente en un invernadero y, finalmente, evaluar el porcentaje de sobrevivencia en el invernadero (Aguilar-Jiménez y Rodríguez de la O., 2018; Villalobos y Thorpe, 1993). Durante el inicio de esta fase se recomiendan los riegos con medio de cultivo diluido al 50% (sin azúcares) y posteriormente con soluciones nutritivas menos complejas (Olmos *et al.*, 2016; Villalobos y Thorpe, 1993).

Medio de cultivo

El medio de cultivo es una combinación de sales inorgánicas y compuestos orgánicos que favorece el crecimiento de células o tejidos de diferentes especies y genotipos y facilita etapas como la formación de brotes y enraizamiento (Phillips y Garda, 2019; Abdelnour-Esquivel y Vicent-Escalant, 1994). El éxito del cultivo *in vitro* se debe en gran parte a la disponibilidad de nutrimentos del medio artificial, en el que usualmente un carbohidrato, como la sacarosa, reemplaza el carbón que la planta fijaría de la atmósfera en condiciones *ex vitro*. El medio más empleado es el de Murashige y Skoog (MS) (Anexo 1) (Murashige y Skoog, 1962), que contiene los requerimientos nutricionales necesarios para la mayoría de las especies vegetales (George *et al.*, 2008), sin embargo, cuando es utilizado para la germinación de semillas, este medio puede dificultar o inhibir el proceso, debido a que presenta un potencial osmótico muy negativo por su alto contenido de compuestos

nitrogenados (Cárdenas y Villegas, 2002). La inhibición de la germinación *in vitro* se debe a la presencia de sales, que disminuyen el potencial hídrico y generan una menor disponibilidad de agua para las semillas, lo que también puede afectar el crecimiento y ramificación de las raíces (Rodríguez *et al.*, 2014; George *et al.*, 2008).

Componentes adicionales del medio de cultivo

1. Reguladores de crecimiento vegetal

Los reguladores de crecimiento vegetal son compuestos orgánicos que en bajas concentraciones estimulan, inhiben o modifican procesos fisiológicos del crecimiento y desarrollo en plantas, en las que están presentes de manera natural o endógena y a su vez se pueden sintetizar artificialmente y ser añadidos de manera exógena (George *et al.*, 2008; Bidwell, 1979). Debido a sus funciones *in vitro* (Tabla 1), las más utilizadas en cultivo son las auxinas ácido indol-3-acético (AIA), ácido 1-naftalenacético (ANA), ácido indol-3-butírico (IBA) y ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) (Guilfoyle *et al.*, 1998) y las citocininas como la Zeatina (Z), Kinetina (Kin) y Benciladenina o Bencilaminopurina (BA o BAP) (Mock *et al.*, 2000).

Tabla 1 Regulación o estimulación de diferentes procesos fisiológicos *in vivo* e *in vitro* promovidos por las auxinas y citocininas.

Auxinas	<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>
Regulación del ciclo celular	✓	✓
Dominancia apical y tropismo	✓	
División y elongación celular	✓	✓
Diferenciación de haces vasculares	✓	
Rizogénesis (de raíces laterales y adventicias)	✓	✓
Dispersión celular y formación de callo		✓
Embriogénesis somática		✓
	<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>
Citocininas		
Regulación del ciclo celular y control sobre la mitosis	✓	✓
Crecimiento de yemas y expansión foliar	✓	
Maduración de etioplastos y síntesis de clorofila	✓	
Inhibición de la senescencia	✓	
Rompimiento de la dominancia apical	✓	✓
Desarrollo de yemas axilares		✓
Formación de brotes adventicios		✓

Elaborado a partir de George *et al.*, 2008; Mock *et al.*, 2000 y Guilfoyle *et al.*, 1998.

2. Aminoácidos

Las respuestas de los tejidos vegetales no derivan solamente de la carga nutricional que se les aporte, sino que implican la existencia de una acción colaboradora en la regulación del metabolismo y del crecimiento. Los aminoácidos además de estar involucrados en la formación de proteínas, también son conocidos por tener diversas funciones en plantas, incluyendo protección frente al estrés biótico y abiótico, señalización, almacenamiento de nitrógeno y acción bioestimulante en el crecimiento (Halpern *et al.*, 2014).

Entre los aminoácidos y amidas que se han mostrado benéficas en el cultivo de tejidos vegetales están L-Ácido aspártico, L-Glutamina, L-Ácido glutámico, L-Tirosina y L-Arginina (Abdelnour-Esquivel y Vicent-Escalant, 1994), éste último tiene una función clave no sólo en la síntesis de proteínas, sino también en el metabolismo y en los procesos de distribución y almacenamiento de nitrógeno orgánico en plantas, precursor de poliaminas, óxido nítrico, prolina y diversos metabolitos esenciales para muchos procesos celulares y del desarrollo, así mismo están involucradas en los mecanismos de desarrollo y defensa contra el estrés (Winter *et al.*, 2015; Slocum, 2005).

Uso de L-Arginina en la germinación

Durante la germinación la arginina es sintetizada activamente, aporta del 14-62% de los grupos amino libres, el 78% se utiliza para su incorporación en proteínas de los cotiledones, el cual se suministra por biosíntesis *in situ* por medio del sistema

vascular, representando el 18% del total de proteínas cotiledonares (Barry y Barry 1989).

En semillas de diferentes especies de plantas, del total de las reservas de nitrógeno, entre el 40-50% está representado por la arginina (King y Gifford, 1997; van Etten *et al.*, 1963), este aminoácido es rico en nitrógeno y al descomponerse es liberado y puede reciclarse durante la germinación para formar proteínas y poliaminas e incluso otros aminoácidos (Kakkar *et al.*, 2000).

Respuestas morfogénicas

La morfogénesis se refiere a la formación de nuevos órganos, este proceso puede inducirse *in vitro* para obtener dos tipos de respuesta: organogénesis y embriogénesis somática, que pueden ser directas o indirectas. Son indirectas cuando pasan por una fase previa de generación de tejido indiferenciado llamado callo, o directas en la ausencia de dicha fase (Gisbert-Doménech, 2010; Domínguez-Rosales *et al.*, 2008a).

- Organogénesis

Consiste en el desarrollo de hojas, tallos o raíces (Phillips, 2004) mediante la activación de yemas axilares preformadas o por la formación de brotes adventicios de *novo* (tallos sin raíz) a partir de tejido somático (Olmos *et al.*, 2016; Jiménez González, 1998).

Se sabe que la formación de brotes adventicios permite la obtención de un mayor número de regenerantes comparado con el obtenido a partir de yemas preformadas, ya que está en función del número de yemas incluidas en cada explante, sin embargo, esto se ve compensado por un aumento en la tasa de

multiplicación con los sucesivos subcultivos (Olmos *et al.*, 2016; Jiménez González, 1998). La organogénesis directa (OD) ofrece las ventajas de mantener la estabilidad genética de las nuevas plantas, que generalmente son de un fenotipo homogéneo, y cada vez que se genera una reserva de brotes estos pueden servir nuevamente como fuente de explantes (Jaimes-De Lindarte y Bustamante-Corzo, 1997); mientras que se puede considerar como desventaja que la formación de estructuras solo con el polo apical o de un solo meristemo, denominados brotes adventicios, pueden tener bajas probabilidades de sobrevivencia debido a la ausencia de raíz (Olmos *et al.*, 2016).

En la organogénesis indirecta (OI) se inducen brotes adventicios a partir de callo, el cual generalmente se desarrolla en respuesta a concentraciones elevadas de auxinas. La presencia de otros reguladores de crecimiento como las citocininas también promueve la rediferenciación celular (inducción de tejido meristemático) que conduce a la formación de primordios y el desarrollo posterior de los brotes (Olmos *et al.*, 2016). Esta vía tiene la ventaja de que el número de brotes obtenidos puede ser más numeroso, sin embargo, es más probable obtener regenerantes anormales a causa de variaciones genéticas o epigenéticas, producto del estado continuo de desdiferenciación y rediferenciación celular, por lo que este método no es recomendable para plantas en las que se desea conservar las características genéticas originales (Domínguez-Rosales *et al.*, 2008a).

- Embriogénesis somática

Se refiere a la formación de embriones a partir de células que no son producto de la fusión de gametos y que pueden seguir las mismas etapas de desarrollo de los

embriones cigóticos. El embrión somático es una estructura bipolar con un eje radical-apical que no posee conexiones vasculares con el tejido materno (Bhojwani y Kumar, 2013; Abdelnour-Esquivel y Vicent-Escalant, 1994) y mantiene cierta similitud con los embriones cigóticos, sin embargo, tanto *in vivo* como *in vitro*, pueden ocurrir algunas anormalidades en su desarrollo, por ejemplo, la fasciación y la fusión de los cotiledones. Un embrión somático se puede formar de manera natural a partir de la nucela, integumentos del óvulo, sinérgidas, suspensor o antípodas de ciertas plantas, por ejemplo, en los géneros *Mangifera* y *Citrus*. En el cultivo *in vitro* es posible que, dentro de un explante, ciertas células estén predeterminadas para los eventos morfogénéticos que llevan a la embriogénesis somática, la aplicación de auxinas puede promover el desarrollo de células embriogénicas y posteriormente de los embriones somáticos, además de estimular la división continua de las células embriogénicas predeterminadas (Bhojwani y Kumar, 2013; Litz y Jarret, 1993).

Al ser los embriones somáticos estructuras con un ápice del tallo y de la raíz, esta vía morfogénética ofrece la ventaja de poder saltar la etapa de enraizamiento, contrario a lo que ocurre en la organogénesis. No obstante, los embriones somáticos requieren dos etapas adicionales de cultivo, denominadas de maduración y de germinación, en las cuales es necesario remover la auxina del medio de cultivo (Olmos *et al.*, 2016; Litz y Jarret, 1993).

Limitantes del cultivo *in vitro*

1. Oxidación de tejidos

Los tejidos adultos de las angiospermas biosintetizan compuestos fenólicos como producto de su metabolismo secundario, en el cultivo *in vitro* estos compuestos se liberan por el efecto agresivo del agente desinfectante, de las heridas causadas en los tejidos al momento de cortarlos para la obtención de explantes, por la composición del medio de cultivo, el volumen y la calidad del frasco de cultivo y son liberados al medio nutritivo ocasionando la oxidación de los explantes (Hernández y González, 2010; Azofeifa, 2009; Abdelwahd *et al.* 2008; George *et al.*, 2008; Tabiyeh *et al.* 2006; van Staden *et al.* 2006).

La oxidación es el proceso a través del cual un átomo o grupo de átomos pierde uno o más electrones y los cede a otro. En los tejidos de los explantes se presenta como el ennegrecimiento letal que ocurre en las células por la acción de enzimas tipo polifenoxidasas y tirosinasas que se liberan cuando los tejidos sufren heridas. Éstas actúan sobre los polifenoles, la tirosina o en los radicales libres y los oxidan a quinonas, las cuales son especies químicas fitotóxicas muy reactivas y propensas a generar daño e incluso muerte celular, ya que afectan las proteínas y en consecuencia inhiben el crecimiento y la viabilidad de los explantes (Hernández y González 2010; Azofeifa 2009; Bray *et al.* 2000; Amiot *et al.* 1996).

Estrategias contra la oxidación de tejidos

La prevención y disminución de los factores que provocan o estimulan el estrés oxidativo en el explante es el mejor procedimiento para impedir el desencadenamiento de eventos que conllevan a la oxidación de éste. Cuando no se

logra evitar, hay estrategias para minimizar la oxidación como la disminución de la temperatura y la intensidad de luz, el incremento en las sales de calcio y disminución de sales de nitrato en el medio de cultivo. Se recomienda el uso de explantes en estado juvenil, estos pueden ser sometidos a subcultivos frecuentes, sumergirlos durante un día en agua estéril, medio de cultivo líquido o incluso cultivarlos en éste, así como el uso de adsorbentes y antioxidantes (Azofeifa 2009; Sánchez-Cuevas y Salaverría 2004).

El carbón activado tiene una red de poros muy fina con un volumen muy grande que le confiere su capacidad de adsorción única; cuando se añade al medio de cultivo es posible remover compuestos fenólicos, evitando o disminuyendo el deterioro de los tejidos, su efecto benéfico se atribuye a su capacidad para remover sustancias inhibitorias o tóxicas del medio de cultivo que son producidas durante la esterilización de este o liberadas por el explante (Thomas, 2008). Entre los antioxidantes comúnmente utilizados se encuentran las soluciones de L-cisteína a 25 mgL^{-1} , polivinilpolipirrolidona (PVPP) a 500 mgL^{-1} y la mezcla de ácido ascórbico (150 mgL^{-1}) + ácido cítrico (200 mgL^{-1}), es importante tener en cuenta que estas soluciones deben ser esterilizadas por filtración previamente a su aplicación en los tejidos o a su incorporación al medio de cultivo (Azofeifa, 2009; Concepción *et al.*, 2005).

2. Contaminación microbiana

La contaminación microbiana es uno de los problemas más graves en la micropropagación, ya que produce pérdidas de material, tanto en los trabajos de investigación como en la micropropagación comercial. Puede tener dos orígenes:

a) microorganismos que colonizan la superficie o el interior del explante (endófitos) y b) microorganismos introducidos durante la manipulación en el laboratorio (Debergh y Zimmerman, 1991).

Los contaminantes más frecuentes en condiciones *in vitro* son las bacterias y los hongos (Skirvin *et al.*, 1999), denominados “*vitro* patógenos”, aunque también existen otros menos frecuentes como los virus y microartrópodos. El término “*vitro* patógeno” ha sido usado para aquellos organismos que no son necesariamente patógenos para las plantas en el campo, pero sí son perjudiciales para células, tejidos u órganos cultivados *in vitro* (Hernández y González, 2010), mismos que son más susceptibles a los microorganismos al existir una competencia entre éstos y el explante por los nutrientes del medio, generan daños directos e indirectos por la acelerada colonización de los tejidos o por la liberación de metabolitos secundarios tóxicos en el medio de cultivo (Leifert *et al.*, 1994).

Para evitar la contaminación es necesario emplear métodos de desinfección en la fase del establecimiento del cultivo *in vitro*, sin embargo, no siempre se eliminan las poblaciones de microorganismos asociadas a los tejidos o semillas de las plantas *in vivo*. Algunos son capaces de permanecer en el interior de las células, en los espacios intercelulares o haces conductores y así quedan protegidos de los agentes desinfectantes; de esta forma se propagan con el material vegetal y pueden manifestarse en la fase de establecimiento durante las primeras dos semanas de cultivo (Skirvin *et al.*, 1999), o permanecer sin expresarse por largos periodos (George, 1993). A pesar de la atención cuidadosa en los procedimientos, la contaminación puede resultar en la pérdida del 100% de los explantes (Skirvin *et*

al., 1999), por lo que es importante emplear estrategias de desinfección para evitar o disminuir pérdidas por contaminación.

Estrategias contra la contaminación microbiana

- **Prevención**

Inicia con la limpieza y desinfección del área de trabajo, la higiene de manos y la correcta esterilización del instrumental. También se refiere a la selección y tratamiento de la planta madre, la desinfección superficial del explante, el uso de sustancias antimicrobianas y el cultivo de meristemos (Yoo, 2008; Leifert y Cassells, 2001). La observación continua de los cultivos es fundamental para una detección oportuna de contaminantes (Leifert *et al.*, 1989).

- **Desinfección**

Los desinfectantes se clasifican como agentes oxidantes y no oxidantes. Los agentes oxidantes incluyen agentes halógenos como hipoclorito de sodio y yodo, así como peróxido, mientras que los agentes no oxidantes incluyen alcohol, biguanidas (clorhexidina), compuestos de amonio cuaternario, fenol, aldehído (glutaraldehído) y óxido de etileno (Yoo, 2008).

Para la desinfección inicial de los explantes se han empleado comúnmente soluciones de hipoclorito de sodio (NaClO) en concentraciones entre 0.5 y 5% y de hipoclorito de calcio $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ (Martínez, 1995; Benerjee *et al.*, 1985). La aplicación de una doble desinfección con hipoclorito de sodio o de calcio, seguido del enjuague con agua destilada esterilizada por dos a tres minutos permite que las esporas que no puedan ser destruidas inicialmente, sean eliminadas fácilmente de los explantes primarios, lo que conlleva a un menor porcentaje de contaminación microbiana (Hernández y González, 2010).

Uno de los procedimientos para combatir la contaminación por hongos es la aplicación de fungicidas curativos de acción sistémica como Benomil pH 5.0 (2 gL^{-1}) o el complejo carbendazim-ciclodextrina (Cruz *et al.*, 2002).

El uso de ciertos antibióticos puede eliminar grupos de bacterias, pero en la mayoría de los casos se necesitan sustancias de un espectro más amplio. El empleo de agentes químicos desinfectantes como el Basamid, Brassicol, Benlate, PCNB o mezclas de ellos permite la eliminación de bacterias (Marcano y Pire, 1993).

3. Hiperhidricidad

Otro problema que puede presentarse durante el cultivo *in vitro* es la hiperhidricidad o hiperhidratación, se refiere al exceso de agua en los tejidos, que provoca un proceso morfogénico anormal con cambios anatómicos, morfológicos y fisiológicos que producen órganos frecuentemente menos verdes, que se rompen fácilmente y de una apariencia vidriosa, por lo que anteriormente se le dio el término “vitrificación”. Este fenómeno está regulado por dos factores clave que son la humedad relativa dentro de los contenedores *in vitro* y el potencial hídrico, que afectan a dos procesos fisiológicos fundamentales, la fotosíntesis y la transpiración (Olmos *et al.*, 2016; Kevers *et al.*, 2004).

Debido a la disfunción metabólica asociada, las plantas pueden volverse completamente heterótrofas y transpirar excesivamente debido a un estado permanente de estomas abiertos, a cambios estructurales como las paredes celulares delgadas y sin cutículas, así como cambios ultraestructurales a nivel celular como atrofia de cloroplastos, por lo que su principal consecuencia es la baja supervivencia de las plantas obtenidas durante la aclimatización *ex vitro*. La

hiperhidricidad se considera una respuesta fisiológica frente a los factores de estrés del cultivo *in vitro*, tales como la alta humedad relativa dentro de los frascos de cultivo, la luz, la temperatura, los componentes orgánicos e inorgánicos del medio y los reguladores de crecimiento (Olmos *et al.*, 2016; Kevers *et al.*, 2004).

Trabajos *in vitro* con especies del género *Agave*

Se han reportado diversos trabajos de propagación *in vitro* del género *Agave* en especies de interés comercial, productoras de bebidas alcohólicas fermentadas y destiladas, como *A. salmiana* y *A. tequilana* respectivamente (Silos-Espino *et al.*, 2007; Valenzuela-Sánchez *et al.*, 2006), productoras de fibras, como *A. fourcroydes* y *A. sisalana* (Binh *et al.*, 1990; Robert *et al.*, 1987), así como la micropropagación de especies amenazadas y con alto valor ornamental (Martínez-Palacios *et al.*, 2003; Santacruz-Ruvalcaba *et al.*, 1999; Powers y Backhaus, 1989). Actualmente, 22 especies del género *Agave* se encuentran enlistadas en la NOM-059-SEMARNAT-2010 (SEMARNAT, 2019), de éstas 11 especies están en la categoría “Amenazada”, cinco especies en “Sujeta a protección especial” y seis en “Peligro de extinción”, sin embargo se ha reportado que sólo 13 de las 22 especies enlistadas han sido cultivadas *in vitro* (Anexo 3).

- **Explantos utilizados**

Entre los trabajos de micropropagación realizados en el género *Agave* y otras especies de la familia Asparagaceae, la producción de brotes se ha logrado principalmente a partir de meristemas basales obtenidos de los tallos de plántulas germinadas *in vitro* (Valenzuela-Sánchez, 2006), éstos son el tipo de explante que

más se ha empleado debido a que ofrece más ventajas técnicas con respecto a las hojas y raíces (Anaya-Dyck *et al.*, 2010).

De los trabajos de propagación *in vitro* que ponen a prueba la capacidad regenerativa de diferentes explantes destaca el de *Beaucarnea inermis* (Asparagaceae), en el que se utilizaron hojas y tallos de plántulas de 90 días de edad germinadas *in vitro*. Las hojas se utilizaron para inducir organogénesis indirecta, al seccionarlas en ápice, parte media y basal y comparar la respuesta de cada sección para determinar la más regenerativa. Además, se utilizó el ápice del tallo para inducir organogénesis directa y comparar su respuesta morfogénica con respecto a las secciones de hoja. Los segmentos basales de hoja resultaron ser más regenerativos que las secciones del ápice y parte media de la misma, con los valores más altos de tres brotes por explante con BA/ANA 2/0.5 y 6/0.5 mg L⁻¹; mientras que en los tallos se obtuvieron hasta 16 brotes por explante con 2 mgL⁻¹ de BA (Guillén *et al.*, 2015).

En *A. nizandensis* se reportó la formación de brotes por organogénesis indirecta a partir de explantes de hoja. La formación de callo se observó a partir de dos semanas de cultivo en medio MS con BA/ANA 3/3 mgL⁻¹, sin embargo, los primeros brotes se observaron a los dos meses de inducción en medio Gamborg con BA/ANA 0.5/0.5 mgL⁻¹ (Sánchez Pérez *et al.*, 2009). En *A. tequilana*, los explantes de segmentos centrales de tallos de plantas regeneradas *in vitro* formaron brotes mediante organogénesis indirecta en medio MS+BA/2,4-D 10/0.025 mgL⁻¹ y se observó que, después de la inducción, el tiempo máximo para hacer la transferencia del callo debe ser de siete días (Valenzuela-Sánchez, 2006). Por otra parte, Anaya-Dyck *et al.* (2010), utilizaron plántulas de *A. parviflora* de un mes y

medio de edad, obtenidas de la germinación *in vitro* para obtener explantes de raíces, tallos y hojas. Las mejores respuestas se observaron en los tallos, ya que resultaron ser mejores explantes que los de hoja y raíz, los cuales se oxidaron y perdieron su viabilidad antes de generar callo.

Tomando en cuenta lo anterior, en la Tabla 2 se resumen las condiciones de cultivo y respuestas morfogénicas predominantes en la inducción de explantes de hoja y tallo para la micropropagación de agaves.

Tabla 2. Condiciones de cultivo y respuestas predominantes en la inducción de brotes *in vitro* de agaves a partir de explantes de hoja y tallo.

	Explantes de hoja	Explantes de tallo
RM predominante	OI	OD
Concentración de citocinina/auxina	Altas concentraciones de auxinas y citocininas en diferentes combinaciones. El mayor número de brotes se obtiene en altas concentraciones de RCV.	Bajas concentraciones de citocininas, generalmente no se requieren auxinas. El mayor número de brotes se obtiene con menor concentración de RCV.
Periodo de inducción	Largos periodos de inducción.	Menores que los explantes de hoja.
Subcultivos	En la OI de hojas son necesarios los subcultivos del callo.	Generalmente no se requieren subcultivos.
Oxidación	Altos porcentajes, se requieren alternativas que la contrarresten.	Bajos porcentajes.

RM: Respuesta morfogénica, OI: Organogénesis indirecta, OD: Organogénesis directa, RCV: Reguladores de crecimiento vegetal. Elaborado a partir de Guillén *et al.*, 2015; Anaya-Dyck *et al.*, 2010; Sánchez Pérez *et al.*, 2009 y Valenzuela-Sánchez, 2006.

- **Reguladores de crecimiento vegetal más utilizados**

Los explantes son cultivados en medios adicionados con citocininas, entre las que se encuentran la Benciladenina (BA), Kinetina (KIN), 6- γ , γ -dimetilalilaminopurina

(2iP), tiazurón (TDZ) y meta-Topolina (*mT*) (Domínguez-Rosales *et al.*, 2008a) y auxinas como el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido 1-naftalenacético (ANA), ácido indol 3-acético (AIA) y ácido indol 3-butírico (IBA). De los RCV mencionados, los más reportados para la micropropagación del género *Agave* son la BA (1-10 mgL⁻¹) y el 2,4-D (0.025-1 mgL⁻¹), que en combinación han generado brotes principalmente por organogénesis directa, al utilizar explantes de tallo (Tabla 3).

Tabla 3. Algunos trabajos *in vitro* realizados con especies del género *Agave*.

Especie	Explante	MS+RCV (mgL ⁻¹)	Respuesta	Referencia
<i>A. fourcroydes</i>	Rizomas y tallo	BA(1)+2,4-D(0.25)	Brotes (OD)	Robert <i>et al.</i> , 1987
<i>A. sisalana</i>	Segmentos de estolón	KIN(0.5)+ANA (0.075) +IBA (0.1)	Brotes (OD)	Binh <i>et al.</i> , 1990
<i>A. angustifolia</i>	Tallo	BA(1)+Tiamina(4) Mio-inositol (100)	Brotes (OD)	Enríquez del Valle <i>et al.</i> , 2005
<i>A. tequilana</i>	Hojas*	BA(10)+2,4-D(0.025)	Brotes (OI)	Valenzuela-Sánchez, 2006
<i>A. inaequidens</i>	Tallo	BA(10)+IBA(0.3)	Brotes (OD)	Aureoles-Rodríguez <i>et al.</i> , 2008
<i>A. nizandensis</i>	Hojas	MS+BA(3)+ANA(3) Gamborg+BA(0.5)+ANA(0.5)	Callo Brotes (OI)	Sánchez Pérez <i>et al.</i> , 2009
<i>A. angustifolia</i>	Ejes embrionarios cigóticos	BA(1)+2,4-D(1)	ESD y ESI	Arzate-Fernández y Mejía-Franco, 2011
<i>A. americana</i>	Tallo	BA(6) Sacarosa 40 gL ⁻¹	Brotes (OI)	Miguel-Luna <i>et al.</i> , 2014
<i>A. marmorata</i>	Tallo	BA(3)+AIA(10)	Brotes (OD)	Aguilar-Jiménez y Rodríguez de la O, 2018

MS: Medio Murashige y Skoog, RCV: Reguladores de Crecimiento Vegetal, BA: Benciladenina, KIN: Kinetina, BAP: 6-bencilaminopurina, 2,4-D: Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético, ANA: Ácido naftalenacético, IBA: Ácido indolbutírico. OI: Organogénesis indirecta, OD: Organogénesis directa, ESD: Embriogénesis somática directa, ESI: Embriogénesis somática indirecta. *Explantes obtenidos de plantas *in vitro*.

- **Enraizamiento**

En condiciones *in vitro*, los brotes de *Agave* pueden enraizar simplemente si se subcultivan a un medio sin reguladores de crecimiento, o a un medio con 0.5 mgL^{-1} de IBA, diluyendo las sales al 50% de la concentración original. En condiciones *ex vitro* se realiza el trasplante de los brotes a vermiculita y se mantienen en la cámara de ambiente controlado, sin embargo, es necesario controlar el ataque de hongos con la aplicación de fungicidas (Villalobos *et al.*, 1993). En caso de que no se formen raíces, será necesario añadir una sustancia al medio que favorezca su formación. Enríquez y Díaz (1994) reportaron la formación de raíces en *A. angustifolia* en medio MS con las sales inorgánicas al 50% de concentración y sin fitorreguladores, sin embargo, al incorporar ácido indol 3-acético (AIA) o ácido indol 3-butírico (IBA) en el medio, se formaron raíces en mayor cantidad, conforme aumentó la concentración de la auxina hasta 1 mgL^{-1} . En algunas especies es necesario agregar carbón activado al medio para estimular la generación de raíces (Domínguez-Rosales *et al.*, 2008a).

- **Aclimatización**

Los trabajos de aclimatización de agaves propagados *in vitro* indican que los aspectos más importantes para esta etapa, que es la más crítica de la micropropagación, son el sustrato y la disponibilidad de nutrientes. En este sentido Yescas-Arreola *et al.*, reportaron en 2016, el uso de diferentes sustratos para la aclimatización de *Agave americana* var. *oaxacensis*, entre éstos arena, arena+ vermiculita (1:1), arena+vermiculita+turba (1:1:1) y arena+turba (1:1), en dos periodos: el primero de 49 días, en el que se aplicó diariamente 15 mL de

solución nutritiva Steiner a nivel sustrato y con una alta humedad relativa (80-90%) dentro del invernadero; el segundo, después de 50 días, en el que se trasladaron las plantas al invernadero de aclimatación, cuya humedad relativa fue de 40-60% y la aplicación de la solución Steiner se realizó cada dos días a nivel sustrato. El 100% de sobrevivencia se logró en arena+turba (1:1). En ambos periodos se utilizó el sistema de riego por nebulización de 10 s cada 12 min como fuente principal de agua.

De manera similar, Aguilar-Jiménez y Rodríguez de la O (2018) llevaron a cabo durante tres semanas la aclimatización de *Agave marmorata* dentro de un área de incubación y pusieron a prueba diferentes sustratos humedecidos a capacidad de campo: agrolita, tezontle, arena de río, peat moss+agrolita (1:1) y peat moss+arena de río (1:1). Obtuvieron el 100% de sobrevivencia en peat moss+agrolita y en peat moss+arena de río.

Por otra parte, Cruz-García *et al.* (2017), reportaron la aclimatización de *Agave americana* var. *oaxacensis* en un invernadero con radiación solar disminuida y humedad relativa alta, en un sustrato compuesto por turba+arena (1:2, 2:1 y 3:1), con riegos una vez por semana (suplementados con 10 mL de solución universal Steiner) a nivel sustrato, esto al sugerir que los riegos a nivel de sustrato promueven la formación de mayor cantidad de hojas. Los mejores resultados se obtuvieron en la combinación 1:2, no obstante, los resultados mostraron que el sustrato y la disponibilidad de nutrientes influyen durante la aclimatización de plantas de *A. americana* var. *oaxacensis*, por lo tanto, si se pretende aclimatizar plantas para ser llevadas al campo es importante seguir evaluando diferentes sustratos para cada especie propagada *in vitro*.

Tomando en cuenta lo anterior, es posible destacar el uso de sustratos compuestos, con alto contenido de materia orgánica, siendo el peat moss o turba uno de los más efectivos, mientras que los sustratos inorgánicos que en combinación con los orgánicos resultan ser más efectivos son la arena de río y la agrolita. A su vez, los contenedores más utilizados son las macetas de polietileno, la humedad relativa durante esta etapa va desde 40 hasta más de 80% en periodos desde 15 hasta 245 días (Tabla 4), sin embargo, estos valores pueden variar para cada especie, por lo que es necesario establecer el protocolo para cada una.

Tabla 4. Condiciones de aclimatización en tres especies de *Agave* propagadas *in vitro*.

Especie	Sustrato	Contenedores	Humedad relativa	Periodo de aclimatización	Referencia
<i>A. americana</i> var. <i>oaxacensis</i>	Turba+arena (1:1)	Macetas de polietileno	80-90% y 40-60%	245 días	Yescas-Arreola <i>et al.</i> , 2016
<i>A. americana</i> var. <i>oaxacensis</i>	Turba+arena (1:2)	Macetas de polietileno	Mayor a 80%	180 días	Cruz-García <i>et al.</i> , 2017
<i>A. marmorata</i>	Peat moss+ agrolita (1:1)	Charolas de unicel	--	15 días	Aguilar-Jiménez y Rodríguez de la O, 2018
	Peat moss+ arena de río (1:1)				

JUSTIFICACIÓN

Debido a su distribución geográfica restringida, alta especificidad de hábitat y potencial ornamental, *Agave kavandivi* es una especie susceptible al saqueo de semillas y ejemplares silvestres. Al ser una especie descrita recientemente, resulta atractiva para coleccionistas y la venta de sus semillas ya es anunciada en internet. La micropropagación de *A. kavandivi*, utilizando técnicas de cultivo de tejidos vegetales se propone como una alternativa para la producción de plantas en mayor número que las obtenidas por los métodos convencionales, repercutiendo de manera indirecta, a la conservación de esta especie al evitar el saqueo de individuos silvestres.

OBJETIVOS

General

Obtener brotes de *Agave kavandivi* por cultivo de tejidos vegetales.

Particulares

- Establecer las condiciones óptimas para la germinación *in vitro* de semillas.
- Determinar la concentración de reguladores de crecimiento vegetal que regenere el mayor número de brotes.
- Determinar el tipo de explante más regenerativo.
- Promover el enraizamiento de los brotes formados *in vitro*.
- Evaluar el porcentaje de sobrevivencia de las plantas aclimatizadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Se utilizaron semillas de *Agave kavandivi*, donadas por el Dr. Abisaí García Mendoza del Jardín Botánico del Instituto de Biología-UNAM, colectadas en Tlaxiaco, Oaxaca, el 7 de diciembre de 2011 y conservadas en sobres de papel, a temperatura ambiente y en ausencia de luz hasta el momento de la siembra en 2017 y 2018.

Escarificación, desinfección y siembra de semillas

Previo al tren de desinfección, las semillas fueron escarificadas con ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4) por cinco segundos y posteriormente enjuagadas con agua destilada. Después, las semillas (Figura 3) se lavaron con detergente líquido comercial (1 mL en 50 mL de agua destilada) por 20 minutos, desinfectando con etanol al 70% (v/v) durante un minuto y con una solución de hipoclorito de sodio al 1.8% (cloro comercial al 30% v/v) durante 30 minutos; todo el tren de desinfección se realizó en agitación constante. Bajo condiciones asépticas, en una campana de flujo laminar, se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril, un minuto cada enjuague, agitando manualmente previo a la siembra en el medio de cultivo.

Los medios de cultivo, material instrumental y cristalería utilizados durante todas las etapas fueron esterilizados en una autoclave a una temperatura de 121°C y una presión de $1.5 \text{ kg}\cdot\text{cm}^{-2}$ ($20 \text{ lb}\cdot\text{pie}^{-1}$) durante 15 minutos.

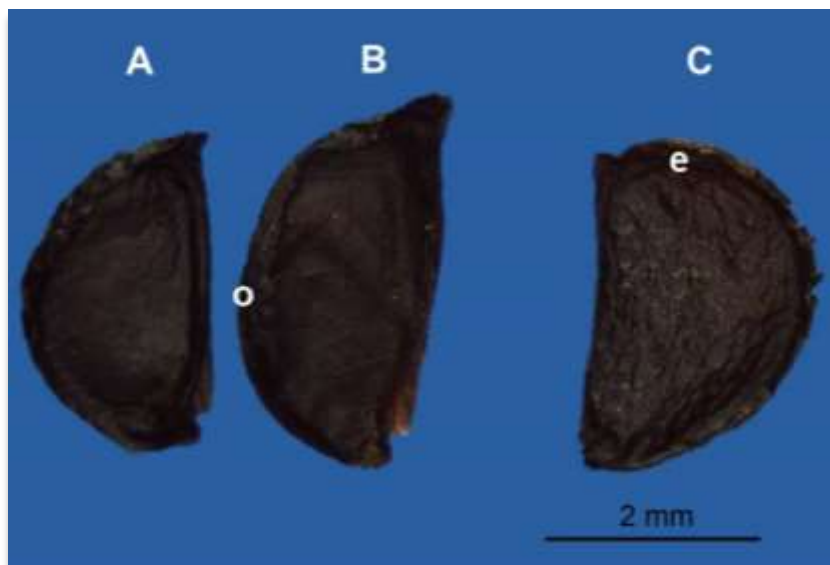


Figura 3. Semillas de *Agave kavandivi*. (A) y (C). Vista lateral. (B) Vista frontal. Se observan de color negro con engrosamiento (e) y ornamentaciones (o) en la cara convexa.

Se realizaron dos siembras, utilizando semillas que estuvieron almacenadas durante seis años; la primera la primera como control, con el fin de ensayar la técnica de desinfección superficial así como para explorar la respuesta germinativa de las semillas sin arriesgar el total del material biológico disponible. Una vez establecida la técnica de desinfección, una segunda siembra fue ejecutada añadiendo al medio de cultivo un bioestimulante (L-Arginina) probado con anterioridad en la especie trabajada, en esta siembra se utilizó el resto de las semillas disponibles (n=300), a partir de ellas se obtuvieron los datos para realizar la curva promedio de germinación.

- **Siembra 1: MS50%**

Las semillas fueron sembradas en medio MS (Murashige y Skoog, 1962) (Anexo 2) a la mitad de su concentración de macronutrientes, micronutrientes y sacarosa (azúcar comercial) (MS50%), pH 5.7-5.8 y agar bacteriológico Bioxón® 8 gL⁻¹. Un

total de 75 semillas (5 semillas por frasco), fueron sembradas el 11 de diciembre de 2017.

- **Siembra 2: MS50% + L-Arg**

Las semillas fueron sembradas en medio MS50% adicionado con L-Arginina 50 mgL⁻¹ (MS50%+L-Arg) (Sandoval-Lozano, 2017 comunicación personal). Se sembró un lote de 300 semillas divididas en tres repeticiones de 100 semillas cada una, colocando 10 semillas por frasco el 16 de enero de 2018.

Todos los cultivos fueron incubados en una cámara de ambiente controlado a 25±2°C, fotoperiodo de 16/18h luz/oscuridad y 40-45µmol m²seg⁻¹. La germinación fue evaluada diariamente (días hábiles) durante 45 días. Se registró el día de inicio de la germinación, el día en que se alcanzó el valor máximo y el porcentaje promedio. Se consideró como semilla germinada aquella en la que emergió la radícula (Moreno, 1984).

Elongación de plántulas

Pasados 49 días después de la siembra (DDS), las plántulas fueron subcultivadas en dos medios para promover su elongación: MS y MS adicionado de carbón activado 1.5 gL⁻¹ (MS+CA). Después de 15 días en estos medios, se determinó el medio más efectivo para la elongación y todas las plántulas permanecieron en este durante dos meses, antes de ser utilizadas como fuente de explante.

Obtención de explantes

Plántulas de entre cinco y siete meses de edad, con al menos 4 cm de longitud, fueron seccionadas para obtener dos tipos de explantes: secciones basales de tallos (desprovistos de raíz y hojas) y secciones basales de hojas de 3-5 mm (Figura 4). De acuerdo con la disponibilidad de material biológico, se utilizaron 45 explantes por tratamiento (9 explantes de tallo y 36 explantes de hoja) para el ensayo 1 y 60 explantes por tratamiento (10 de tallo y 50 de hoja) para el ensayo 2.

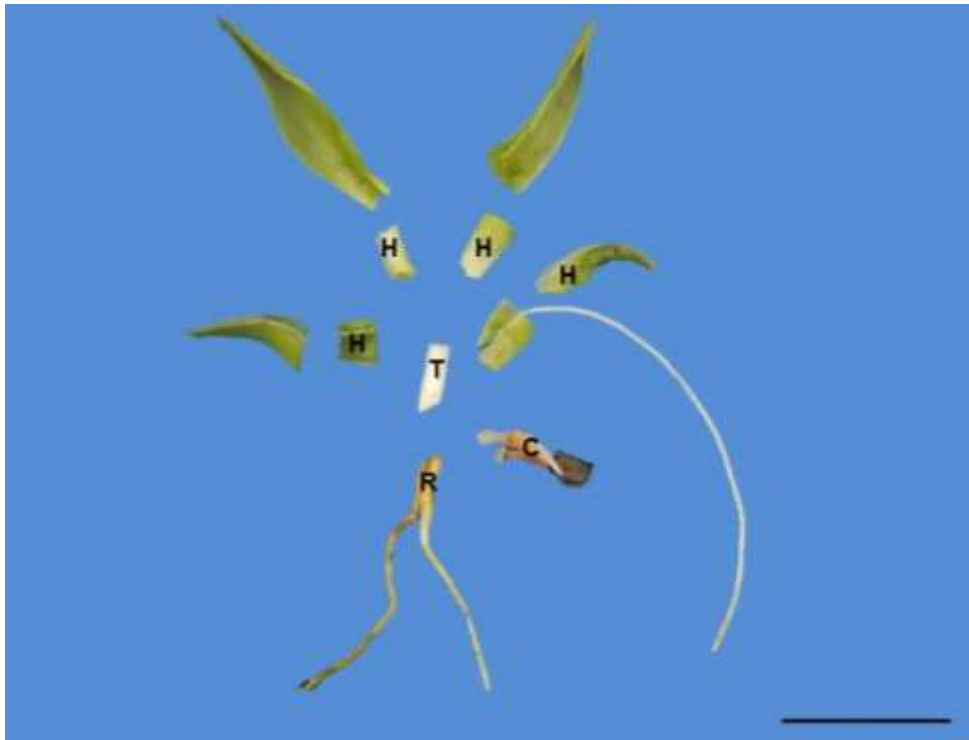


Figura 4. Cortes para la obtención de explantes de *A. kavandivi*. (T) tallo desprovisto de hojas. (H) sección basal de hoja (3-5 mm). El cotiledón (C) y la raíz (R) fueron eliminados. Barra=1cm.

Inducción de brotes

- **Ensayo 1 (MS+BA/2,4-D, 4 tratamientos)**

El medio de inducción de brotes fue el MS adicionado de la citocinina Benciladenina (BA) (0 y 1 mgL⁻¹) combinada con la auxina Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) (0, 0.1 y 0.5 mgL⁻¹) (MS+BA/2,4-D) para hacer un total de 5 tratamientos y un control (la combinación MS+BA/2,4-D 1/0.5 se descartó debido a los altos niveles de explantes oxidados en presencia de la auxina) (Tabla 5).

Tabla 5. Concentraciones citocinina/auxina BA/2,4-D para la inducción de brotes de *A.kavandivi* en el ensayo 1.

2,4-D (mgL ⁻¹)	BA (mgL ⁻¹)	
	0	1
0	0/0	1/0
0.1	0/0.1	1/0.1
0.5	0/0.5	--

- **Ensayo 2 (MS+BA/2,4-D, 7 tratamientos)**

El medio de inducción de brotes fue el MS adicionado de BA (0, 1, 2 y 3 mgL⁻¹) y 2,4-D (0 y 0.1 mgL⁻¹) para hacer un total de siete tratamientos y un control (Tabla 6). Con el fin de evitar la oxidación de los explantes, antes de la siembra fueron sumergidos por 30 minutos en una solución antioxidante de ácido cítrico + ácido ascórbico (250 mgL⁻¹ c/u) esterilizada por filtración (filtros Millipore® 0.45 µm).

Tabla 6. Concentraciones citocinina/auxina BA/2,4-D para la inducción de brotes de *A.kavandivi* en el ensayo 2.

2,4-D (mgL ⁻¹)	BA (mgL ⁻¹)			
	0	1	2	3
0	0/0	1/0	2/0	3/0
0.1	0/0.1	1/0.1	2/0.1	3/0.1

Para ambos ensayos, se sembró un explante por cada frasco tipo Gerber[®] (capacidad 120 mL) con 25 mL del medio de inducción correspondiente a cada tratamiento. Ambos tipos de explantes fueron colocados de manera vertical y sumergidos ligeramente en el medio de cultivo para conservar la polaridad de la planta.

En los explantes que presentaron contaminación bacteriana se aplicó un tren de desinfección dentro de una campana de flujo laminar con una solución estéril de Microdyn[®] (6 gotas en 50 mL de agua destilada) por 30 minutos, hipoclorito de sodio al 1.8% (cloro comercial al 30% v/v) durante 15 minutos y agua destilada estéril por 5 minutos, posteriormente los explantes desinfectados se subcultivaron en un nuevo frasco con el medio de cultivo correspondiente al tratamiento del que provenían.

Los cultivos permanecieron en el medio de inducción durante cinco meses, fueron incubados en una cámara de ambiente controlado a 25±2°C, 16/8 h luz/oscuridad y 40 μmol m²seg⁻¹ de intensidad luminosa y se observaron semanalmente para determinar las respuestas morfogénicas.

Elongación y enraizamiento de brotes

Después cinco meses en el medio de inducción, los explantes con brotes fueron subcultivados en medio sin reguladores de crecimiento (MS) para promover su elongación y enraizamiento. Aquellos brotes que se desprendieron naturalmente del explante se individualizaron y los que no se desprendieron se subcultivaron unidos al explante que les dio origen. Dos medios de elongación fueron probados: MS y MS+CA, los brotes permanecieron en el medio más efectivo durante 5 meses y fueron subcultivados durante este tiempo a medida que se terminara el medio de cultivo. En esta etapa se evaluó la longitud (cm) de los brotes, para esto fue necesario retirarlos del medio de cultivo dentro de la campana de flujo laminar y con ayuda de hojas milimétricas esterilizadas con luz ultravioleta, se tomó la medida desde la base del tallo hasta la punta de la hoja más larga (HML).

El medio de cultivo utilizado para promover la formación de raíces fue el MS+CA, los subcultivos siguientes se realizaron en MS50%+CA a manera de pre aclimatización.

Aclimatización

Etapas 1: Dentro de la campana de flujo laminar las plantas fueron extraídas de los frascos, retirando los restos de agar de las raíces con pinzas y espátula y enjuagando con agua destilada previamente esterilizada. Se colocaron en una solución de fungicida Captan 50[®] (3 gL⁻¹) por 10 minutos, el exceso de humedad fue eliminado colocando a las plantas sobre papel absorbente por 5 minutos y posteriormente fueron trasplantadas al sustrato usando pinzas y espátulas estériles. Los brotes que no formaron raíces siguieron el mismo procedimiento y

antes del trasplante se les aplicó el enraizador comercial Radix 1500[®]. Se utilizaron contenedores de plástico transparentes Reyma[®] con capacidad de 530 mL, 14 cm de alto x 9.4-5.8 cm de diámetro de la tapa-base y 1000 mL, 14.6 cm de alto x 11.8-8.8 cm de diámetro de la tapa-base, rellenos a un tercio de su capacidad con el sustrato húmedo (Figura 5). En función del tamaño de la planta se colocaron de tres a cinco plantas por recipiente, manteniéndolos durante 3-4 semanas en una cámara de ambiente controlado a 25°C y fueron tapados y sellados con película plástica adherible egapack para conservar la humedad.

Etapa 2: Después de 3-4 semanas de permanecer en la cámara de ambiente controlado, se retiró el sello egapack de los contenedores para disminuir la humedad interna y permitir gradualmente el paso del aire al interior de cada contenedor. Una vez retirado el sello de plástico las plantas sanas y vigorosas fueron llevadas a un invernadero templado (25°C) para continuar la aclimatización gradual durante tres meses y lograr su sobrevivencia. Durante este periodo se evaluó cada mes el porcentaje de sobrevivencia. Los riegos a las plantas se realizaron a capacidad de campo y a nivel de sustrato, depositando el agua directamente en la base de los tallos; para esto se utilizó agua destilada esterilizada, a partir de un mes de estar en el invernadero las plantas se regaban semanalmente, pasados tres meses se ejecutaban cada dos semanas y después del tercer mes solo se regaba con agua corriente cada tres semanas. Otras labores culturales fueron la eliminación de hojas con rasgos de pudrición y la aplicación de fungicida en plantas contaminadas por hongos.

Las plantas que no presentaron un aspecto vigoroso o tamaño suficiente para el trasplante permanecieron en la cámara de ambiente controlado hasta que cumplieran las características adecuadas para continuar con su aclimatización.

Las plantas provenientes del ensayo 1 fueron trasplantadas en dos diferentes sustratos: peat moss+agrolita (1:1) y tepojal+tierra negra (1:1), con el fin de determinar cuál favorecía el mayor porcentaje de sobrevivencia. Una vez determinado el sustrato más efectivo, las plantas provenientes del ensayo 2 fueron trasplantadas a este (Figura 6).

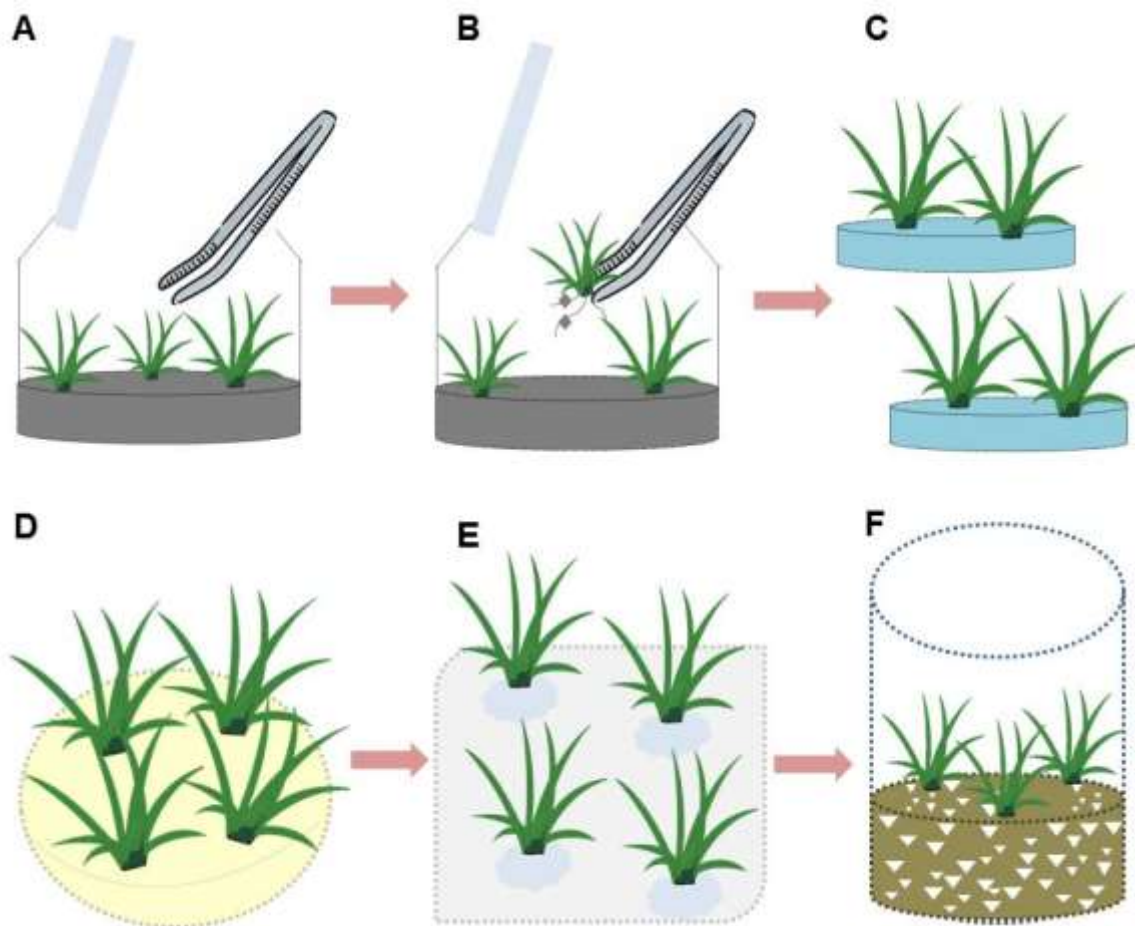


Figura 5. Procedimiento para la aclimatización de *Agave kavandivi*. (A) Extracción de los brotes. (B-C) Eliminación de los restos de agar con agua destilada esterilizada. (D) Brotes sumergidos en solución fungicida Captan 50[®]. (E) Eliminación del exceso de humedad en papel absorbente. (F) Trasplante al sustrato húmedo.

En la figura 6 se resume el procedimiento para la propagación *in vitro* de *A. kavandivi* desde el establecimiento del cultivo *in vitro* hasta la aclimatización.

Análisis estadístico

Germinación: Después de 45 días de monitoreo de la germinación de las semillas, se evaluó el efecto de los dos tratamientos del cultivo: MS50% y MS50%+L-Arginina sobre el porcentaje de germinación. Para esto se empleó el modelo lineal

generalizado (GLM) con distribución binomial y funciones de enlace logit utilizando el paquete nlme en el programa R Studio 4.0.2. Los modelos lineales generalizados se utilizan para evaluar las relaciones entre predictores y la variable respuesta, dando una descripción del predictor lineal y de la distribución de errores y resultan adecuados cuando estos no toman distribuciones normales (Hastie y Pregibon, 1992). Para visualizar el efecto de los tratamientos sobre la capacidad germinativa, se realizó un gráfico de barras, en donde se observa el porcentaje final de germinación (González-Zertuche y Orozco-Segovia, 1996).

Con el fin de determinar no solo el porcentaje final de germinación en cada tratamiento sino además el efecto en el tiempo y el modo de germinación entre ambos (MS50% y MS50%+L-Arginina), se compararon las curvas de germinación en función del tiempo utilizando la función “diffslope2” del paquete simba (Nekola y White, 1999), que compara la diferencia entre el parámetro de las pendientes de la regresión lineal ajustada para los porcentajes de germinación en función del tiempo para cada tratamiento. Este método permite comparar la diferencia observada entre las pendientes de cada tratamiento con las distribuciones de valores permutados. Se realizó la gráfica de germinación acumulada por intervalos de tiempo, que muestra su tiempo de inicio, la máxima capacidad de germinación y el tiempo (días) en que se alcanza, así como la forma en que se incrementa la germinación (González-Zertuche y Orozco-Segovia, 1996).

Ensayos de inducción: A partir de los porcentajes de respuesta de cada tipo de explante registrados en los primeros tres meses de inducción, se determinaron las respuestas morfogénicas predominantes. Para conocer la distribución de los

datos y elegir las pruebas a utilizar, se realizó el análisis de normalidad de Kolmogorov-Smirnov y la prueba de homogeneidad de varianzas de Levene.

Para determinar la concentración de RCV que regeneró el mayor número de brotes por explante (b/exp), a los cinco meses de inducción se comparó el número promedio de brotes por explante (b/exp) por tratamiento mediante la prueba de Kruskal-Wallis ($\alpha=0.05$).

Para determinar el explante más regenerativo, se compararon los promedios de b/exp por cada tipo de explante (hoja y tallo) mediante una prueba de t para medias de dos muestras emparejadas ($\alpha=0.05$).

Elongación y enraizamiento: Al término de la etapa de elongación y enraizamiento se evaluó la longitud promedio de los brotes (midiendo desde la base del tallo hasta la punta de la hoja más larga), el porcentaje de enraizamiento y la longitud promedio de las raíces. Se realizó una prueba de t para medias de dos muestras emparejadas con el fin de detectar diferencias significativas entre estos valores por cada tipo de explante (hoja y tallo).

Aclimatización: A los tres meses de aclimatización se registró el porcentaje de sobrevivencia en los dos diferentes sustratos (peat moss+agrolita y tepojal+tierra negra), el sustrato con el mayor porcentaje se consideró el más efectivo.

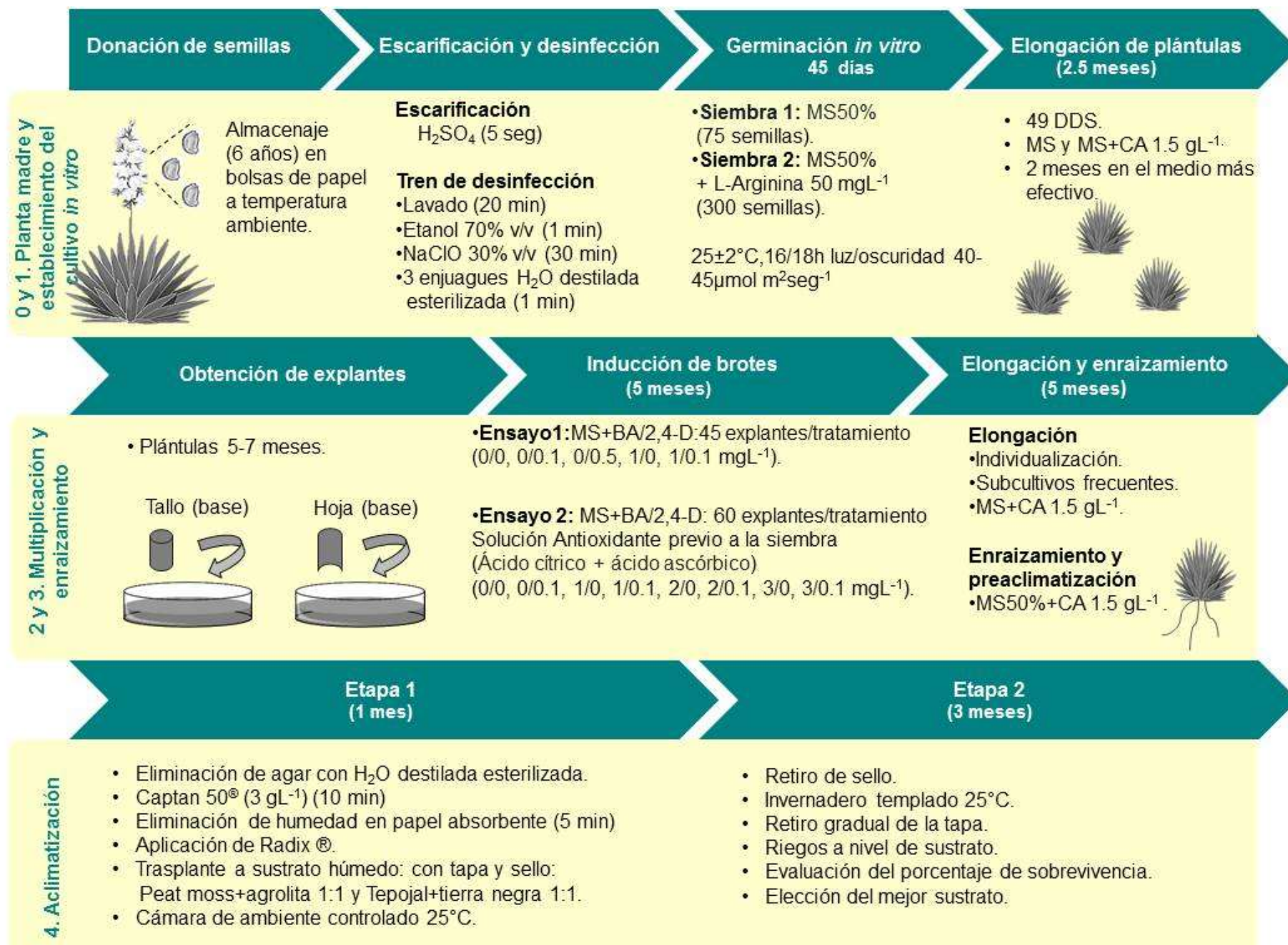


Figura 6. Diagrama general del procedimiento para la propagación *in vitro* de *Agave kavandivi*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Escarificación, desinfección y germinación de semillas

El método de desinfección de semillas fue efectivo, no se presentó contaminación en el medio de cultivo de germinación. Por otra parte, la escarificación realizada previa a la siembra no contribuyó totalmente al aumento de los porcentajes de germinación (Figura 7).

- **Siembra 1: MS50%**

Después de 45 días el porcentaje de germinación en MS50% alcanzó el 8% (Figura 7). La germinación a los cinco DDS, alcanzando el máximo (8%) al día 36 (Figura 8 y 9A) y el 33.3% de las plántulas se oxidaron.

- **Siembra 2: MS50% + L-Arg**

Con base en los resultados anteriores, y en las pruebas preliminares realizadas por Sandoval-Lozano (comunicación personal, 2017), la curva de germinación promedio se realizó utilizando el medio MS50%+L-Arg 50 mgL⁻¹ con la finalidad de conocer si el aminoácido L-Arginina podría estimular la germinación. Al utilizar este medio, la germinación alcanzó el 11% (Figura 7), inició a los cuatro DDS, alcanzando el valor máximo (11%) a los 19 días (Figura 8 y 9B) y un 45% de plántulas oxidadas.

En relación con el porcentaje final de germinación en los dos medios de cultivo (Figura 7), el análisis de distribución binomial no mostró diferencias significativas entre éstos ($z = -0.754$; $p = 0.448$), sin embargo, existe una mayor tendencia de germinación en el medio MS50%+L-Arginina. Para detectar diferencias estadísticamente significativas, probablemente se requieren más estudios con mayor tamaño muestral para evaluar el efecto final de ambos tratamientos.

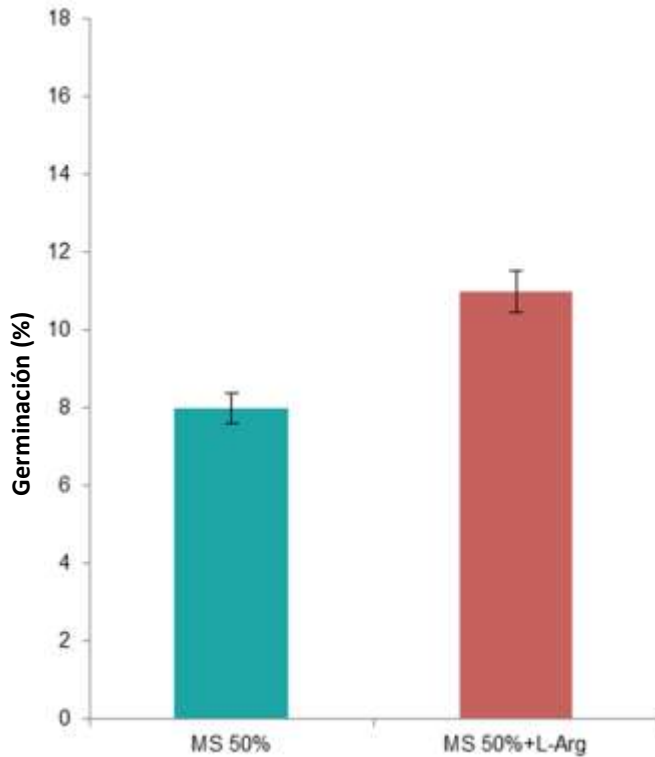


Figura 7. Porcentaje de germinación de *A. kavandivi* en medio de cultivo MS 50% y MS 50%+L-Arg después de 45 días de monitoreo.

En la figura 8 se comparan las curvas de germinación de ambos tratamientos, se observa que la presencia de L-Arginina, promovió la germinación de las semillas un día antes que en el medio MS50%, así mismo el porcentaje de germinación máximo se incrementó en un 3% y se alcanzó en menor tiempo, por otra parte, el porcentaje de plántulas oxidadas se elevó del 33.3% (MS50%) al 45% en el medio con el aminoácido.

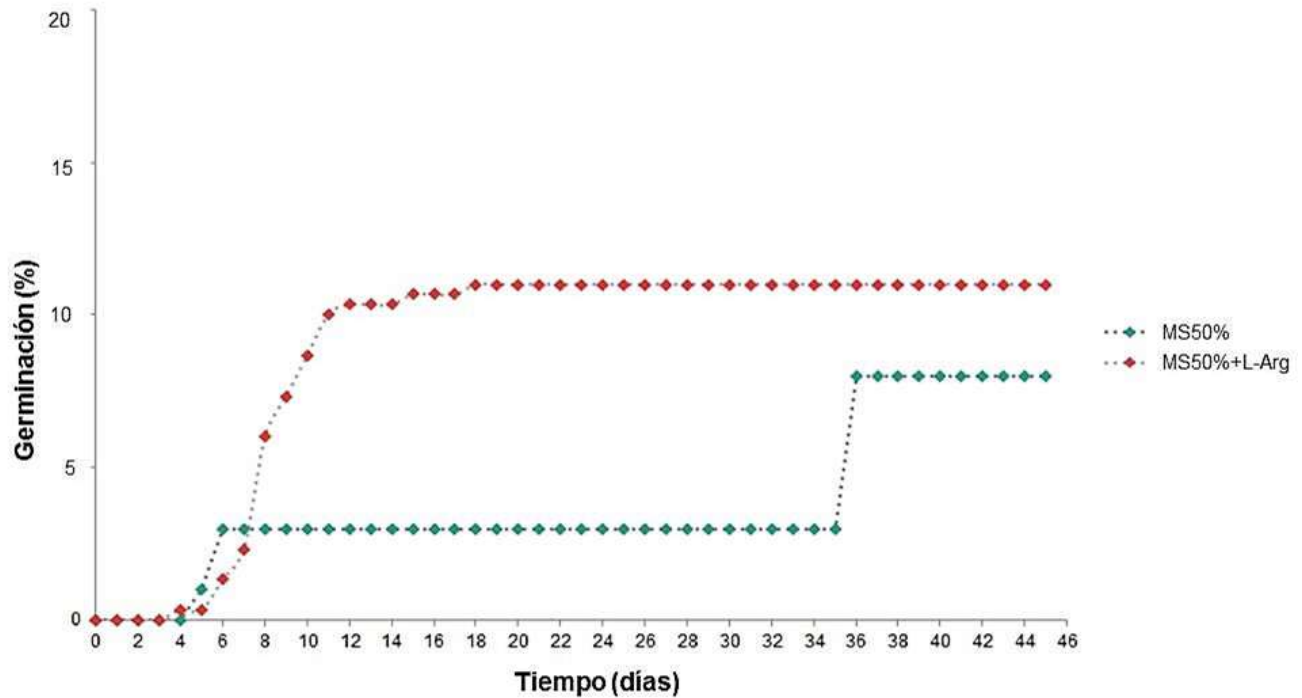


Figura 8. Comparación de las curvas de germinación acumulada *in vitro* de *A. kavandivi*. En MS50% se obtuvo un máximo de 8% a los 45 días y en MS50%+L-Arg el 11% a los 19 días.

La capacidad de germinación en función del tiempo, que se evaluó mediante la comparación de las pendientes de ambas curvas de germinación, mostró diferencias significativas, donde el medio MS50%+L-Arginina favoreció la velocidad de germinación un 30% más que el medio MS50% (Figura 9). Esto corrobora las pruebas realizadas por Sandoval-Lozano en 2017, en las que se alcanzó un valor máximo en menor tiempo en el medio con L-Arginina (31%) en comparación con el medio MS50% (18.5%).

Con base en los resultados de velocidad de germinación se determinó que el medio MS50%+L-Arginina fue el más efectivo para la germinación *in vitro* de semillas *A. kavandivi*, al promover el máximo porcentaje de germinación en menor tiempo.

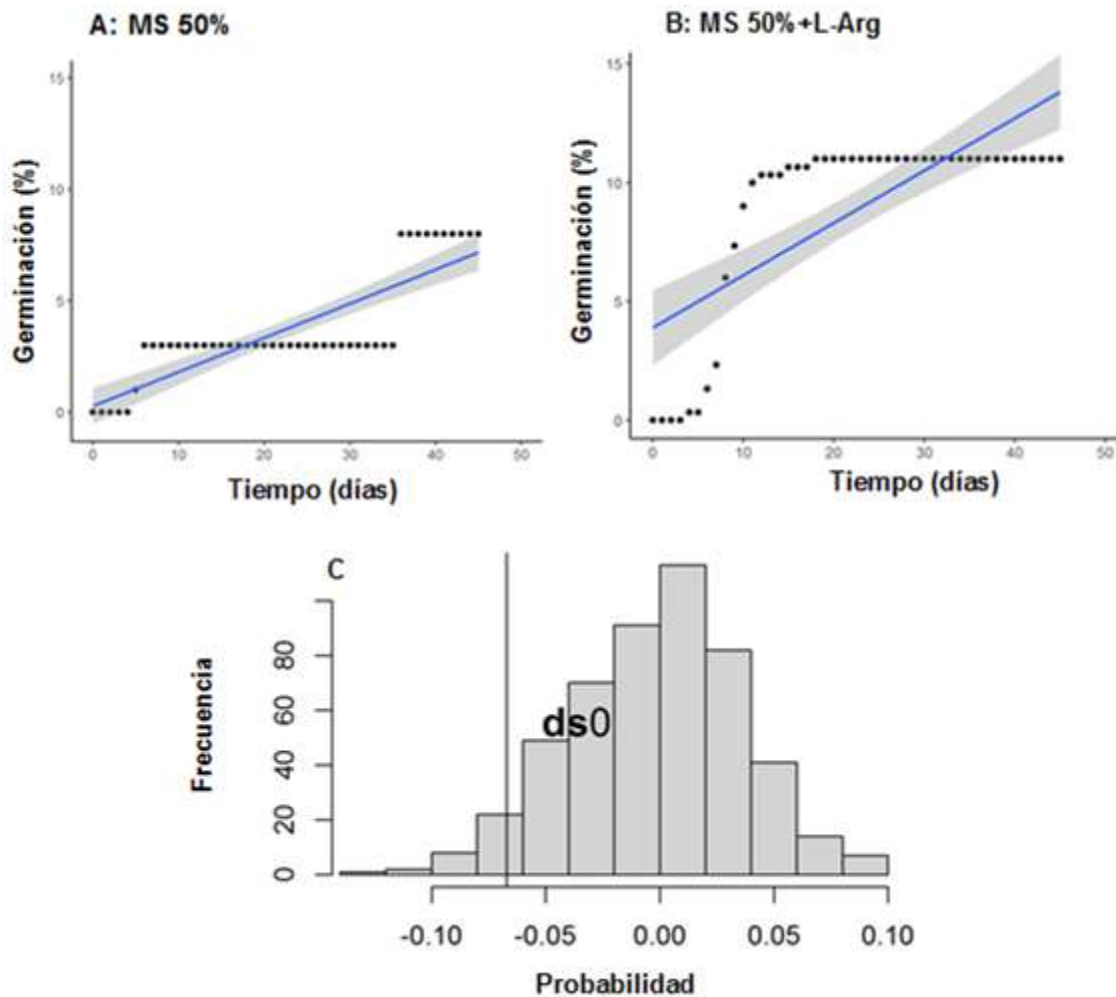


Figura 9. Comparación de pendientes de las curvas de germinación acumulada de *A. kavandivi* en (A) medio MS50%. DS=1.79 E=0.20 y (B) MS50%+L-Arginina 50 mgL⁻¹. (C) La comparación de las pendientes evaluada a partir de 500 permutaciones, mostró diferencias significativas $ds < -0.05$.

Barry y Barry (1989) mencionan que de manera general, durante la germinación, los cotiledones requieren de arginina en un 72% para la síntesis de proteínas, es generada mediante biosíntesis *in situ*, su efecto se atribuye al alto contenido en nitrógeno que favorece la formación de aminoácidos y proteínas durante la germinación; por otra parte se sabe que este aminoácido actúa como un bioestimulante que promueve la síntesis de poliaminas, quienes también estimulan la germinación (Winter *et al.*, 2015), por lo tanto es probable que la

arginina incorporada al medio de cultivo de *A. kavandivi* haya promovido la germinación de un mayor número de semillas en menor tiempo, sin embargo el que no se hayan detectado diferencias significativas en el porcentaje total de germinación, puede ser indicio de que otros factores independientes al medio de cultivo estén impidiendo la germinación.

Uno de estos factores es la viabilidad de las semillas, a pesar de que en el género *Agave* la producción de semillas es alta, Arizaga y Ezcurra (2002) señalan que la proporción de semillas viables es menor al 50%, esto podría explicar el bajo porcentaje de germinación obtenido en los dos ensayos de germinación de *A. kavandivi*. No obstante, los estudios de germinación dentro del género *Agave* muestran cifras contrastantes, Nobel (1996) reportó que en *A. tequilana* el porcentaje de germinación fue del 4-6%, en *A. angustifolia* subsp. *tequilana* se alcanzó un 26% (Niño Vázquez, 2013), mientras que en *A. durangensis* fue del 94-96% (Orea-Lara *et al.*, 2006). Es probable que el bajo porcentaje de germinación en *A. kavandivi* se debió a la falta de viabilidad de las semillas, considerando que éstas fueron colectadas el 7 de diciembre de 2011, almacenadas a temperatura ambiente y sembradas *in vitro* seis años después (4 de diciembre de 2017 y 16 de enero de 2018). Lo anterior fue corroborado por Sandoval Lozano (2017, comunicación personal), quien realizó pruebas de viabilidad para las semillas de esta especie con una solución de cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio al 0.5% y en las que obtuvo sólo el 26.6% de semillas viables, el 13.4% de embriones no viables, el 30% de semillas con embriones secos y el 30% vacías (Figura 10). Para detectar diferencias en el porcentaje de germinación en diferentes medios de cultivo, se sugiere incrementar el tamaño muestral, así como evitar periodos largos de almacenamiento (más de seis años) en busca de reducir el riesgo de pérdida de viabilidad y obtener un mayor número de plántulas.



Figura 10. Aspecto de los embriones de *A. kavandivi* después de 24 horas en una solución al 0.5% de cloruro de tetrazolio. (A) Embrión viable (tinción total). (B) Embriones parcialmente viables (tinción 50-70%). (C) Embrión no viable (tinción \leq 50%). (D) Embriones muertos (Imágenes de Karla Miriam Sandoval Lozano). Barras= 1 mm.

Germinación y desarrollo de plántulas

Durante la germinación *in vitro* de semillas de *A. kavandivi* se dio seguimiento de las etapas de desarrollo de las plántulas. El surgimiento de la radícula se observó a los cuatro días y entre los días 13 y 24 el crecimiento del cotiledón; posterior al día 24 fue evidente la primera hoja y al día 45 la plántula ya alcanzaba 1-1.5 cm de longitud desde la base del tallo hasta la hoja más larga (HML) (Figura 11).

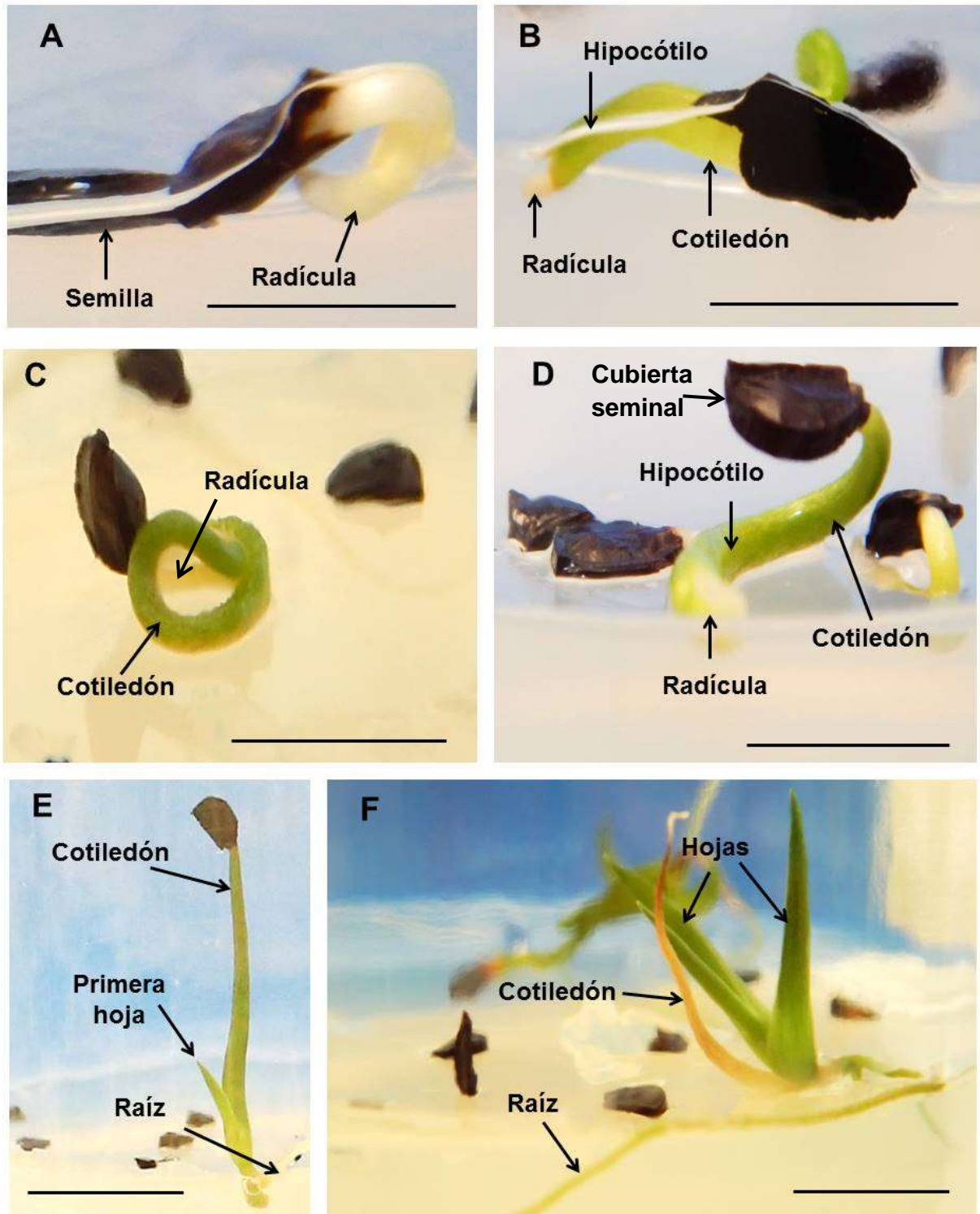


Figura 11. Germinación *in vitro* de *Agave kavandivi*. A los cuatro días emergió la radícula (A) y posteriormente se observó el desarrollo del hipocótilo y la primera sección del cotiledón a los 13 días (B). Entre los 16 y 24 días, el cotiledón se elongó (C y D) y la cubierta seminal permaneció en la punta. Al día 30, fue evidente la primera hoja e inició el desarrollo de la raíz. (E) A los 45 días el cotiledón se observó seco, la plántula con al menos dos hojas y una raíz principal desarrollada (F). Barras= 1 cm.

Oxidación de plántulas

La oxidación fue un problema observado desde etapas muy tempranas de la germinación, así como en el crecimiento y desarrollo de las plántulas (Figura 12). Esto representó un problema grave para el establecimiento *in vitro* de *A. kavandivi* y para controlarlo, las plántulas que presentaron signos de oxidación se subcultivaron del medio MS50% al medio MS y MS+CA 1.5 gL⁻¹; la oxidación se controló en este último, sin embargo, no todas las plántulas subcultivadas completaron su desarrollo. Para futuros trabajos se sugiere someterlas a un tratamiento con una solución antioxidante estéril de ácido cítrico y ácido ascórbico, tal y como se reportó para cultivos de embriones de *Picea chihuahuana* (Pinaceae) (Olguín-Santos, 2012; López-Escamilla, 2000).



Figura 12. Aspecto de los tejidos oxidados durante la germinación *in vitro* de semillas de *A. kavandivi* (A y B). Plántulas con desarrollo incompleto (C y D) y plántulas que lograron completar su desarrollo en el medio MS50%+CA (E y F). Barras= 1 cm.

La incorporación del carbón activado (CA) en el medio de cultivo disminuyó el deterioro de los tejidos y, por lo tanto, permitió obtener un mayor número de plántulas disponibles como fuente de explante, esto se atribuye a que el CA actúa como adsorbente al remover compuestos fenólicos, que en esta etapa posiblemente surgieron del proceso de esterilización del medio de cultivo o fueron liberados por las plántulas (Azofeifa, 2009). Por otra parte, un estudio realizado por Fridborg *et al.* (1978) empleando espectrometría de masas, demostró la presencia de ácido fenilacético (PAA) y ácido hidroxibenzoico en muestras de medio de cultivo de *Daucus* sin carbón activado. Las muestras en que se añadió carbón activado no presentaron ninguna de estas sustancias ni compuestos fenólicos. Es posible que los compuestos fenólicos que se oxidan, por sí mismos no sean responsables de la inhibición de la morfogénesis, pero su presencia podría bloquear alguna vía biosintética necesaria para el desarrollo normal de nuevos órganos.

Elongación de plántulas

Pasados los 49 días después de la siembra el CA, además de controlar la oxidación de los tejidos, estimuló la elongación de las plántulas, observándose una diferencia de 3 cm en la longitud de las plántulas que fueron subcultivadas en MS+CA 1 mgL⁻¹ respecto de las que se transfirieron en MS, en un periodo de 15 días (Figura 13), por lo tanto, se determinó que el medio más efectivo para la elongación fue MS+CA 1 mgL⁻¹ y todas las plántulas permanecieron en éste durante dos meses. Pedroza-Manrique (2009) observó resultados similares al añadir CA en concentraciones del 0.5% y 1% en el medio de cultivo para el desarrollo de protocormos de *Epidendrum elongatum* (Orchidaceae), éstos mostraron una tasa media de crecimiento mayor en comparación con aquellos tratamientos donde no se empleó. Pan y van Staden (1998) señalaron que el CA puede ser utilizado como promotor o inhibidor del crecimiento *in vitro*, en función de la especie y tipo de explante porque oscurece

al medio de cultivo, adsorbe inhibidores, reguladores de crecimiento o libera sustancias promotoras de crecimiento.

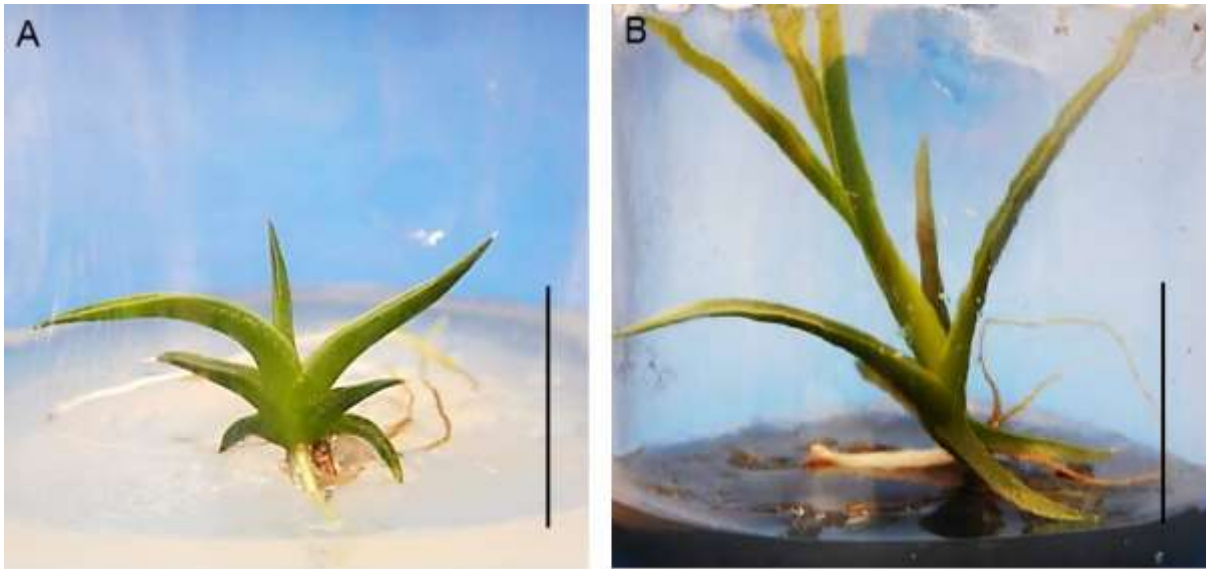


Figura 13. Plántulas de *A. kavandivi* de tres meses de edad, en el medio de elongación. (A) Medio MS, barra=1 cm. (B) Medio MS+CA. Barra= 2 cm.

Hiperhidricidad

La hiperhidricidad es un problema asociado a los cultivos *in vitro*, en *A. kavandivi* se presentó como un evento esporádico en una de las plántulas a los dos meses de cultivo en medio MS. Los tejidos de la plántula se observaron turgentes y translúcidos, de éstos comenzaron a formarse brotes (Figura 14) que también se hiperhidrataron y se les dio seguimiento hasta su aclimatización.

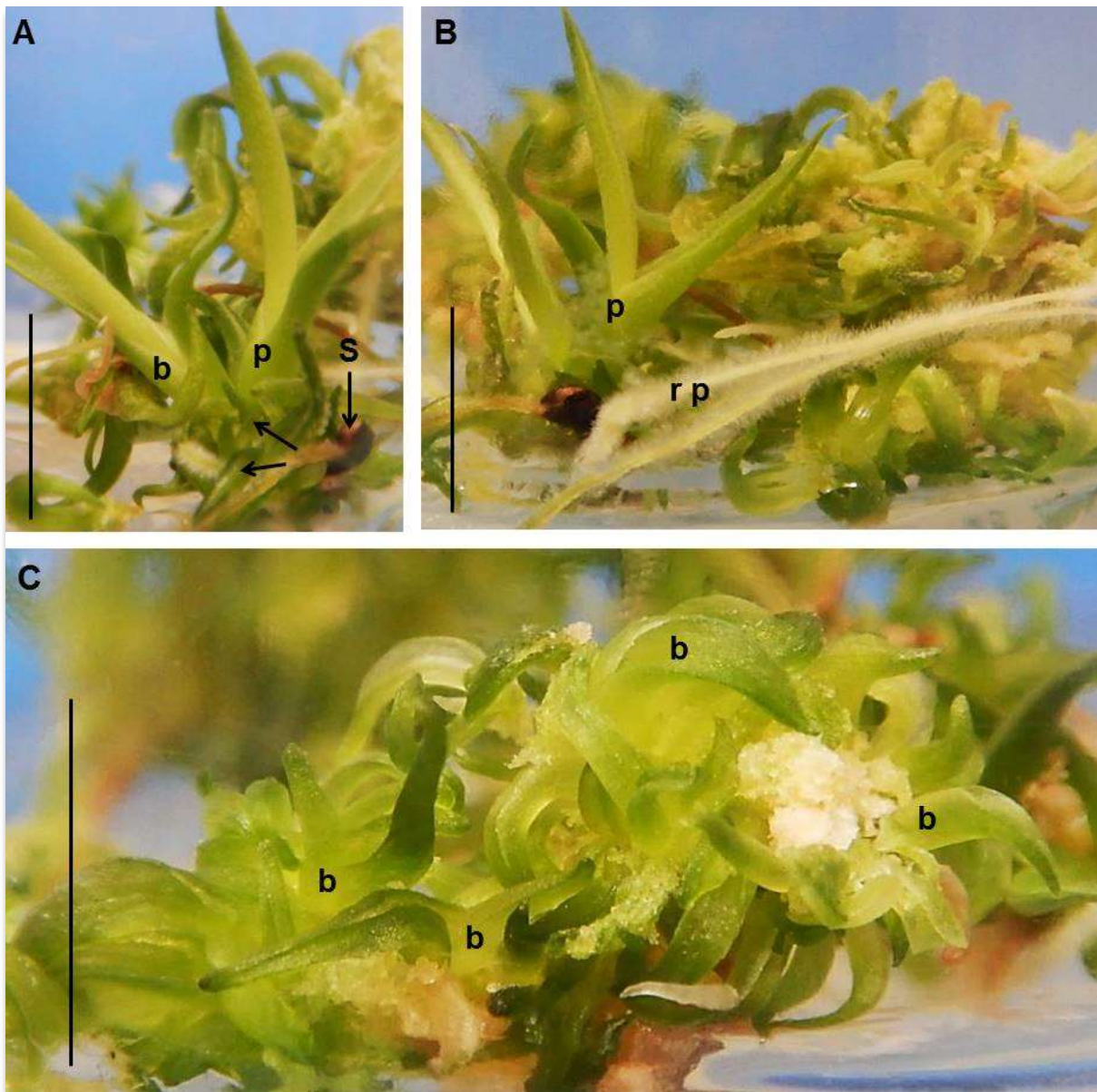


Figura 14. (A) Plántula de *A. kavandivi* (p) germinada *in vitro* a partir de semilla (s), que desde su base formó un brote (b) y posteriormente estructuras muy pequeñas similares a brotes (←). (B) La plántula inicial continuó su desarrollo, se observó el crecimiento de la raíz y pelos radicales (rp) por encima del medio de cultivo. (C) Aspecto vítreo de los brotes hiperhidratados (b) que se formaron a partir de la plántula a los dos meses de cultivo en medio MS. Barras= 2 cm.

Inducción de brotes

- **Ensayo 1** (MS + BA/2,4-D, 4 tratamientos)

A los dos meses de inducción se presentaron severos problemas de oxidación y contaminación bacteriana. La contaminación provocó la pérdida del 40-80% de los explantes

de los diferentes tratamientos de este ensayo, posiblemente fue provocada por bacterias sistémicas, quienes surgieron después de dos meses en los cultivos aparentemente asépticos. Para controlar la contaminación de los explantes se realizó el tren de desinfección correspondiente (solución estéril de Microdyn®, hipoclorito de sodio y agua destilada estéril) bajo condiciones asépticas.

La oxidación de los explantes representó el problema más grave para el establecimiento del cultivo *in vitro* (Figura 15), se presentó en la mayoría de los tratamientos, alcanzó el 50% del total de los explantes, disminuyendo considerablemente la potencial respuesta a la formación de brotes. El porcentaje de explantes oxidados de hoja fue de 33-50%, alcanzando el mayor porcentaje en los tratamientos 0/0.5 y 1/0.1, mientras que en los explantes de tallo fue de 11-25%, con el mayor porcentaje en los tratamientos con auxinas.

En ambos tipos de explantes, el tratamiento control presentó el menor porcentaje de explantes oxidados seguido del tratamiento 1/0, los altos porcentajes de explantes oxidados pudieron ser ocasionados por diferentes factores, por una parte el efecto de los RCV añadidos, en particular la auxina, prueba de esto es que los menores porcentajes ocurrieron en ausencia de ésta y, por otra parte, compuestos fenólicos presentes en los tejidos del explante o que se liberaron durante la disección de éstos.

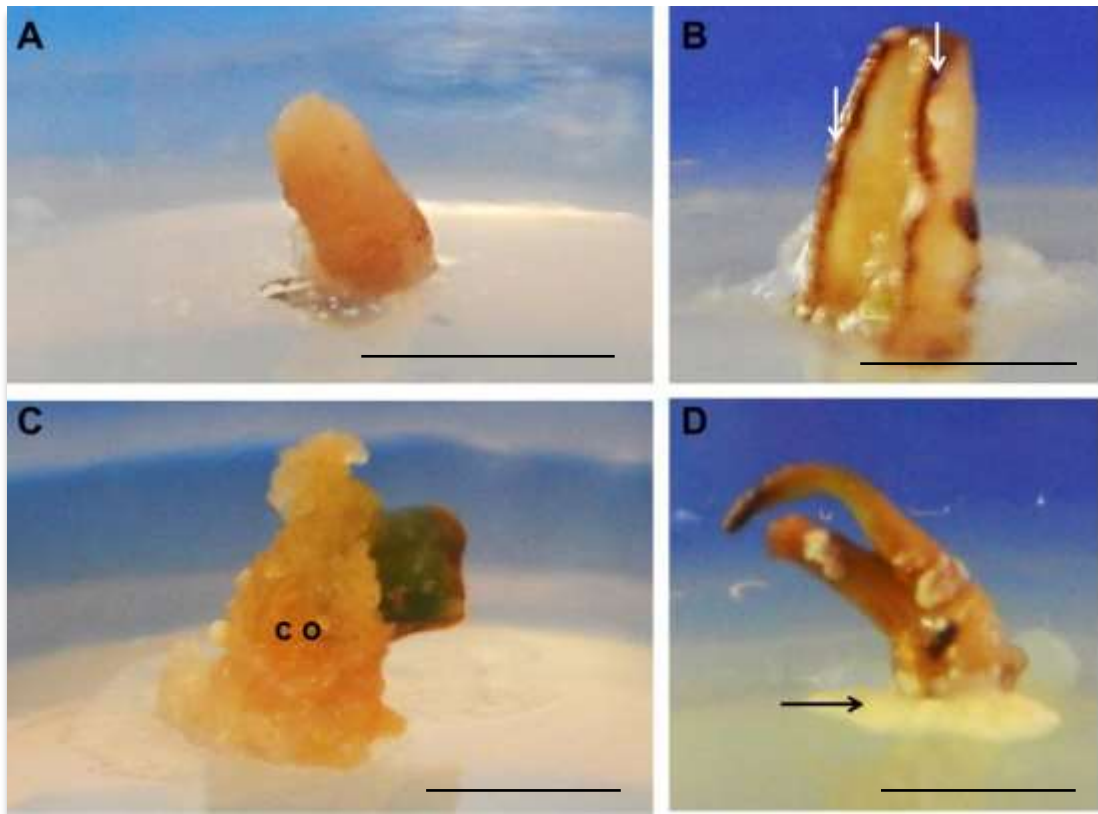


Figura 15. Explantes oxidados de hoja en MS+BA/2,4-D 1/0 (A) y 1/0.1 (B) con bordes necrosados (\downarrow), después de dos meses de cultivo. (C y D) Explantes oxidados de tallo en 0/0.5, el callo formado se oxidó (co), algunos explantes oxidados presentaron simultáneamente contaminación bacteriana (\rightarrow). Barras= 1cm.

El tipo de explante también influye en el nivel de oxidación de éste, Manjula *et al.* (1997) reportó que durante el cultivo *in vitro* de *Aristolochia indica*, la lixiviación de polifenoles en las hojas afectó el crecimiento de los brotes *in vitro* al provocar oxidación, por otra parte la edad fisiológica del explante puede tener un efecto en el nivel de oxidación, tal como se ha reportado en explantes de hoja de *Coffea* spp., en donde la mayoría de los explantes presentaron valores de oxidación mayores a 60%, siendo inferiores a 45% en los explantes provenientes de hoja joven y de 2-60% en hoja inmadura (López-Gómez *et al.*, 2010). En el caso de *A. kavandivi*, el mayor porcentaje de explantes oxidados (30-50%) se presentó en los explantes de hoja con respecto al registrado en los tallos (10-25%), de manera similar a lo reportado con explantes de *Agave parviflora* (Anaya-Dyck *et al.*, 2010). Thomas (2008) reporta que, durante la micropropagación, la exudación de fenoles en los explantes es muy común y a

menudo influye en la capacidad regenerativa de los mismos, pero la adición de CA en el medio de cultivo y el aumento de la frecuencia de subcultivos reducen el efecto negativo de la oxidación, sin embargo, en la etapa de inducción de brotes no es recomendable añadir CA al medio de cultivo para controlar la oxidación por la presencia de los reguladores del crecimiento. Debido a la considerable pérdida de explantes en *A. kavandivi*, resultó necesario realizar un segundo ensayo en el que se puso a prueba el uso de una solución antioxidante como medida para disminuir la oxidación.

Respuestas morfogénicas

Las respuestas morfogénicas predominantes fueron: organogénesis directa a partir de explantes de hoja y tallo y organogénesis indirecta a partir de los explantes de hoja. La formación de brotes en ambos tipos de explante se caracterizó por el surgimiento de pequeños nódulos en su base a partir de los 40 días en el medio de inducción, los cuáles se desarrollaron en primordios de brotes, mismos que posteriormente se elongaron en brotes (Figura 16).

Después de tres meses en el medio de inducción se determinó el porcentaje de explantes que formaron brotes (tallos sin raíz). Se consideró la formación evidente de brotes y/o callo y se obtuvieron los porcentajes por cada tratamiento, así mismo se registraron las “plantas regeneradas” (explantes de tallo que volvieron a generar hojas a partir de su ápice y continuaron su desarrollo análogo al de plántulas). En el tratamiento 0/0.5 no se obtuvo respuesta en ninguno de los dos tipos de explante debido a que todos los explantes se oxidaron.

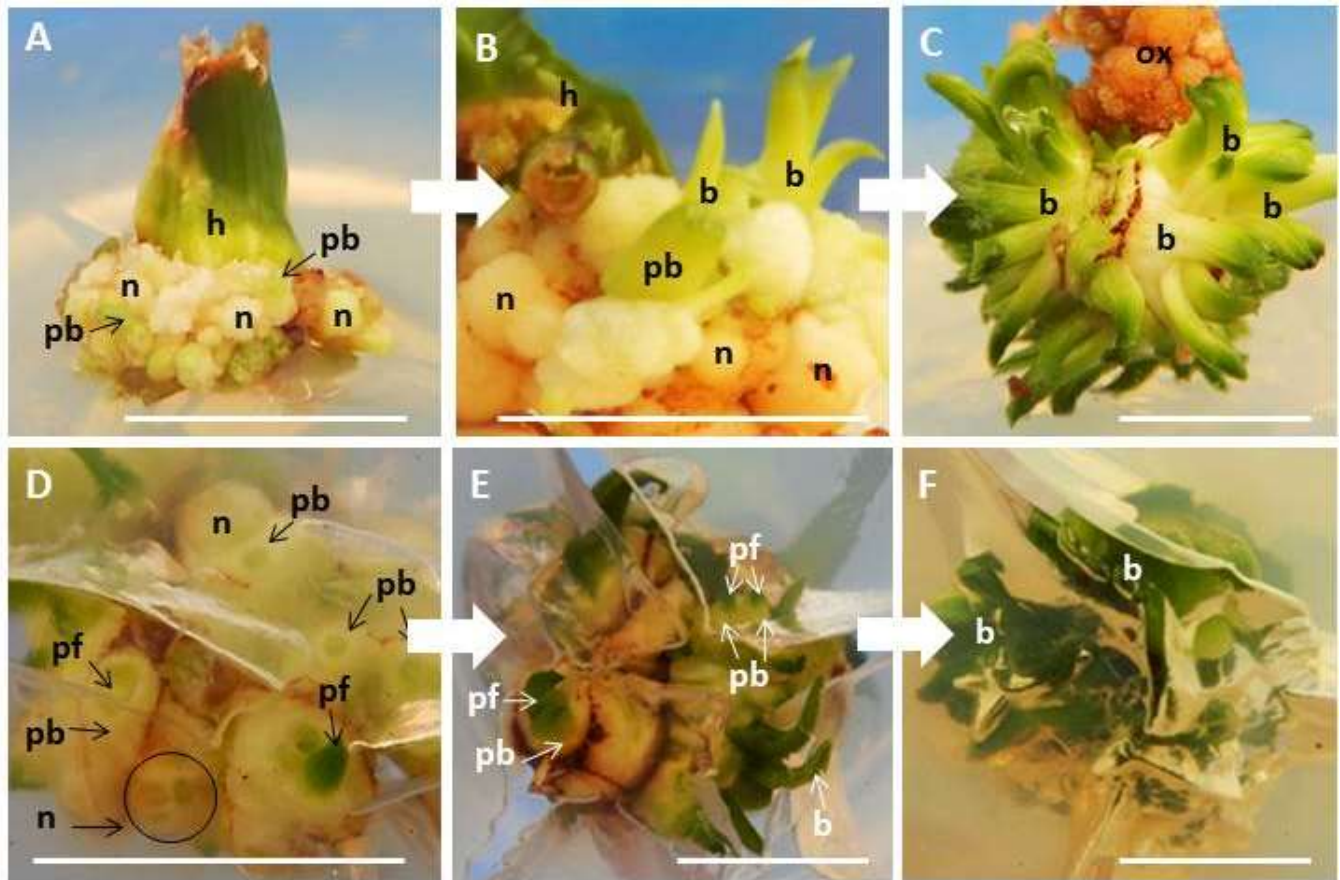


Figura 16. Secuencia del desarrollo de brotes (**b**) de *A.kavandivi* en MS+BA/2,4-D entre los 40 días y dos meses de inducción. (**A-C**) Cambios observados en la base del explante sobre el medio de cultivo. (**D-F**) Cambios observados en la base del explante a través del medio de cultivo. Los nódulos (**n**) surgieron en la base del explante, éstos dieron lugar a primordios de brotes (**pb**). El ápice de los primordios de brote se observa como un pequeño círculo de color verde claro que contrasta con el color blanquecino de los nódulos (**D**); de estos ápices surgieron los primordios foliares (**pf**) que finalmente se elongaron en las hojas dispuestas en roseta de los brotes (**b**). Barras= 0.5 cm.

Explantos de hoja

- Organogénesis directa

La formación de brotes ocurrió a partir del día 40 en el medio de inducción, éstos comenzaron a formarse en la base del explante a partir de una masa de células que se desarrolló por debajo del medio de cultivo y de la que posteriormente surgieron diminutas protuberancias que se fueron alargando; simultáneamente se comenzaron a formar pequeñas hojas dispuestas en forma de roseta. Después de cuatro meses en el medio de inducción, se desarrollaron más brotes que cubrieron por completo el explante, mismos que se formaron predominantemente por organogénesis directa en 1/0 (Figura 17).

- Organogénesis indirecta

En 1/0.1, los tejidos de los explantes de hoja comenzaron a desorganizarse ligeramente en la parte media superior, formando callo del que comenzaron a surgir pequeños brotes por organogénesis indirecta. Posteriormente el callo comenzó a cambiar de color mostrando signos de oxidación (Figura 18).

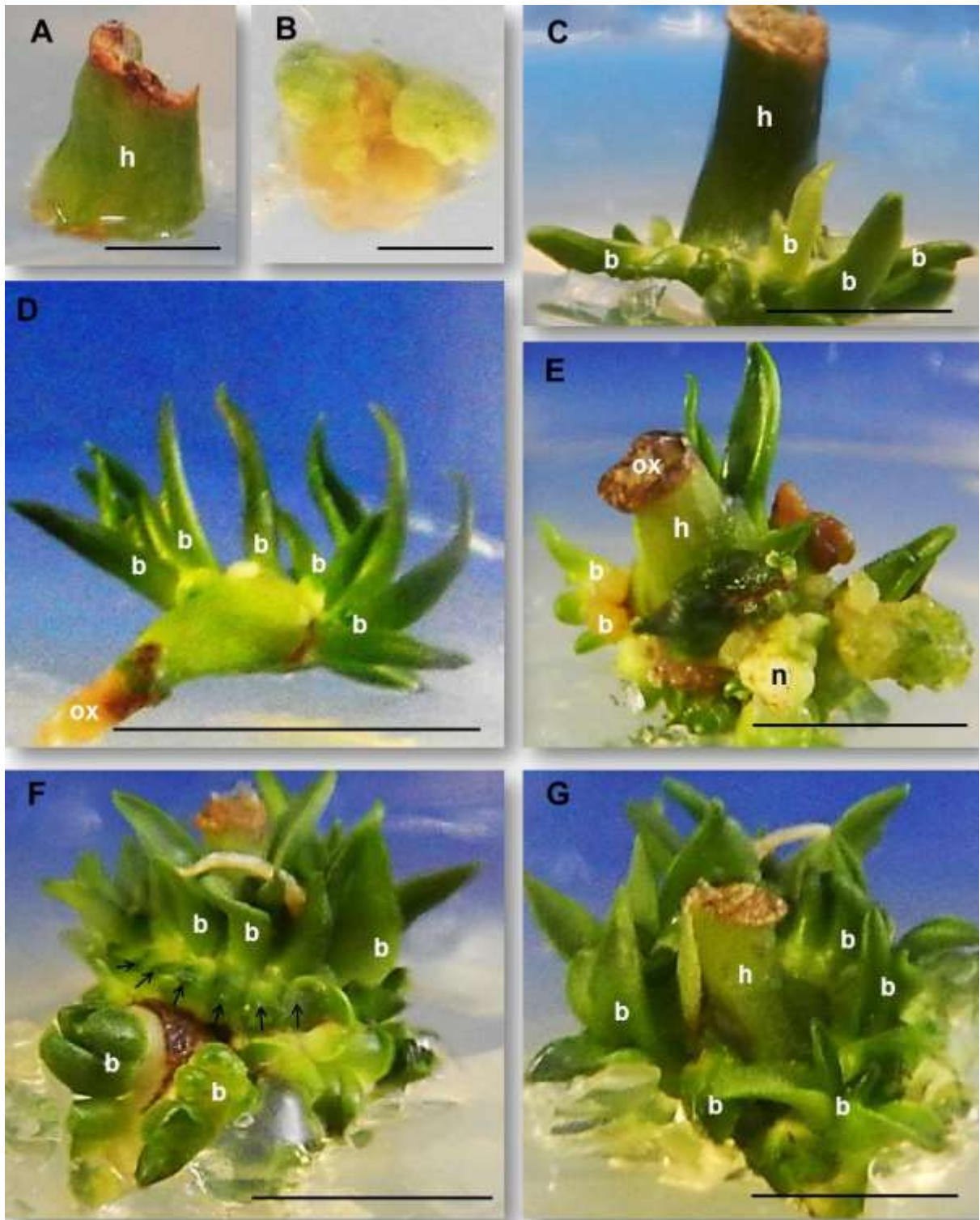


Figura 17. Desarrollo de brotes por organogénesis directa en explantes de hoja (**h**) de *A.kavandivi* en MS+BA/2,4-D 1/0 mgL⁻¹. (**A**) Desde la primera semana de cultivo, los explantes se ensancharon en la base y se presentó oscurecimiento en la zona del corte. (**B**) A partir de las tres semanas se observó el desarrollo de tejido en la base del explante (vista a través del medio de cultivo); (**C** y **D**) a los 40 días de inducción se observaron diminutos brotes (**b**) dispuestos en forma de roseta que surgieron del tejido de la base. (**E**) A los 40 días fue evidente el crecimiento y el ensanchamiento de la base del explante, éste dejó de tener contacto directo con el medio y comenzaron a surgir protuberancias nodulares (**n**), a su vez el ápice del explante se oxidó ligeramente (**ox**). (**F** y **G**) A los dos meses de inducción, los primeros brotes (**b**) se elongaron y la base de la hoja continuó desarrollando más brotes (↑) que rodearon al explante. Barras= 0.5 cm.

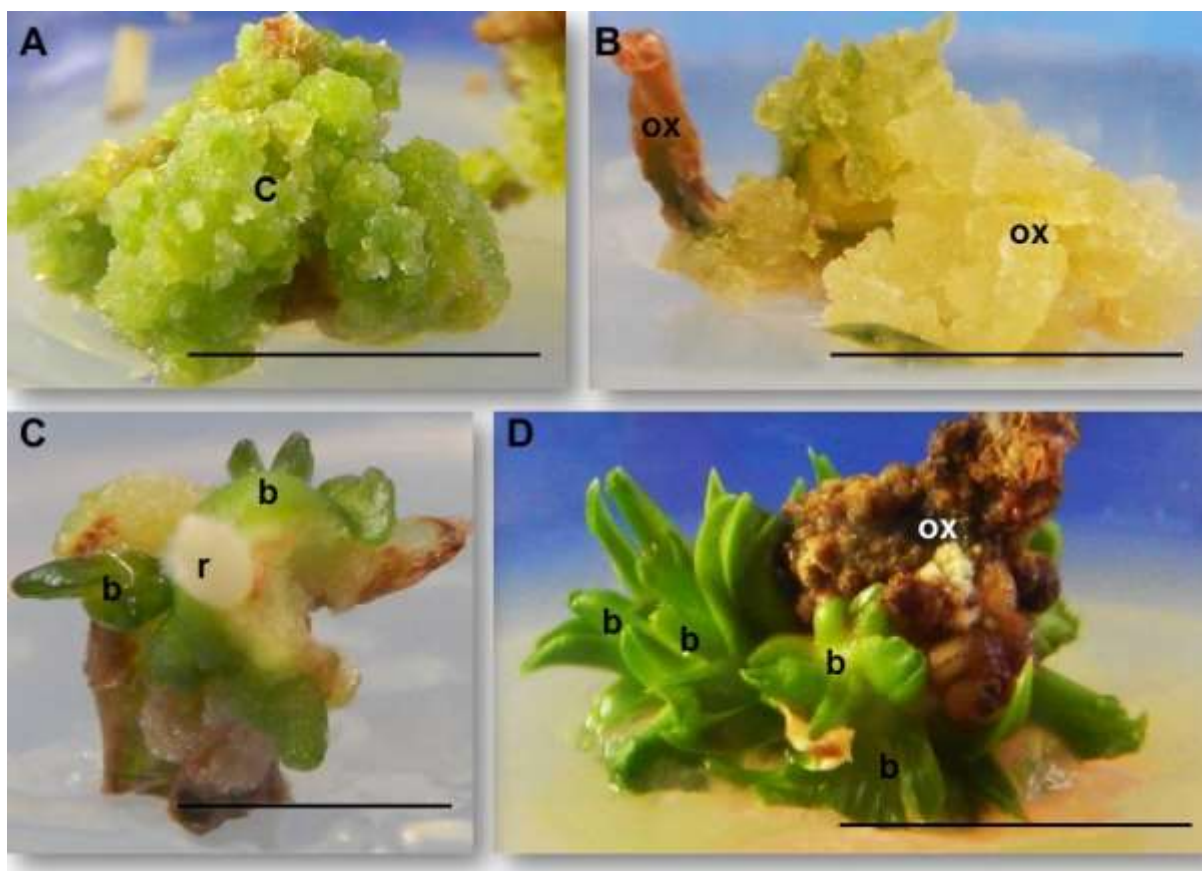


Figura 18. Formación de callo (**c**) y desarrollo de brotes por organogénesis indirecta en explantes de hoja de *A. kavandivi* en MS+BA/2,4-D 1/0.1 mgL⁻¹. (**A**) Callo formado en la base del explante después de dos meses de cultivo. (**B**) En algunos explantes el callo y el explante mismo comenzaron a perder color y a oxidarse (**ox**) después de tres meses de cultivo. (**C**) Los explantes que presentaron menor cantidad de callo comenzaron a formar brotes (**b**) o raíces (**r**) desde los dos meses de inducción. (**D**) El callo del que se originaron los brotes comenzó a oxidarse (**ox**) y los brotes (**b**) comenzaron a elongarse. Barras= 0.5 cm.

Promedio de brotes/explante (hoja) y número total de brotes formados

En los explantes de hoja se obtuvo un total de 100 brotes entre los cuatro tratamientos. La prueba de Kruskal-Wallis no mostró diferencias significativas entre los valores promedio de brotes por explante (b/exp) de hoja de los cuatro tratamientos ($p=0.700$, $\alpha=0.05$), sin embargo, el tratamiento 1/0.1 mostró una tendencia a ser mejor para la inducción de brotes a partir hojas en este ensayo, debido al promedio de b/exp obtenidos (17) (Tabla 7).

Tabla 7. Número de brotes por tratamiento y por explante obtenidos a los cuatro meses en MS+BA/2,4-D en explantes de hoja de *A. kavandivi* (ensayo 1).

BA/2,4-D (mgL ⁻¹)	Brotos/tratamiento	Promedio Brotos/explante
0/0	3	3±0
0/0.1	6	6±0
1/0	58	14 ±12.70
1/0.1	33	17±11.5
Total	100	

Las hojas formaron brotes principalmente por organogénesis directa en el tratamiento control 0/0 (42%) y en 1/0 (36%), y por organogénesis indirecta en 1/0 (45%) y 1/0.1 (40%). En 0/0 también se registró la formación de un solo brote por explante, que tuvo un desarrollo análogo al de las plántulas provenientes de semilla (Figura 19). Los resultados obtenidos en el tratamiento control en explantes de hoja en el ensayo 1 son similares a los de Miguel-Luna *et al.* (2014) para *Agave americana*, donde se corroboró que al aumentar la concentración de la citocinina BA a 6mgL⁻¹ el número de brotes se incrementó (11.8 b/exp) en comparación a los obtenidos en ausencia de BA (4b/exp).

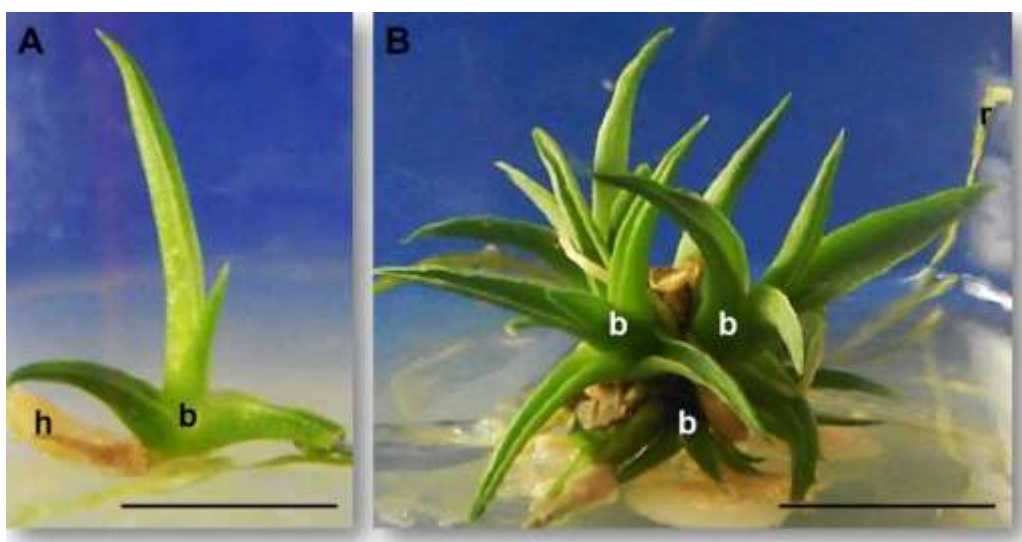


Figura 19. Explantes de hoja (h) de *A. kavandivi* en MS 0/0. (A) Brote regenerado a los dos meses a partir de un explante que se oxidó después de formarlo. (B) Explante contaminado con bacterias, en la base formó tres brotes (b) y una raíz (r) a los cuatro meses de cultivo. Barras= 1 cm.

Explantos de tallo

- Organogénesis directa

En los explantes de tallo la formación de brotes ocurrió principalmente por organogénesis directa, siendo precedida por un ensanchamiento de la base de los explantes, que provocó el desplazamiento de éstos hacia el interior del medio de cultivo. De la base ensanchada, que presentó un color blanquecino, comenzaron a surgir los pequeños brotes a partir del día 36 en el medio de inducción, éstos se dispusieron a manera de roseta, posteriormente se elongaron y se formaron más brotes cubriendo totalmente al explante (Figura 20).

- Organogénesis indirecta

Se caracterizó por la formación de callo en el primer mes de cultivo, el posterior incremento de volumen de la base del explante y del callo, finalmente los brotes se desarrollaron a partir de los 40 días en el medio de inducción (Figura 21).



Figura 20. Desarrollo de brotes por organogénesis directa en explantes de tallo (**t**) de *A.kavandivi* en MS+BA/2,4-D 1/0 mgL⁻¹. (**A**) Aspecto de los tallos después de un mes de inducción. La base se ensanchó y presentó coloración amarilla blanquecina. (**B**) Al día 36 se observaron pequeños primordios de brotes (**pb**) surgiendo de la base, (**C**) los cuales se elongaron en brotes (**b**) visibles a simple vista después de dos meses, mientras otros comenzaron a desarrollarse (↓). (**D** y **E**) Después de cuatro meses, el número de brotes se incrementó considerablemente cubriendo por completo el explante. Barras= 1 cm.

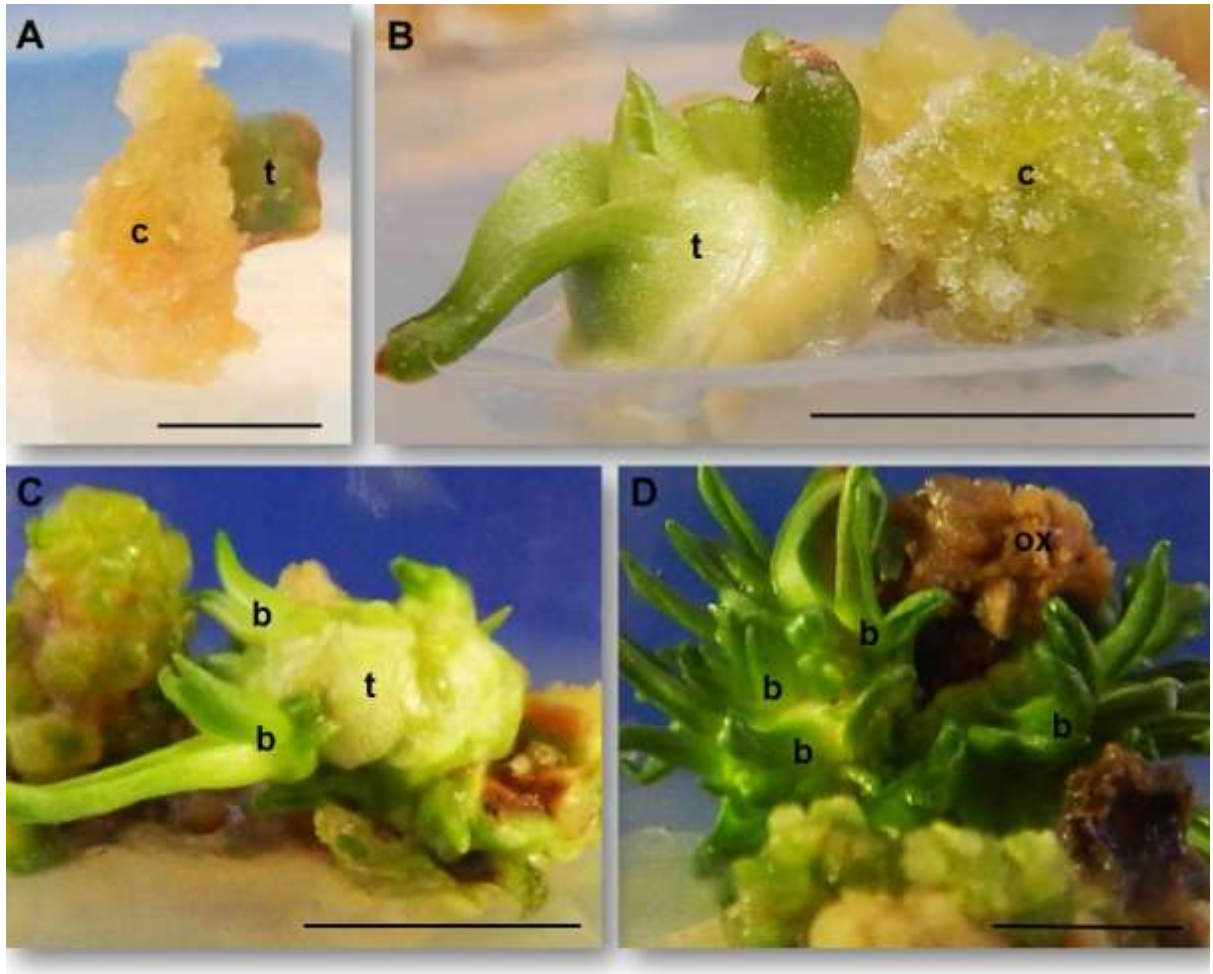


Figura 21. Formación de callo y desarrollo de brotes por organogénesis indirecta en explantes de tallo (t) de *A. kavandivi* en MS+BA/2,4-D 1/0.1. (A) La formación de callo (c) se presentó dentro del primer mes de cultivo, sin embargo, en algunos explantes se tornó de color amarillo y finalmente se oxidó. (B) En otros explantes el callo proliferó en la base, misma que aumentó su volumen, (C) después de 40 días se observó el desarrollo de los brotes (b) y (D) la posterior elongación de éstos; el callo que les dio origen comenzó a oxidarse (ox). Barras= 1 cm.

Promedio de brotes por explante (tallos) y número total de brotes obtenidos

En los explantes de tallo se obtuvo un total de 87 brotes entre los cuatro tratamientos, la prueba de Kruskal-Wallis no mostró diferencias significativas entre los valores promedio de brotes/explante de los tratamientos ($p=0.300$, $\alpha=0.05$), sin embargo, el valor más alto se obtuvo en 1/0.1, (15 b/exp) (Tabla 8). Los tallos formaron brotes principalmente por

organogénesis directa en 1/0 (43%) y 0/0.1 (40%), y por organogénesis indirecta en los tratamientos 1/0 (29%) y 1/0.1 (25%).

Tabla 8. Número de brotes por tratamiento y por explante obtenidos a los cuatro meses en MS+BA/2,4-D en explantes de tallo de *A. kavandivi* (ensayo 1). La prueba de Kruskal-Wallis no mostró diferencias significativas entre los valores promedio de b/exp ($p=0.300$, $\alpha=0.05$).

BA/2,4-D (mgL ⁻¹)	Brotes/tratamiento	Promedio Brotes/explante
0/0	5	5±0
0/0.1	0	--
1/0	36	12±6.96
1/0.1	46	15±4.5
Total	87	

Además de la formación de brotes (tallos sin raíces), fue común que los explantes de tallo cultivados en el tratamiento control 0/0 continuaran su desarrollo como plantas normales que formaron más hojas a partir del ápice del tallo, esto posiblemente se debió a la dominancia apical que no se rompió en ausencia de RCV en este tratamiento. En los explantes de tallo del tratamiento 0/0 que formaron brotes se obtuvo un promedio de 5 b/exp, este número es similar a la cantidad de hijuelos que presentan en campo otras especies como *Agave salmiana* (5-6 hijuelos) (Silos-Espino *et al.*, 2010), los hijuelos se desarrollan naturalmente en la base del tallo de la planta (Angeles Vázquez *et al.*, 2017) y de acuerdo con los resultados obtenidos en el ensayo 1, el efecto de los RCV potencializa esta capacidad.

Alvez y Oropeza (2015) mencionan que la respuesta del explante a la adición exógena de auxinas y citocininas es variable y depende de la especie de planta y del estado de desarrollo de los tejidos que son fuente de los explantes (nivel endógeno de estas hormonas y el tipo y la cantidad de auxina y citocinina).

Brotos formados por hoja y tallo

La prueba de t para medias de dos muestras emparejadas no mostró diferencias significativas entre el promedio de brotes por explante de hoja y tallo ($p=0.15$, $\alpha=0.05$). Se considera que este resultado se debe a la baja cantidad de explantes disponibles en el ensayo 1, debido a la pérdida de éstos por oxidación y contaminación. Por lo anterior, en el segundo ensayo los explantes fueron tratados con una solución antioxidante, esperando que la cantidad de explantes sobrevivientes incrementara, con esto se pudo determinar cuál de los dos tipos de explantes tallos u hojas fueron más regenerativos.

- **Ensayo 2 (MS + BA/2,4-D, 8 tratamientos)**

Debido al alto porcentaje de explantes oxidados observado en el ensayo 1, fue necesario realizar un segundo ensayo en el que se puso a prueba el uso de una solución antioxidante de ácido cítrico con ácido ascórbico para contrarrestar la oxidación de los explantes, sin embargo, la oxidación se presentó nuevamente en los tejidos desde los primeros meses de inducción.

En los explantes de hoja, el porcentaje de explantes oxidados pasó de un intervalo de 33-44% a 5-40% en los diferentes tratamientos, mientras que en los explantes de tallo la oxidación se eliminó en cinco de los ocho tratamientos durante los dos primeros meses de inducción y pasó de un intervalo de 11-22% a 9-18% en los tratamientos en los que se presentó (Figura 22). Aún después del tratamiento con la solución antioxidante previo a la siembra, los porcentajes de explantes oxidados aumentaron en ambos tipos de explante al finalizar la etapa de inducción.

De manera similar al ensayo 1 los tratamientos con la auxina 2,4-D, tanto de tallos como de hojas, fueron los que presentaron los mayores porcentajes de oxidación, a diferencia de los tratamientos que sólo contenían la citocinina BA; además del efecto de la auxina, la oxidación

también se atribuye, por una parte, a las condiciones del ambiente controlado y del medio cultivo, y por otra parte, a las heridas realizadas en los tejidos durante el corte para la obtención de explantes, ya que los tejidos responden naturalmente con la liberación de polifenoles hacia el medio de cultivo y al acumularse en el medio alteran las posibles respuestas morfogénicas (Cassells y Curry, 2001). Este efecto se observó en los explantes de tallo de *A. kavandivi* en el tratamiento control, pues aún en ausencia de reguladores de crecimiento vegetal exógenos se obtuvo del 20-40% de explantes oxidados.

El uso de antioxidantes permitió alcanzar un mayor porcentaje de explantes sobrevivientes durante los dos primeros meses de inducción, sin embargo, la oxidación persistió al término de esta etapa (Figura 23), por lo que se sugiere que en futuros trabajos los explantes de *A. kavandivi* sean enjuagados periódicamente en la solución con antioxidantes durante el desarrollo de los cultivos.

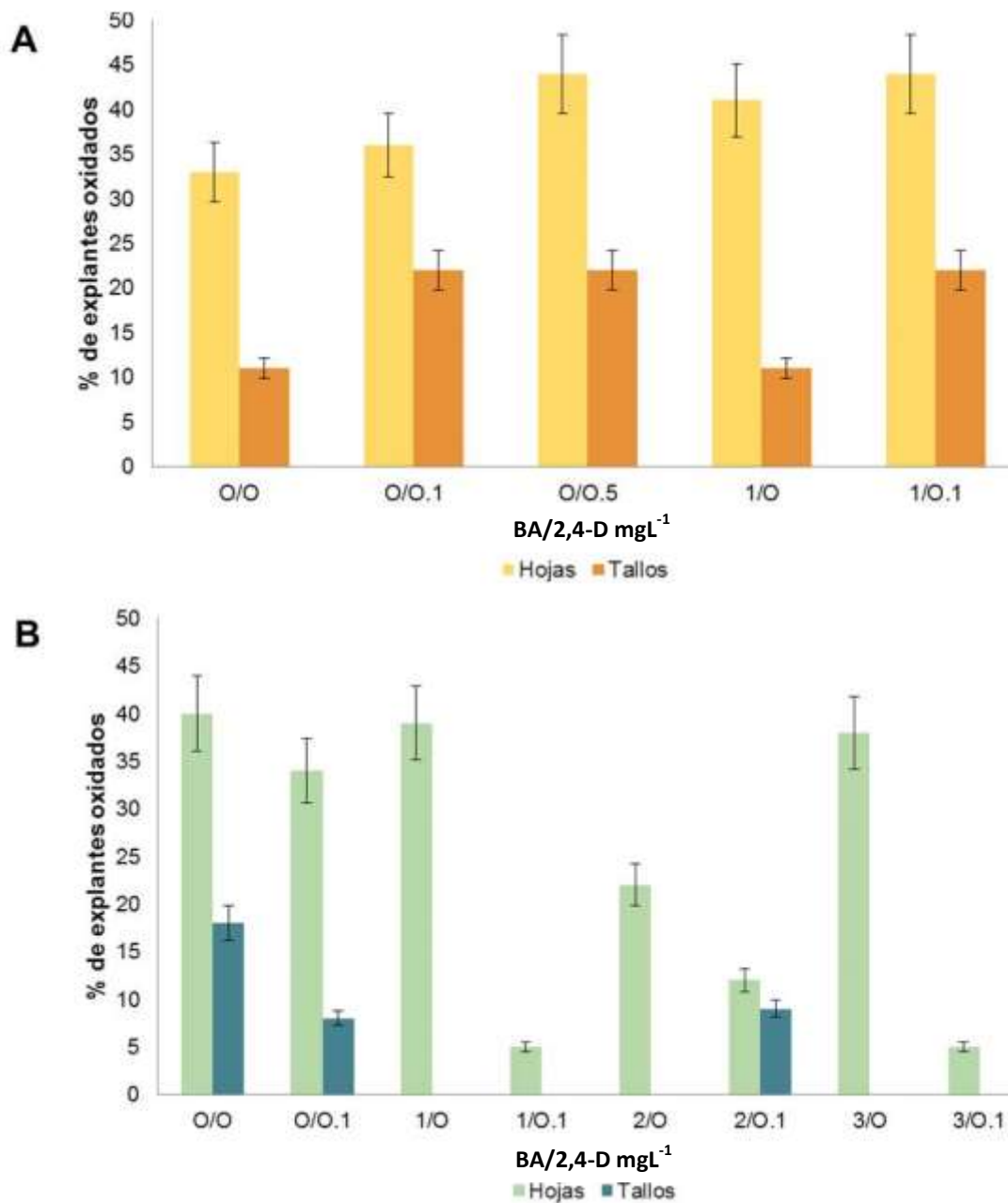


Figura 22. Porcentaje de explantes oxidados en los ensayos 1 (A) y 2 (B) a los dos meses en MS+BA/2,4-D. En el ensayo 1 el porcentaje de explantes oxidados de hoja fue superior a 30% y cercano a 45% en todos los tratamientos, mientras que el de tallos fue del 11- 22%. El tratamiento con antioxidantes previo a la siembra (ensayo 2) disminuyó el porcentaje de explantes oxidados de hoja en los tratamientos con auxina (1/0.1, 2/0.1 y 3/0.1), en contraste con el control (40%); en los tallos la oxidación fue menor (9-18%) y nulo en casi todos los tratamientos con la citocinina.

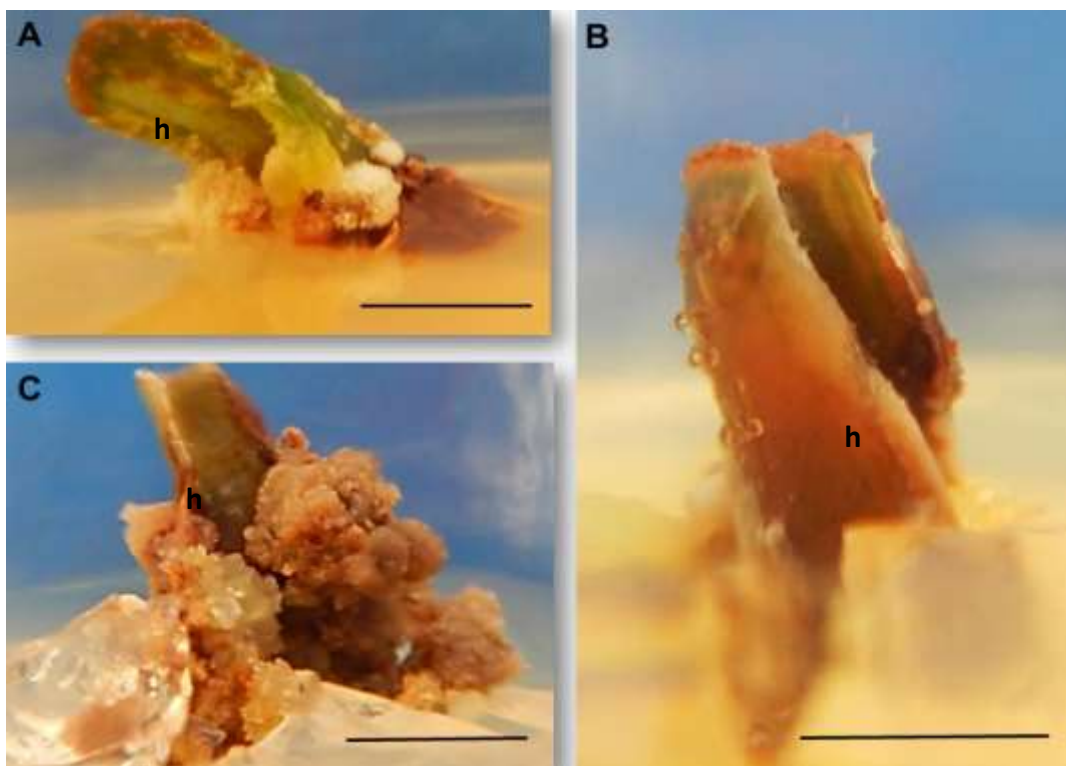


Figura 23. Explantes oxidados de hoja (h) de *A. kavandivi*. (A) Los bordes y la base del explante se oscurecieron desde los dos primeros meses, lo que provocó el cambio de color en el medio de cultivo. (B) Hoja y (C) Explante con callo oxidados a los cuatro meses de cultivo. Barras= 1 cm.

La contaminación representó nuevamente una limitante desde los primeros meses en el medio de inducción (Figura 24), hasta la etapa de elongación y enraizamiento. Para eliminar el problema se realizó el tren de desinfección con Microdyn[®], hipoclorito de sodio al 1.8% y agua destilada estéril.

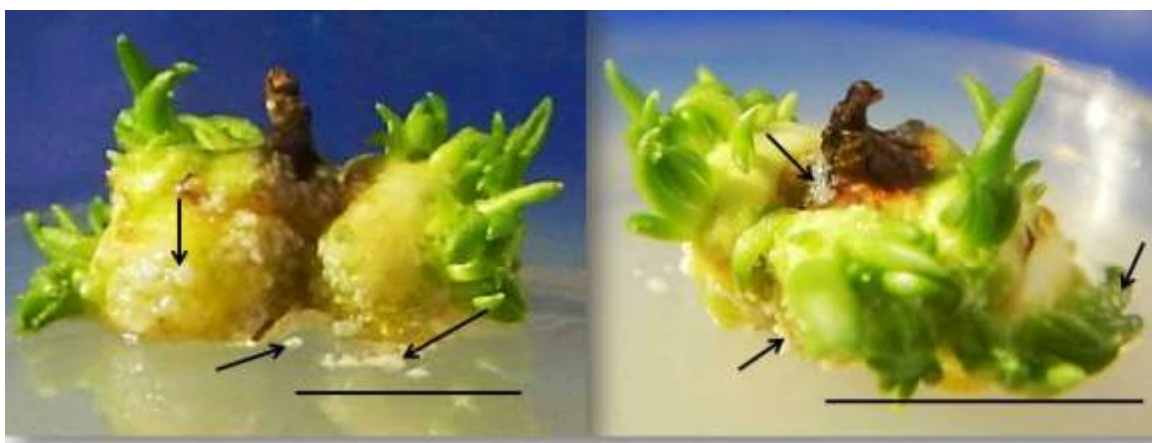


Figura 24. Explantes de tallo en MS+BA/2,4-D 3/0 a los dos meses de inducción. Se observa la contaminación bacteriana (→) en la base ensanchada del explante, en los brotes y en el medio de cultivo. Barras= 1 cm.

Respuestas morfogénicas

Al igual que en el ensayo 1, las respuestas morfogénicas predominantes fueron: organogénesis directa de brotes a partir de explantes de hoja y tallo y organogénesis indirecta a partir de los explantes de hoja. Como consecuencia del aumento de explantes sobrevivientes por efecto de la solución antioxidante, el porcentaje de explantes de tallo y hoja que respondieron por alguna de las vías morfogénicas aumentó del 15-45% (ensayo 1) al 40-100% (ensayo 2) con lo que se logró mayor número de brotes. Tanto en los explantes de hoja como de tallo fue evidente que la presencia de citocinina favoreció la formación de brotes, ya que en los tratamientos sin ésta sólo se formó callo, sin embargo, difícilmente surgen brotes de éste.

Explantes de hoja

- Organogénesis directa e indirecta

En explantes de hoja, el mayor porcentaje de respuesta a la formación de brotes por organogénesis directa se observó en 1/0 (98%), seguido de 2/0 (95%), ambos en ausencia de la auxina, mientras que por organogénesis indirecta se observó en 1/0.1 (50%). En las figuras 25a y 25b se muestran las diferentes etapas de la organogénesis directa en varios tratamientos y en la figura 26 se observa el desarrollo de callo.

Explantes de tallo

- Organogénesis directa

En los explantes de tallo la formación de brotes fue principalmente por organogénesis directa en el tratamiento 3/0 (95%) y 1/0 (83%), mientras que por organogénesis indirecta se observó en 1/0.1 (40%). En las figuras 27a y 27b se muestran diferentes etapas de la organogénesis

directa en los tratamientos 1/0, 2/0, 2/0.1, y 3/0 y en la figura 28 la organogénesis indirecta en el tratamiento 1/0 y 1/0.1.



Figura 25a. Diferentes etapas de la formación de brotes por organogénesis directa en explantes de hoja (**h**) de *A. kavandivi* en medio MS+BA/2,4-D. El aspecto y desarrollo de brotes en el tratamiento control (0/0) fue similar al de una plántula germinada. En los tratamientos con citocinina, en ausencia de auxina (1/0, 2/0 y 3/0) la base de la hoja se ensanchó y formó un tejido nodular (**n**) incoloro, a veces verde, del que surgieron los primordios de brotes (**pb**) con sus primordios foliares (**pf**) que posteriormente se desarrollaron en brotes (**b**). Barras= 0.5 cm



Figura 25b. Diferentes etapas de la formación de brotes (**b**) por organogénesis directa en explantes de hoja (**h**) de *A. kavandivi* en MS+BA/2,4-D. En los tratamientos con la citocinina/auxina, el tejido nodular de la base proliferó en mayor proporción y los brotes se desarrollaron alrededor del explante en diferentes direcciones, incluso hacia el interior del medio de cultivo (2/0). (**n**) Tejido nodular, (**pb**) primordio de brote y (**pf**) primordio foliar. Barras= 0.5 cm.

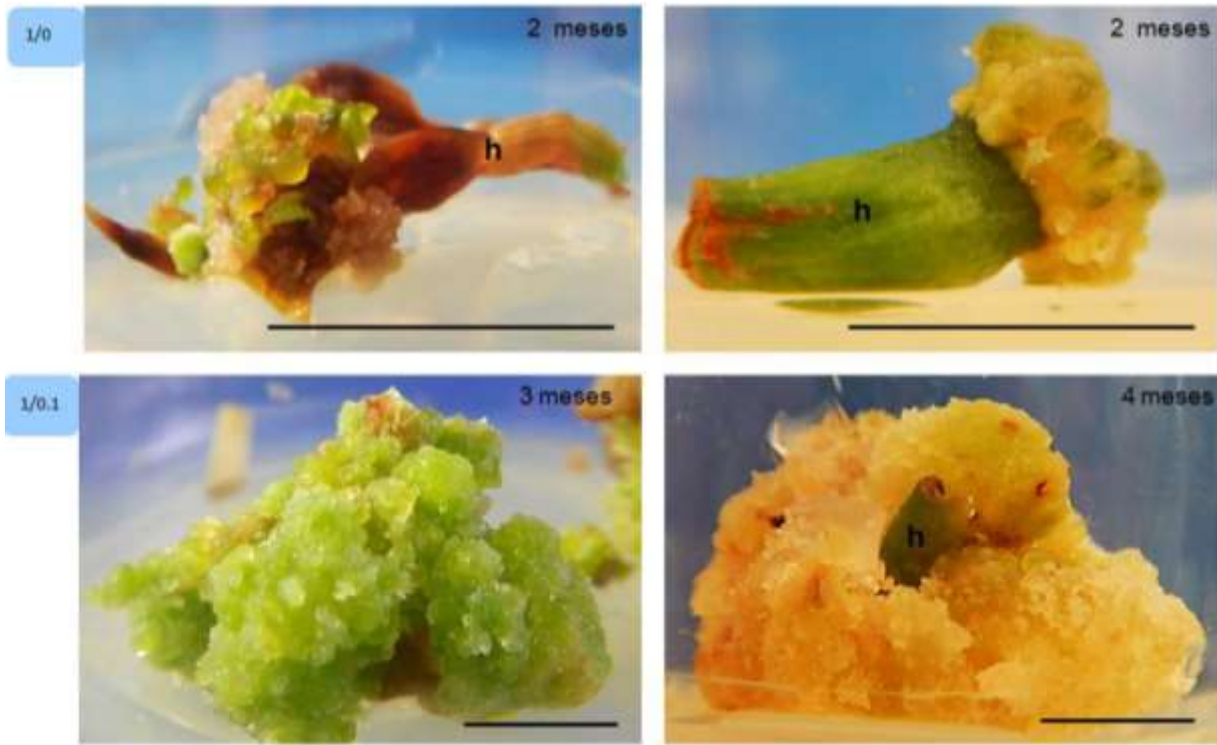


Figura 26. Desarrollo de callo en explantes de hoja (h) de *A. kavandivi* en MS+BA/2,4-D. Los tejidos de la base del explante se desorganizaron en callo verde, el callo no regenerativo se oxidó. Barras= 0.5 cm.



Figura 27a. Diferentes etapas de la formación de brotes por organogénesis directa en explantes de tallo (**t**) de *A. kavandivi* en MS+BA/2,4-D. El surgimiento de brotes (**b**) fue precedido por el desarrollo de primordios de brotes (**pb**). En los explantes que no formaron brotes el ápice se desarrolló en una planta regenerada (**p**). Barras= 0.5 cm.



Figura 27b. Diferentes etapas de la formación de brotes por organogénesis directa en explantes de tallo (t) de *A. kavandivi* en MS+BA/2,4-D. Primordios de brotes (pb), brotes (b). Barras= 0.5 cm.

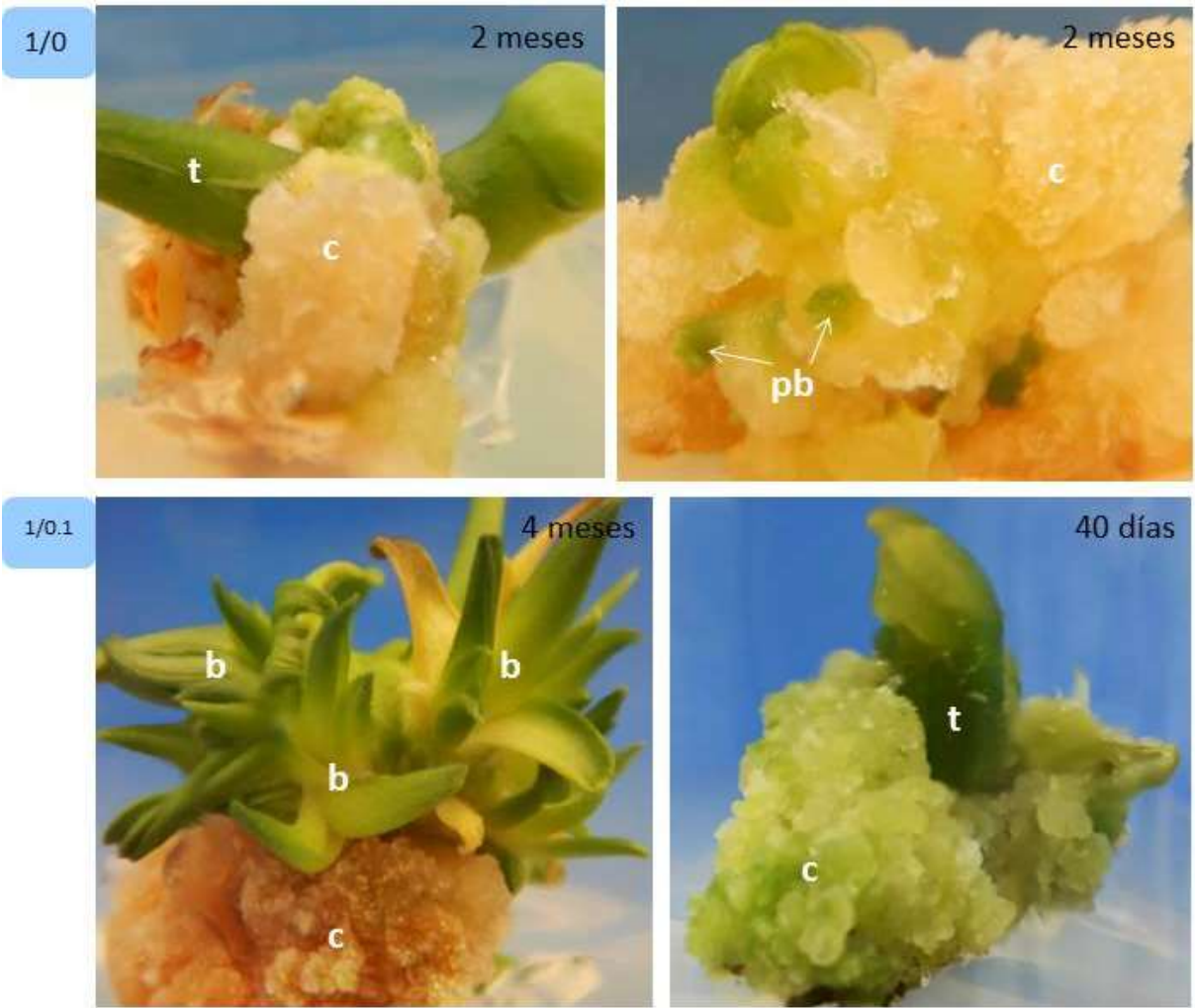


Figura 28. Desarrollo de callo (c) en explantes de tallo (t) de *A. kavandivi* en MS+BA/2,4-D. Se observó el desarrollo de primordios de brotes (pb) y posteriormente su desarrollo en brotes (b) por organogénesis indirecta. Barras= 0.5 cm.

Promedio de brotes/explante y número total de brotes formados

- Hoja

En los explantes de hoja se obtuvo un total de 250 brotes en los ocho tratamientos. La prueba de Kruskal-Wallis no mostró diferencias significativas entre los valores promedio de brotes/explante de los ocho tratamientos ($p=0.500$, $\alpha=0.05$), sin embargo, el valor más alto se obtuvo en 1/0.1 (21 b/exp) seguido de 2/0 (10 b/exp) (Tabla 9).

Tabla 9. Número de brotes por tratamiento y por explante obtenidos a los dos meses en MS+BA/2,4-D en explantes de hoja de *A. kavandivi* (ensayo 2). La prueba de Kruskal-Wallis no mostró diferencias significativas entre los valores promedio de b/exp ($p=0.500$, $\alpha=0.05$).

BA/2,4-D (mgL ⁻¹)	Brotes/tratamiento	Promedio brotes/explante
0/0	15	7.5±5.3
0/0.1	2	1±0
1/0	53	7.6±8.5
1/0.1	42	21±5
2/0	110	10±11.1
2/0.1	14	4.6±3.7
3/0	6	3±1
3/0.1	8	8±0
Total	250	

- Tallo

En los explantes de tallo se obtuvieron 315 brotes en total. La prueba de Kruskal-Wallis no mostró diferencias significativas entre los valores promedio de brotes/explante de los ocho tratamientos ($p=0.080$, $\alpha=0.05$), a pesar de esto, el valor más alto de brotes obtenidos correspondió a 3/0 (17.6 b/exp) seguido de 1/0 (14.5 b/exp) (Tabla 10). Estos resultados son similares a los obtenidos por Silos-Espino *et al.*, (2007), que al utilizar tallos desprovistos de hojas como fuente de explante de *Agave salmiana*, obtuvieron un promedio de 20.3 b/exp con 2 mgL⁻¹ de BA.

Tabla 10. Número de brotes por tratamiento y por explante obtenidos a los dos meses en MS+BA/2,4-D en explantes de tallo de *A. kavandivi* (ensayo 2). La prueba de Kruskal-Wallis no mostró diferencias significativas entre los valores promedio de b/exp ($p=0.080$, $\alpha=0.05$).

BA/2,4-D (mgL ⁻¹)	Brotes/tratamiento	Promedio brotes/explante
0/0	4	1±0.7
0/0.1	10	3.3±1.2
1/0	116	14.5±15.3
1/0.1	28	4.6±7.3
2/0	16	5.3±1.1
2/0.1	28	5.6±5.1
3/0	106	17.6±10.2
3/0.1	7	2.3±0.9
Total	315	

La prueba de t para medias de dos muestras emparejadas no mostró diferencias significativas entre el número total de brotes producidos por explantes de hoja y tallo ($p=0.370$, $\alpha=0.05$). Tomando en cuenta los resultados de los ensayos 1 y 2, se puede considerar que las hojas fueron los explantes más regenerativos para la propagación *in vitro* de *Agave kavandivi*, ya que los valores más altos de brotes por explante (ensayo 1: 14-17 b/exp; ensayo 2: 10-21 b/exp) son comparables e incluso mayores con los obtenidos de tallos (ensayo 1: 12-15 b/exp; ensayo 2: 14.5-17.6 b/exp) y a una concentración menor de RCV (1/0.1) que la requerida para los tallos (3/0). A pesar de que éstas se oxidaron más que los tallos, fue posible reducir el efecto al realizar enjuagues con antioxidantes y subcultivos periódicos. Otro factor importante para considerar es que por cada plántula madre se obtienen al menos cuatro explantes de hoja por uno de tallo, esto se traduce en una mayor disponibilidad de material vegetal a partir de hojas.

La capacidad que mostraron las hojas para regenerar brotes permite dejar intacto al tallo de las plántulas germinadas *in vitro* durante el proceso de obtención de explantes, dejando que

éstos continúen su crecimiento, ya sea *in vitro*, para formar más hojas, o *ex vitro* en un invernadero y posteriormente en su hábitat natural o en una colección biológica. La mayoría de los reportes exitosos de propagación *in vitro* de agaves, han utilizado los tallos y eliminado las hojas, en conocimiento de la capacidad que éstos tienen para formar hijuelos *in vivo*, sin embargo, en *A. kavandivi*, las hojas mostraron un alto potencial regenerativo que posiblemente se debe a la capacidad natural de los agaves de formar hijuelos interfoliares *in vivo*, ya que la parte basal de las hojas está unida a los tallos y conserva tejido meristemático (Angeles Vázquez *et al.*, 2017), durante el cultivo *in vitro* esta capacidad es inducida por el rompimiento de la dominancia apical y por el efecto de la benciladenina.

Elongación y enraizamiento de brotes

- **Ensayo 1**

Después de cinco meses en el medio de inducción, los brotes formados que se desprendieron fácilmente del tejido que les dio origen, fueron subcultivados en medio MS+CA 1.5 mgL⁻¹ (MS+CA), debido a que en la etapa de elongación de plántulas se comprobó que el CA favorece el incremento en longitud. Las masas de brotes en proceso de diferenciación se subcultivaron completas en el medio de elongación.

Después de dos meses en el medio de elongación, se evaluó el tamaño de los brotes obtenidos de los cinco tratamientos de ambos tipos de explante, esto se realizó midiendo la longitud desde la base del tallo hasta la punta de la hoja más larga. Los brotes provenientes de hoja alcanzaron una longitud promedio máxima de 2.4 cm del tratamiento 1/0.1, mismo que coincidió con el mayor número promedio de brotes formados por explante ($17b \pm 11.5$) (Tabla 11). Los brotes provenientes de tallo alcanzaron una longitud promedio máxima de 1.7 cm en el tratamiento 1/0.1, esto coincide con el mayor número promedio de brotes formados por explante (Tabla 12). La prueba de t para medias de dos muestras emparejadas, no mostró

diferencias significativas en la longitud promedio entre los brotes producidos por tallo y hoja ($p=0.200$, $\alpha=0.05$).

Por otra parte, se observó la formación espontánea de raíces en los brotes provenientes de todos los tratamientos excepto del control, en los brotes de hoja el mayor porcentaje de enraizamiento después de dos meses en el medio de elongación se presentó en los que procedían de los tratamientos 1/0.1 (61%) y 0/0.1 (100%), por lo que es evidente que la presencia de la auxina, aún en baja concentración, estimuló la formación de raíces en los brotes generados (Tabla 11). En los brotes provenientes de tallo procedentes de todos los tratamientos, se observó la formación espontánea de raíces alcanzando porcentajes de 58 y 52% de brotes enraizados en los tratamientos 1/0 y 1/0.1 respectivamente (Tabla 12).

Tabla 11. Número de brotes por tratamiento y por explante obtenidos a partir de explantes de hoja (ensayo 1), longitud promedio y porcentaje de brotes individualizados que presentaron formación espontánea de raíz, después de dos meses en el medio de elongación y enraizamiento.

MS+BA/2,4-D (mgL^{-1})	Brotos/ tratamiento	Brotos/ explante	Longitud promedio de brotes (cm)	Brotos con raíz (%)
0/0	3	3±0	0.5±0	0
0/0.1	6	6±0	2.3±0.26	100
1/0	58	14 ±12.70	1.8 ±0.78	45
1/0.1	33	17±11.5	2.4±1.20	61
Total	100			

Tabla 12. Número total de brotes obtenidos a partir de explantes de tallo (ensayo 1), longitud promedio y porcentaje de brotes individualizados que presentaron formación espontánea de raíz, después de dos meses en el medio de elongación y enraizamiento.

MS+BA/2,4-D (mgL^{-1})	Brotos/ tratamiento	Brotos/ explante	Longitud promedio de brotes (cm)	Brotos con raíz (%)
0/0	5	5±0	1.32±0.3	0
0/0.1	0	--	--	--
1/0	36	12±6.96	1.5 ±0.64	58
1/0.1	46	15±4.5	1.7 ±0.8	52
Total	87			

Después de cinco meses en el medio de inducción y dos meses de cultivo en el medio de elongación, el mayor número promedio de brotes formados por explante y el mayor promedio de longitud de brotes, se obtuvo a partir de las hojas. Se registró la formación espontánea de raíces desde el segundo mes de la etapa de elongación (MS+CA) en plántulas provenientes de ambos tipos de explante (Figura 29).

La mayor formación de brotes a partir de explantes de hoja puede atribuirse a diferentes factores que determinan el desarrollo de éstos, como el explante (genética), el número de meristemas presentes en cada explante, el vigor y la respuesta al medio de cultivo, la concentración de auxina y citocinina (Ángeles-Espino *et al.*, 2012), incluso los caracteres propios del grupo taxonómico. El subgénero *Littaea* (Agavaceae) incluye especies con hojas flexibles (*A. dasylirioides*, *A. petrophila*, *A. gracietae* y *A. stricta*) o rígidas (*A. rzedowskiana* y *A. kavandivi*) (Galván y Zamudio, 2013; García Mendoza y Chávez Rendón, 2013), a pesar de esto, son menos fibrosas que en otras especies que no pertenecen al grupo *Striatae* como *A. salmiana*, *A. tequilana* y *A. fourcroydes* (González *et al.*, 2004) y a pesar de que *A. kavandivi* posee hojas rígidas en su estado adulto, en el presente trabajo se observó que en su estado de plántula las hojas son flexibles, esto posiblemente se debe a la baja especialización del esclerénquima como tejido de sostén en esta etapa, lo cual facilitó su manipulación para la obtención de explantes y permitió la fácil desdiferenciación (en comparación con los tallos) y su respuesta a los RCV.

La respuesta favorable de organogénesis a partir de explantes de hoja en *A. kavandivi* contrasta con los resultados obtenidos para *A. salmiana* y *A. obscura*, especies de hojas rígidas, donde los explantes más regenerativos para ambas especies fueron los tallos (*A. salmiana*, BA/ANA 5/1 mgL⁻¹, 4 b/exp; *A. obscura*, BA/ANA 3/1, 3.4 b/exp) (Mauricio Salgado, 2019), lo cual es un indicio de que las características estructurales de hojas, como el nivel de rigidez y la auxina utilizada influyen en la capacidad morfogenética.

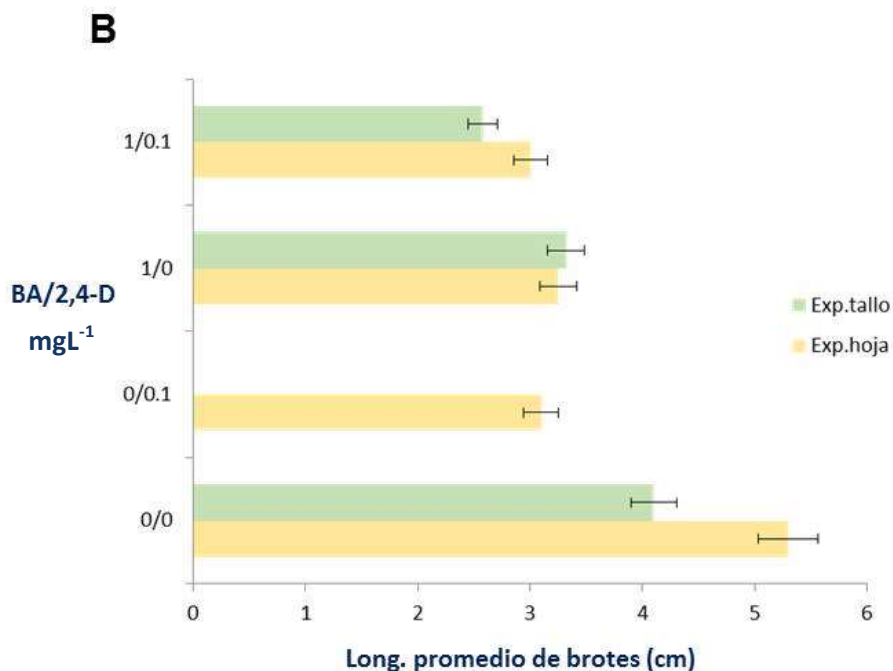
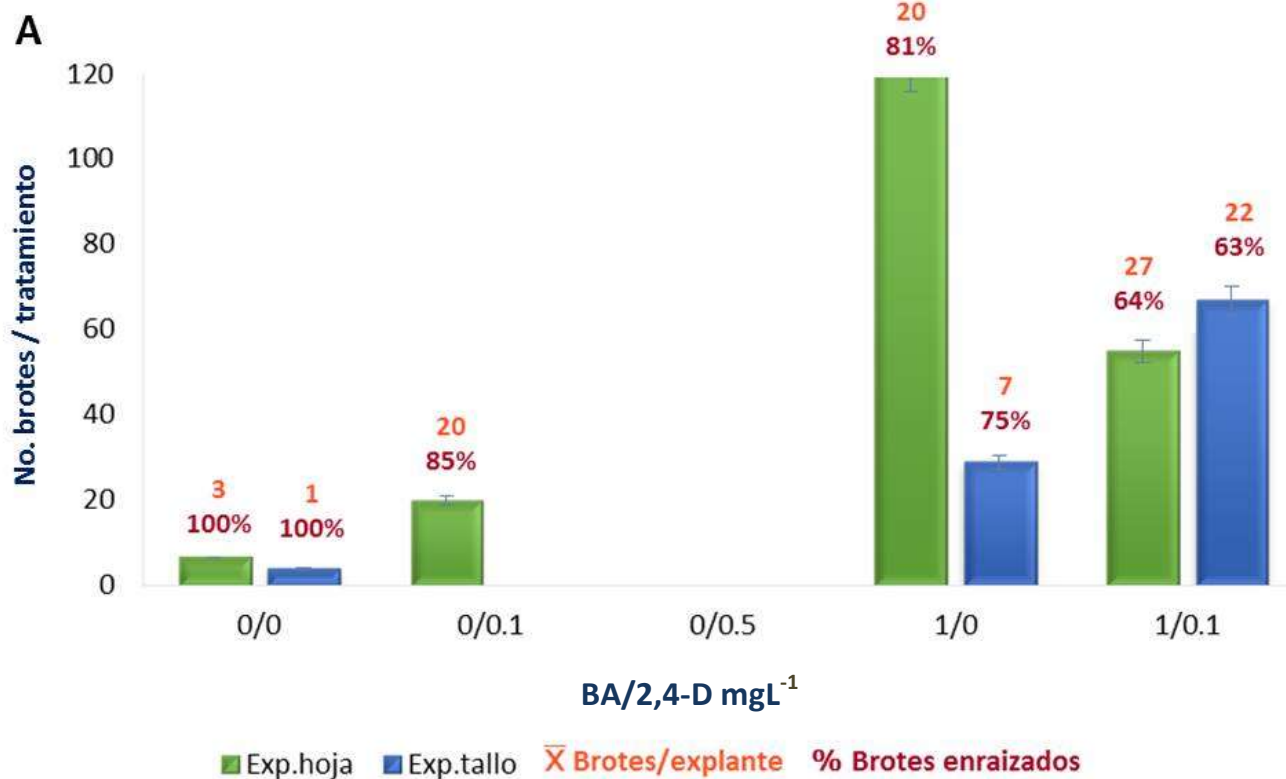


Figura 29. (A) Promedio de brotes obtenidos por explante y por tratamiento, porcentaje de brotes enraizados y longitud promedio de brotes de *A. kavandivi* a los cinco meses de elongación en MS+CA (ensayo 1). En explantes de hoja el mayor número de b/exp (27) se obtuvo en 1/0.1 y el mayor porcentaje de brotes enraizados (100%) en 0/0. En explantes de tallo el mayor número de brotes se obtuvo en 1/0.1 y el mayor porcentaje de enraizamiento (100%) en 0/0. (B) La mayor longitud promedio de brotes (5.3 cm) se obtuvo en 0/0 en los provenientes de hoja, mientras que en los brotes provenientes de tallo la longitud máxima fue 4.1 cm en 0/0.

A los cinco meses de cultivo en medio de elongación MS+CA 1.5 gL⁻¹, se observó que los brotes siguieron proliferando y pasaron de ser 100 a 204 brotes en total, generados a partir de hoja y, de 87 a 100 brotes en total generados a partir de tallo, así mismo se registró el incremento en la longitud de éstos (Tablas 13 y 14). La alta tasa de crecimiento en el medio de elongación (MS+CA 1.5 gL⁻¹) puede deberse a la presencia del carbón activado combinada con la actividad residual de las citocininas empleadas para generar los brotes. Se conoce que las citocininas sintéticas, como la benciladenina, mantienen una actividad residual en la base de los explantes, aún después de ser transferidos a medios carentes de esta sustancia (Werbrouck *et al.*, 1995).

Elongación de brotes de hoja

Después de cinco meses en el medio de elongación, el mayor número de brotes por tratamiento se registró en los provenientes de 1/0 (122 brotes), seguido de 1/0.1 (55 brotes), la mayor longitud promedio de brotes se obtuvo en los provenientes de 0/0 seguido de 1/0. Del total de los brotes generados a partir de explantes de hoja, el 77.5% (158 b) enraizaron de manera espontánea, a los brotes no enraizados se les colocó Radix[®] previo a su aclimatización. El mayor porcentaje de brotes enraizados y longitud promedio de raíz principal se registró en 0/0 (100% brotes enraizados, \bar{X} =10.6 cm raíz) y 1/0 (81.14% brotes enraizados, \bar{X} =5.39 cm raíz) (Tabla 13).

El mayor número de brotes/tratamiento se obtuvo en los provenientes de 1/0, estos alcanzaron una longitud promedio de 3.25 cm, a diferencia de los brotes formados en ausencia de hormonas (5.3 cm), el mayor promedio de brotes formados por explante (27.5) se obtuvo en el tratamiento 1/0.1 (Tabla 13).

Tabla 13. Número total de brotes obtenidos a partir de explantes de hoja (ensayo 1) después de cinco meses de cultivo en medio de elongación MS+CA 1.5 gL⁻¹. Longitud promedio de brotes, porcentaje de formación y longitud promedio de la raíz principal.

MS+BA/2,4-D (mgL ⁻¹)	Brotes/tratamiento	Promedio brotes/explante	Longitud promedio de brotes (cm)	Brotes con raíz (%)	Longitud promedio de raíz (cm)
0/0	7	3.5 ± 3.53	5.3 ± 0.00	100	10.6 ± 4.14
0/0.1	20	20 ± 0	3.1 ± 1.04	85	4.8 ± 2.48
1/0	122	20.33 ± 16.46	3.25 ± 1.26	81.14	5.39 ± 3.59
1/0.1	55	27.5 ± 4.94	2.96 ± 1.00	63.66	3.73 ± 1.82
Total	204				

Elongación de brotes de tallo

A los cinco meses de elongación, el mayor número de brotes por tratamiento y promedio de brotes por explante se registró en los provenientes del tratamiento 1/0.1 y 1/0, la mayor longitud promedio de brotes se obtuvo de los provenientes de 0/0. Del total de los brotes generados a partir de explantes de tallo, el 68% (68 b) enraizaron de manera espontánea en MS+CA 1.5 gL⁻¹, el mayor porcentaje de brotes enraizados se registró en 0/0 y 1/0 y la longitud promedio de raíz principal fue similar en todos los tratamientos (Tabla 14).

Tabla 14. Número de brotes por tratamiento y por explante obtenidos a partir de explantes de tallo (ensayo 1), después de cinco meses de cultivo en medio de elongación MS+CA 1.5 gL⁻¹. Longitud promedio de brotes, porcentaje de brotes con raíz y longitud promedio de la raíz principal.

MS+BA/2,4-D (mgL ⁻¹)	Brotes/tratamiento	Promedio brotes/explante	Longitud promedio de brotes (cm)	Brotes con raíz (%)	Longitud promedio de raíz (cm)
0/0	4	1.3 ± 0.5	4.1 ± 1.9	100	4.9 ± 3.4
0/0.1	0	0	0	0	0
1/0	29	7.25 ± 7.76	3.32 ± 1.74	75	4.76 ± 2.65
1/0.1	67	22.33 ± 16.04	2.96 ± 1.50	62.68	4.9 ± 3.08
Total	100				

Para los dos tipos de explante se determinó que la citocinina fue fundamental para una mayor proliferación de brotes, debido a que los promedios más altos se obtuvieron en los tratamientos con BA, mientras que en 0/0 y en los tratamientos de BA combinados con 2,4-D se encontraron los valores más altos de longitud de brotes.

El mayor porcentaje de brotes con desarrollo espontáneo de raíces ocurrió en aquellos provenientes de los tratamientos 0/0 y 1/0 en ambos tipos de explantes al cabo de cinco meses de cultivo en medio de elongación. Estos resultados son similares a los obtenidos por Santiz *et al.*, (2012), quienes reportan para *A. grijalvensis* la formación de raíces después de siete semanas de incubación. De acuerdo con Soto *et al.* (2006), la adición exógena de auxinas como el ácido indol-3-acético (AIA), ácido 1-naftalenacético (ANA) y ácido indol-3-butírico (IBA) inducen la formación de raíces adventicias en los brotes de gran número de especies, así como un mayor tamaño de éstos, debido a que las auxinas promueven el crecimiento de las células, sin embargo esto difiere con lo obtenido para *A. kavandivi*, ya que la mayor longitud de raíz y el mayor porcentaje de formación de éstas, ocurrió en los tratamientos 0/0 y 1/0, sin embargo no se descarta que el efecto se deba a las auxinas endógenas.

- **Ensayo 2**

Después de dos meses de elongación, los brotes de hoja alcanzaron una longitud máxima de 3.7 cm del tratamiento 0/0.1, lo que contrasta con el tratamiento con mayor número de brotes formados por explante (2/0) (Tabla 15), este fenómeno puede atribuirse a una baja competencia por nutrientes en los tratamientos con menor número de brotes. Los provenientes de tallo alcanzaron la máxima longitud (3.4 cm) en el tratamiento 0/0.1, de igual forma, contrasta con el tratamiento con mayor número de brotes formados por explante (3/0) (Tabla 16). La prueba de t para medias de dos muestras emparejadas mostró diferencias

significativas en la longitud promedio de brotes producidas por tallo y hoja ($p=0.040$, $\alpha=0.05$), favoreciendo a los provenientes de tallo.

Se observó la formación espontánea de raíces en los brotes provenientes de todos los tratamientos, tanto de tallo como de hoja. El mayor porcentaje de brotes con raíces se presentó en los tratamientos control (Hoja 66.6%; Tallo 50%) (Tablas 15 y 16), sin embargo la prueba de t para medias de dos muestras emparejadas no mostró diferencias significativas entre la longitud promedio de raíces formadas en los brotes de hoja (1.85 cm) y tallo (2.8 cm) ($p=0.300$, $\alpha=0.05$).

Después de dos meses de cultivo en el medio de elongación, el mayor número de brotes formados por explante (21 brotes en 1/0.1) y la mayor longitud de éstos (3.7 cm en 0/0.1), se registró en los provenientes de hoja (Tabla 15 y figura 30). La formación espontánea de raíces se observó desde el segundo mes de incubación (MS+CA 1.5 mgL⁻¹) en los brotes provenientes de ambos tipos de explante, con una mayor longitud promedio en los brotes provenientes de tallo (0/0, 5.65 cm).

Tabla 15. Número brotes por tratamiento y por explante obtenidos a partir de explantes de hoja (ensayo 2) después de dos meses de cultivo en medio de elongación MS+CA 1.5 gL⁻¹. Longitud promedio de brotes, porcentaje de brotes con raíces y longitud promedio de la raíz principal.

MS+BA/2,4-D (mgL ⁻¹)	Brotes/ tratamiento	Promedio brotes/explante	Longitud promedio de brotes (cm)	Brotes con raíz (%)	Longitud promedio de raíz (cm)
0/0	15	7.5±5.3	2.7±1.3	66.6	1.5±1.3
0/0.1	2	1±0	3.7±2.2	50	3.5±0
1/0	53	7.6±8.5	2.1±1	11.3	1.4±1.2
1/0.1	42	21±5	2.3±0.8	28.5	1.3±0.8
2/0	110	10±11.1	2±1.3	1.8	0.95±0.3
2/0.1	14	4.6±3.7	1.7±0.7	0	--
3/0	6	3±1	1.9±1	33.3	2.5±0.5
3/0.1	8	8±0	0.5±0.22	0	--
Total	250				

Tabla 16. Número brotes por tratamiento y por explante obtenidos a partir de explantes de tallo (ensayo 2) después de dos meses de cultivo en medio de elongación MS+CA 1.5 gL⁻¹. Longitud promedio de brotes, porcentaje de brotes con raíces y longitud promedio de la raíz principal.

MS+BA/2,4-D (mgL ⁻¹)	Brotes/ tratamiento	Promedio brotes/explante	Longitud promedio de brotes (cm)	Brotes con raíz (%)	Longitud promedio de raíz (cm)
0/0	4	1±0.7	3.05±1.2	50	5.65±5
0/0.1	10	3.3±1.2	3.4±1.1	20	1±0
1/0	116	14.5±15.3	3.2±2	34.5	3.1±2.1
1/0.1	28	4.6±7.3	2.9±1	39.2	3.6±2
2/0	16	5.3±1.1	1.6±0.8	0	--
2/0.1	28	5.6±5.1	1.8±0.8	7.14	3.3±0.2
3/0	106	17.6±10.2	2.4±0.9	7.5	2.4±1.6
3/0.1	7	2.3±0.9	2±1.1	14.2	0.6±0
Total	315				

Durante el tercer y cuarto mes de la etapa de elongación y enraizamiento se realizaron subcultivos en medio MS50%+CA 1.5 mgL⁻¹ como parte de una pre aclimatización, para activar el aparato fotosintético de las plantas por efecto de la reducción de sacarosa (de 30 a 15 gL⁻¹) en el medio de cultivo. Al término del periodo de elongación y enraizamiento se seleccionaron los brotes que presentaron rasgos vigorosos para comenzar su aclimatización, tales como el incremento en la longitud del brote, el ensanchamiento de las hojas nuevas, la pérdida de las hojas más antiguas y el desarrollo de raíces (Figura 31), en el caso de los brotes que rebasaron el espacio límite de los frascos de cultivo pero que aún no formaban raíces, previo a su aclimatización, se les aplicó el enraizador Radix®.

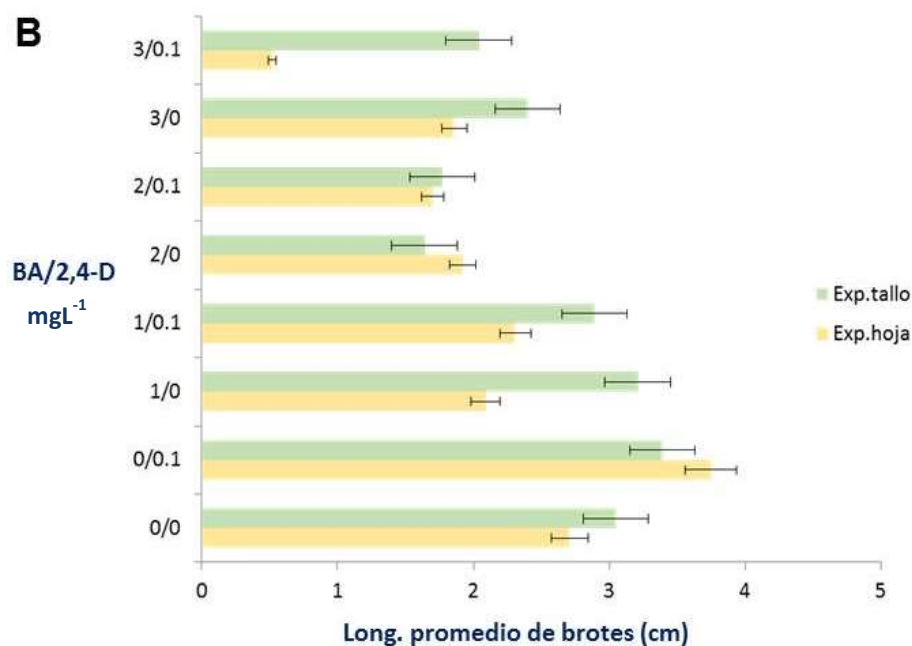
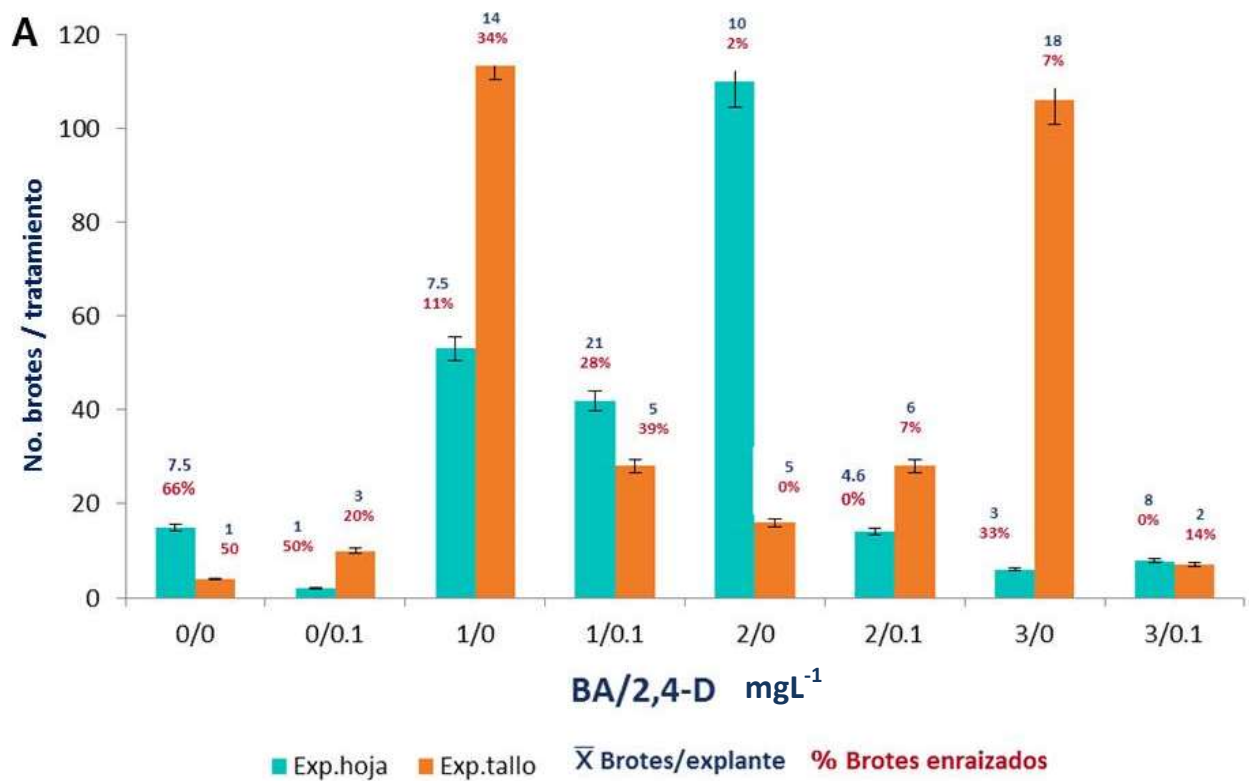


Figura 30. (A). Promedio de brotes/explante y por tratamiento, longitud promedio y porcentaje de enraizamiento. A los dos meses en MS+CA 1.5mgL⁻¹ (ensayo 2, los brotes provenían de explantes sometidos a un enjuague antioxidante previo a la siembra). En explantes de hoja el mayor \bar{X} de brotes/explante, se obtuvo en 1/0.1 y el mayor porcentaje de enraizamiento (66%) en 0/0. En explantes de tallo el mayor \bar{X} de brotes/explante se obtuvo en 3/0 y el mayor porcentaje de enraizamiento (50%) en 0/0. (B). La mayor longitud promedio de brotes se registró en los provenientes de explante de hoja en 0/0.1.

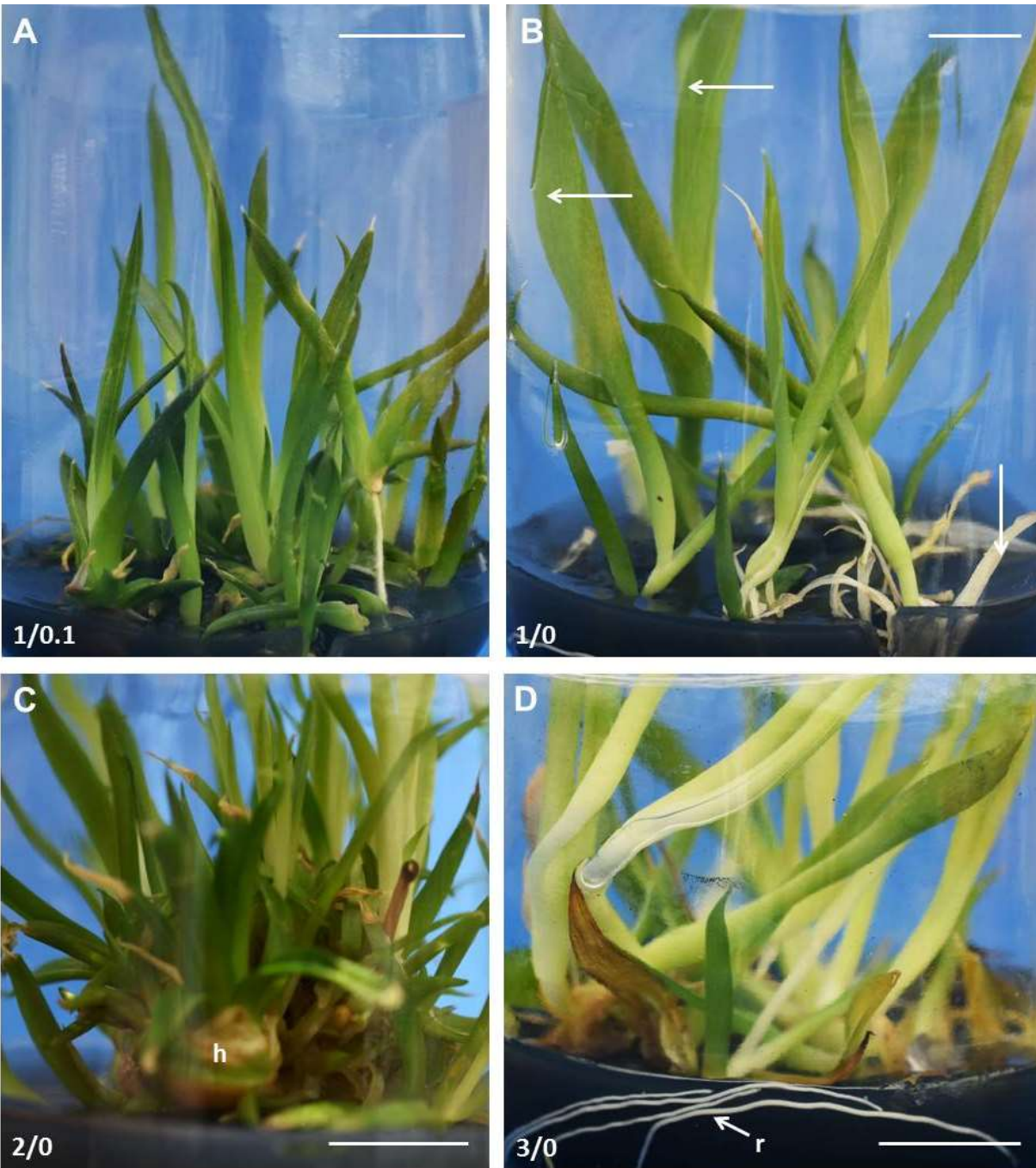


Figura 31. Brotes después del quinto mes de elongación y enraizamiento en medio MS50+CA 1.5 mgL⁻¹. (A-B) Brotes individualizados provenientes de tallo. En 1/0 ya se observa la parte superior de las hojas nuevas más anchas (←) y en la parte basal las primeras hojas ya secas (↓). (C) Brotes no individualizados creciendo sobre el explante de hoja (h). (D) Desarrollo de raíces (r) en brotes de tallo individualizados. Barras= 1 cm.

Aclimatización

Para incrementar la sobrevivencia *ex vitro*, los agaves micropropagados se pre aclimatizaron utilizando medio MS a la mitad de su concentración de macronutrientes, micronutrientes y sacarosa + CA 1.5 mgL^{-1} (MS50%+CA). Se ha reportado que la reducción de la sacarosa en el medio de cultivo promueve que los tejidos de las plantas activen su aparato fotosintético para la formación de carbono promoviendo una menor dependencia al azúcar incorporado al medio y un mejor desarrollo, facilitando su aclimatización y trasplante al suelo (Kozai *et al.*, 1988; Kozai, 1991). El subcultivo de los brotes se realizó después de tres meses en el medio de elongación y enraizamiento (MS+CA) y permanecieron dos meses más en el medio MS50%+CA antes de su transferencia *ex vitro* (Figura 32). Una vez transferidas, las plantas permanecieron de tres a cuatro semanas en la cámara de ambiente controlado y posteriormente se transportaron al invernadero donde a partir del primer mes las tapas de los contenedores fueron retiradas gradualmente (Figura 33).

De acuerdo con Yescas-Arreola *et al.* (2016), el éxito de la aclimatización de agaves depende en gran medida de la textura del sustrato y de la disponibilidad de nutrientes. En ensayos previos para la aclimatización de los brotes enraizados de *A. kavandivi*, se exploró su respuesta en diferentes sustratos reportados como exitosos en la aclimatización de otras especies de agaves y a partir de estos resultados (no reportados en este trabajo) se decidió utilizar peat most+agrolita (1:1) y tepojal+tierra negra (1:1) con las plantas obtenidas del ensayo 1. Una vez determinado el sustrato que promovió el mayor porcentaje de sobrevivencia de *A. kavandivi*, las plantas obtenidas en el ensayo 2 fueron trasplantadas a este.

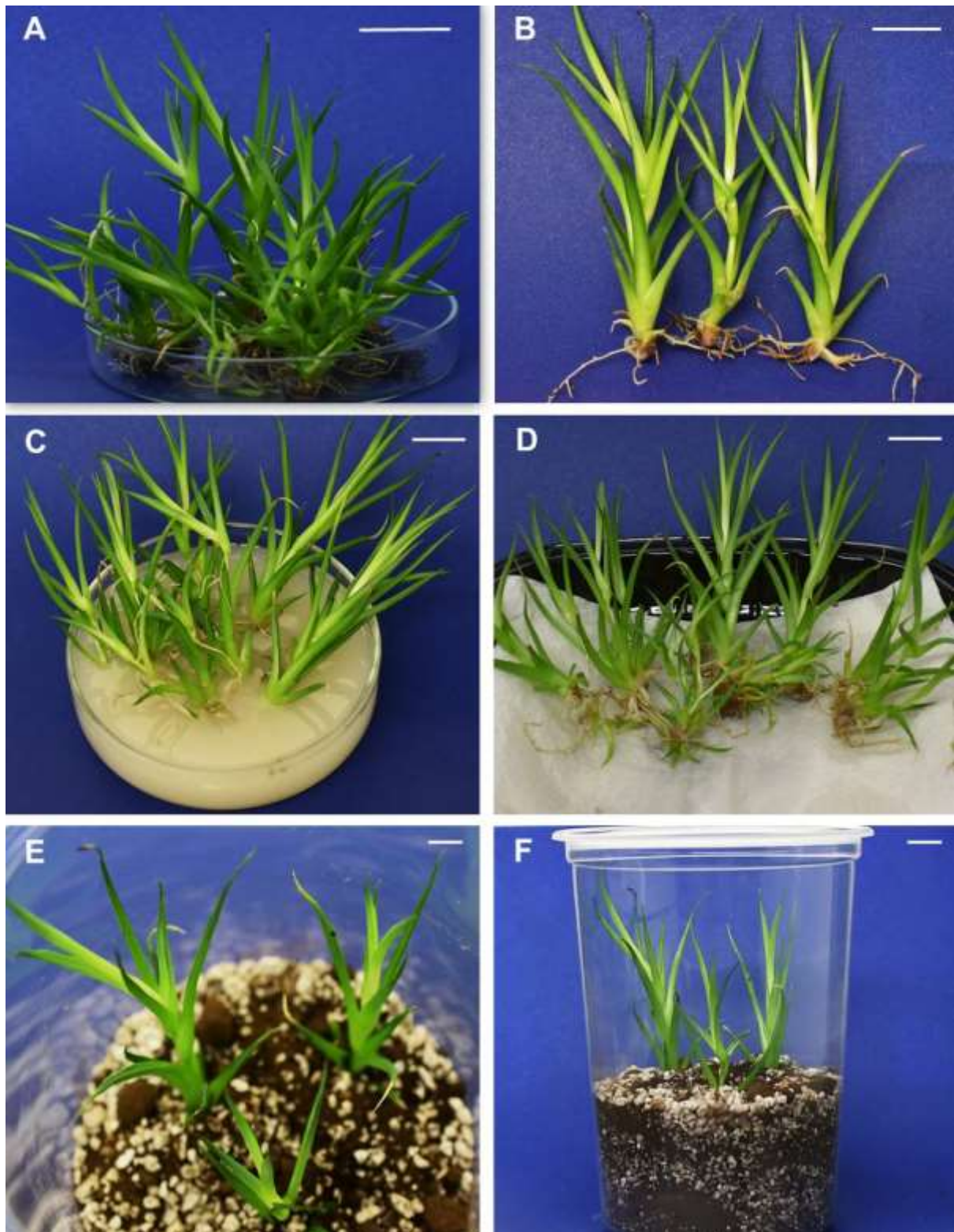


Figura 32. Siembra *ex vitro* de las plantas de *A. kavandivi*. (A) Brotes enraizados extraídos de los frascos. (B) Raíces sin residuos de agar. (C) La base de las plantas se sumergió en una solución fungicida (Captan 50[®]) por 10 minutos. (D) El exceso de humedad se eliminó colocándolas sobre papel absorbente (5 min). (E y F) Finalmente se sembraron en el sustrato húmedo; a los brotes que no formaron raíces se les aplicó enraizador comercial Radix 1500[®] antes del trasplante. Barras= 1 cm.

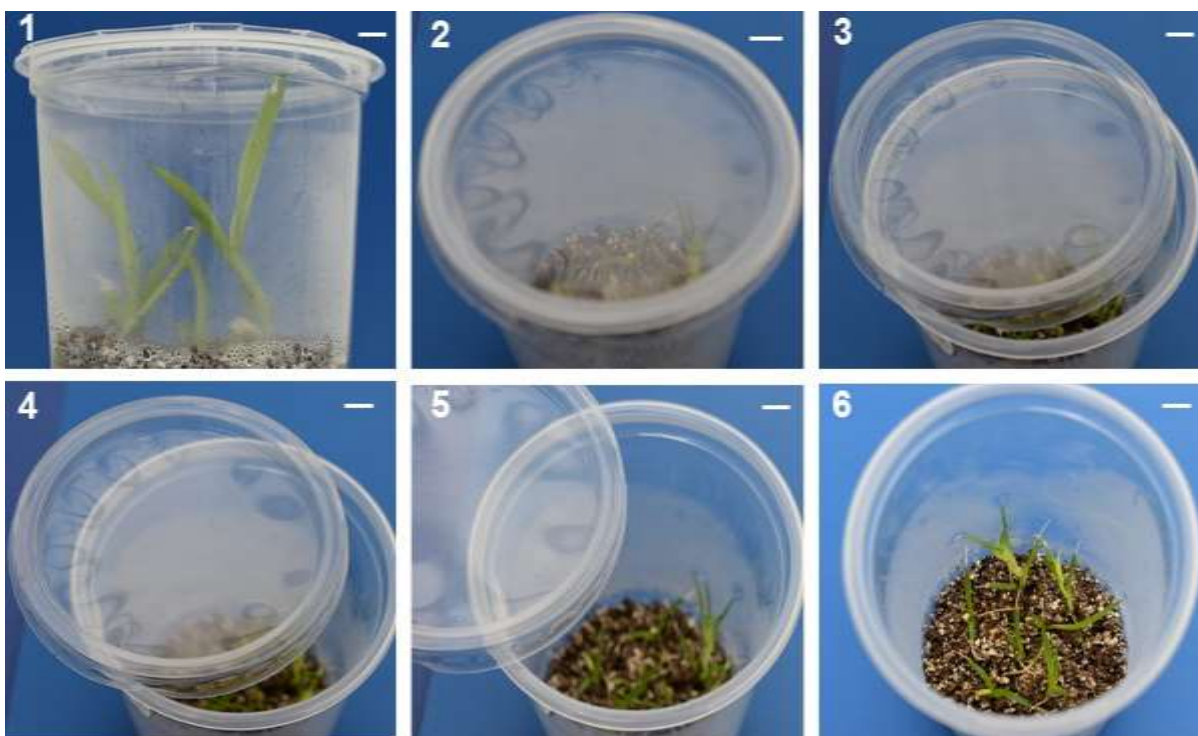


Figura 33. Después de un mes dentro del invernadero, las tapas de los contenedores se retiraron gradualmente en el transcurso de los siguientes dos meses (Imágenes 1-6), hasta que las plantas sobrevivieron a la pérdida de humedad. Barras= 1 cm.

Después de tres meses de permanecer en el invernadero templado, las plantas colocadas en peat moss+agrolita (1:1) tuvieron el 84% de sobrevivencia, mientras que las que se trasplantaron en tepojal+tierra negra (1:1) sobrevivieron el 68% (Figura 34A), por lo que se determinó que de los dos sustratos utilizados, peat moss+agrolita (1:1) fue el que favoreció la mayor sobrevivencia de *A. kavandivi* durante la etapa de aclimatización, asimismo los brotes enraizados que fueron trasplantados en peat moss+agrolita presentaron mayor altura promedio (6.45 cm) desde la base del tallo hasta la hoja más larga (HML), que las trasplantadas tepojal+tierra negra (3.93 cm) después de tres meses dentro del invernadero (Figura 34B). De acuerdo con Yescas-Arreola *et al.* (2016), los sustratos con alto contenido de materia orgánica, tal como la turba, favorecen la sobrevivencia durante la aclimatización de plantas micropropagadas, porque estabilizan el pH, retienen la humedad, promueven la capacidad de intercambio catiónico y facilitan la disponibilidad de nutrientes. El peat moss

además de conservar la humedad del sustrato, combinado con agrolita, permitió una menor compactación de este, favoreciendo el crecimiento y el desarrollo de nuevas raíces, a diferencia del tepojal+tierra negra (1:1) que promueve una mayor compactación. Esto puede explicar el alto porcentaje de sobrevivencia obtenido en peat moss+agrolita (1:1) en comparación con tepojal+tierra negra (1:1) durante la aclimatización de *A. kavandivi*.

Los porcentajes de sobrevivencia logrados en el presente trabajo difieren a los reportados por Yescas-Arreola *et al.* (2016) en individuos de *A. americana* var. *oaxacensis* donde se registró el 100% de sobrevivencia a las seis semanas de aclimatización en arena-turba (1:1) y a los obtenidos por Aguilar-Jiménez y Rodríguez de la O (2018), quienes obtuvieron el 100% de sobrevivencia de plantas de *A. marmorata* utilizando peat moss+agrolita (1:1) y en peat moss+arena de río (1:1) a las tres semanas de su aclimatización, sin embargo en *A. kavandivi* se observó que los porcentajes de sobrevivencia se modificaron en el transcurso del tiempo que duró la aclimatización, ya que al primer mes se obtuvo el 90.5% (peat moss+agrolita) y al tercer mes el 84%, por lo que se sugiere llevar a cabo el registro y monitoreo de las plantas hasta que los valores se estabilicen; en el caso de *A. kavandivi*, ocurrió al tercer mes de aclimatización en el invernadero templado.

Además del alto porcentaje de sobrevivencia, los agaves trasplantados en peat moss+agrolita presentaron rasgos cualitativamente más vigorosos, tales como un color verde más intenso, el ensanchamiento y el surgimiento de nuevas hojas, y el crecimiento en forma de roseta, mientras que las que se trasplantaron en tepojal+tierra negra no formaron nuevas hojas, tuvieron aspecto deshidratado, color verde oscuro, en algunos casos tonalidad rojiza e incluso signos de marchitamiento (Figura 35). Una vez que se determinó que el mejor sustrato fue peat moss+agrolita, este se utilizó para la aclimatización de las plantas provenientes del ensayo 2.

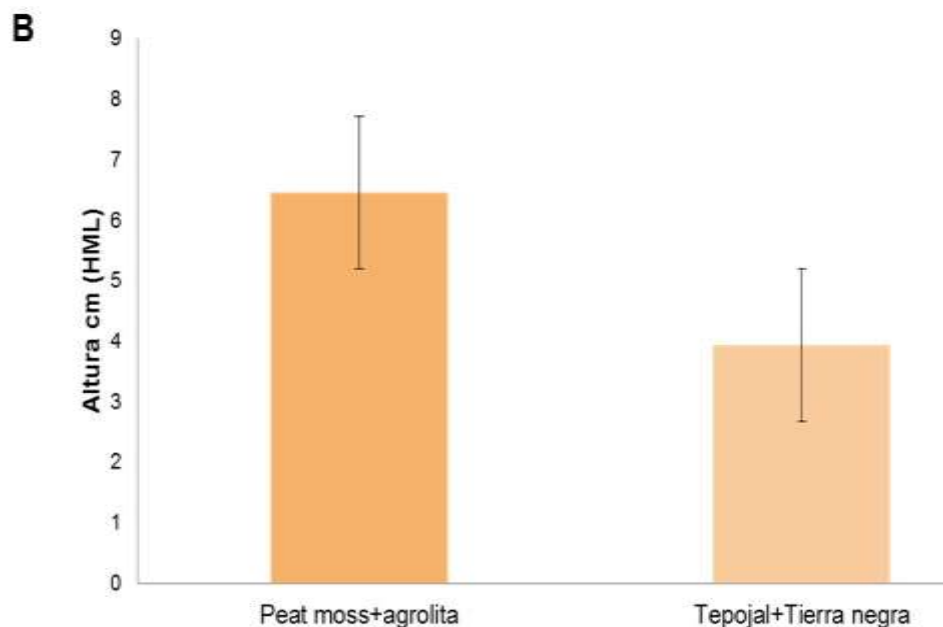
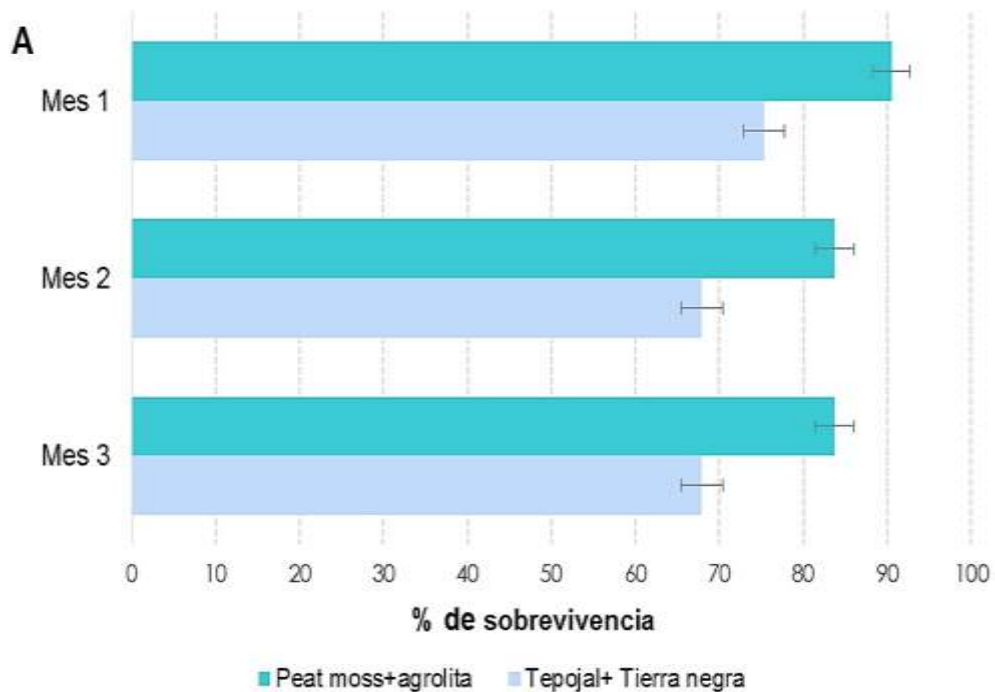


Figura 34. **(A)** Porcentaje de sobrevivencia de *A. kavandivi* durante tres meses en un invernadero templado ($25\pm 5^{\circ}\text{C}$) en dos diferentes sustratos: (1) peat moss+agrolita (1:1) y (2) tepojal+tierra negra (1:1). En el primer mes se registró el 90.5% en el sustrato 1 y el 75.3% en el sustrato 2. Al segundo mes los porcentajes disminuyeron a 84% y 68% de sobrevivencia en los sustratos 1 y 2 respectivamente, mismos que se estabilizaron al tercer mes. **(B)** Altura promedio de las plantas desde la base hasta la hoja más larga (HML) en el sustrato 1 (6.45 cm) y en 2 (3.93 cm), después de tres meses en el invernadero.

Tepojal+tierra negra (1:1)

Peat moss+agrolita (1:1)

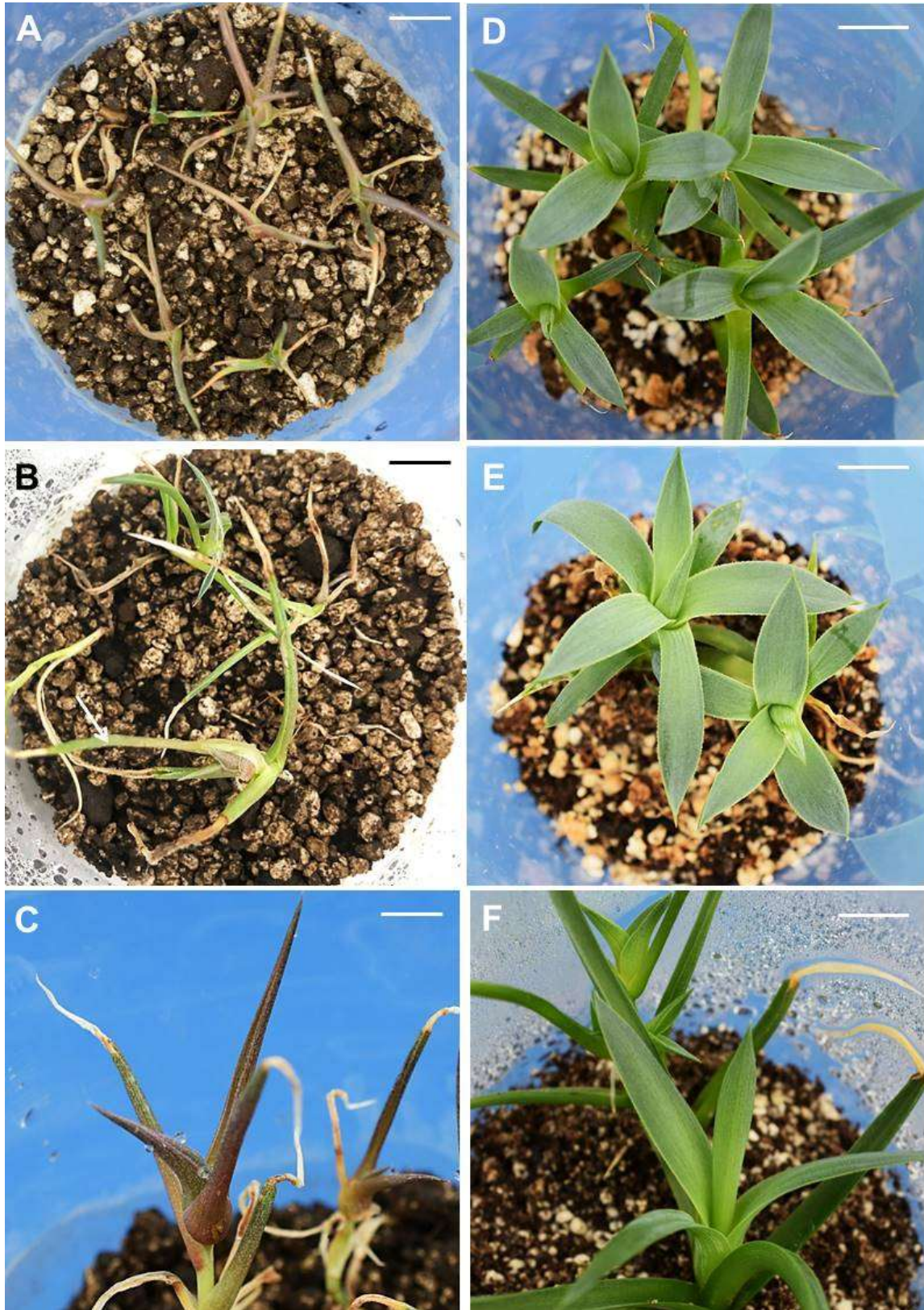


Figura 35. Plantas aclimatizadas en tepojal+tierra negra y peat moss+agrolita después de tres meses en el invernadero. (A y B) Plantas deshidratadas con signos de marchitamiento sin formación de hojas nuevas. (C) En algunas, las hojas nuevas presentaron coloración rojiza y las puntas marchitas. (D-F) Plantas de aspecto normal, se observan las hojas más anchas, el surgimiento de las nuevas en el centro y su crecimiento en forma de roseta (flechas). Barras= 1 cm.

Después de cinco meses en el invernadero, se observó la formación de “hijuelos” o brotes adventicios en algunas de las plantas provenientes de explantes de hoja y tallo creciendo en peat moss+agrolita y de plantas germinadas *in vitro*. Los “hijuelos” se formaron a partir de yemas axilares y crecieron por encima del nivel del sustrato, lo que permitió observar que el desarrollo de raíces fue independiente a la de la planta que los originó (Figura 36).

La formación de “hijuelos” también se observó después de tres meses en plantas obtenidas de una plántula germinada *in vitro* en medio MS+L-Arginina que inicialmente presentó síntomas de hiperhidricidad, tales como el desarrollo de brotes con hojas delgadas de aspecto vítreo y translúcido, estos brotes sobrevivieron al cultivo *in vitro*, formaron raíces, continuaron su desarrollo normal y posteriormente fueron aclimatizados (Figura 37).

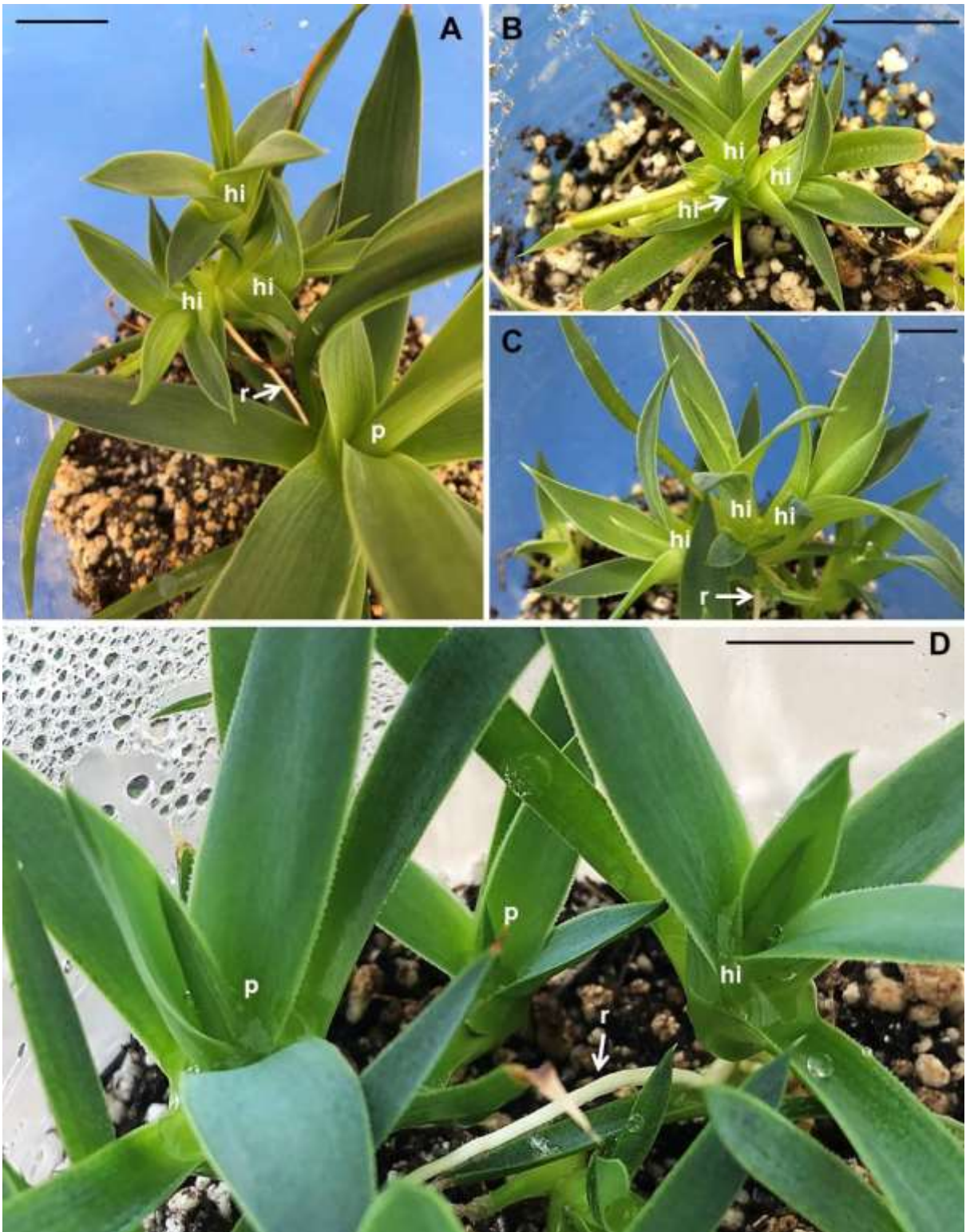


Figura 36. Formación de “hijuelos” en plantas aclimatizadas de *A. kavandivi* en peat moss+agrolita. (A-C) Hijuelos (hi) formados a partir de plantas (p) germinadas *in vitro* después de seis meses en el invernadero. (D) Hijuelo (hi) formado después de cuatro meses en invernadero, en una planta proveniente de explante de hoja (0/0). En A, C y D se observa una raíz (r) surgiendo de los hijuelos. Barras= 1 cm.

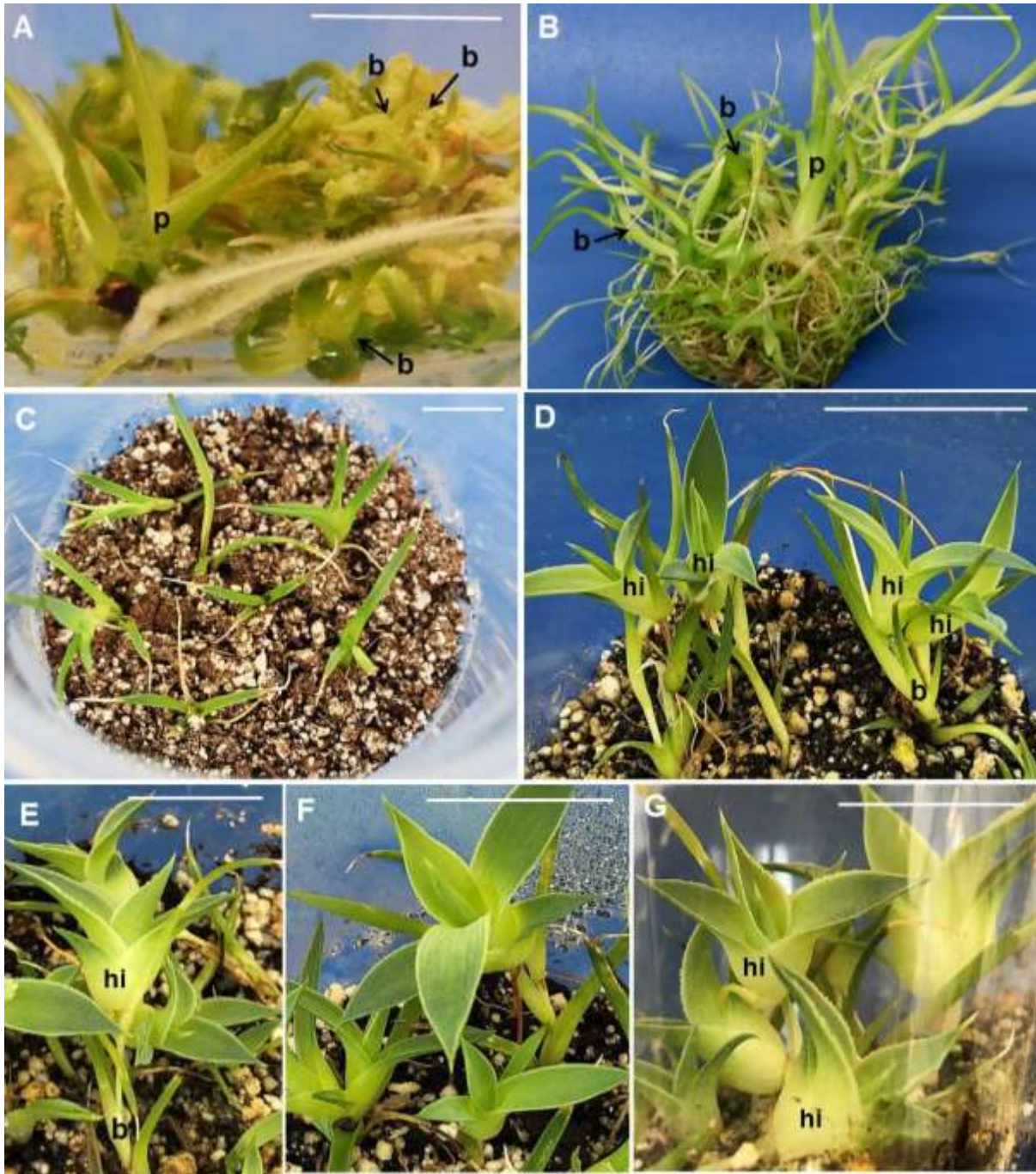


Figura 37. (A) Brotes (b) de aspecto hiperhidratado que se generaron de una plántula (p) germinada en MS50%+L-Arginina. (B) Durante la elongación, la plántula (p) y los brotes (b) continuaron su desarrollo normal. (C) Después de un mes en el invernadero, el aspecto translúcido comenzó a disminuir y se observó la formación de nuevas hojas en el centro de la roseta. (D) Al segundo mes, las hojas se comenzaron a engrosar y a partir de las yemas axilares comenzaron a surgir “hijuelos” (hi). (E-G) Al tercer mes, las plantas incrementaron su tamaño y el desarrollo fue análogo al de las plantas generadas a partir de explantes. Barras= 1 cm.

En general, las plantas que crecieron en peat moss+agrolita formaron hojas nuevas durante el primer mes en el invernadero. Las hojas se caracterizaron por ser delgadas, brillosas y con bordes lisos; en el transcurso del segundo y tercer mes perdieron su brillo y comenzaron a engrosarse, posteriormente, el margen cambió de liso a irregular y al quinto mes ya se pudo observar el margen finamente denticulado y una espina terminal de color pardo-rojiza en cada hoja (Figura 38).



Figura 38. Cambios en el aspecto de las hojas de *A. kavandivi* durante la aclimatización en peat moss+agrolita. (a) Hojas delgadas, brillosas y con margen liso. (b y c) Pérdida de brillo y engrosamiento. (c y d) Márgenes denticulados. (e) Al quinto mes ya se observó una espina terminal pardo-rojiza. Barra= 1 cm.

Al finalizar los experimentos se obtuvo un total de 960 plantas aclimatizadas, provenientes de la suma de las obtenidas de los dos ensayos con BA/2,4-D (869 plantas) y de los brotes y plantas obtenidas de germinación *in vitro* (91 plantas) (Figura 39).

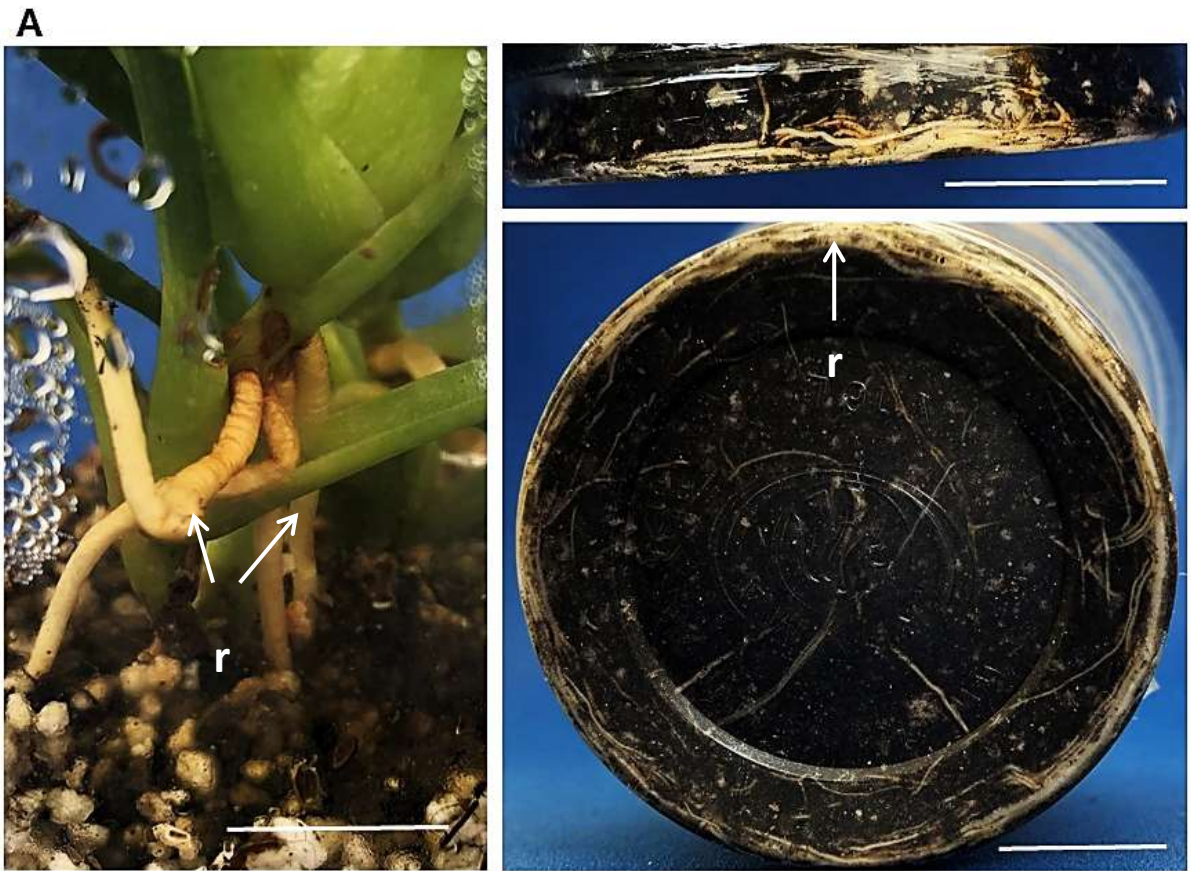


Figura 39. **(A)** Después de cuatro a cinco meses en el invernadero, las plantas formaron raíces (**r**) cortas y gruesas por arriba del sustrato (izq: planta de explante de tallo 1/0.1) y raíces delgadas y largas que crecieron por debajo del sustrato alrededor de la base del contenedor (der: planta de explante de hoja 3/0). **(B)** Contenedores plásticos utilizados para la aclimatización en el invernadero de vitroplantas de *A. kavandivi*. Barras= 1 cm.

Eficiencia de la micropropagación

Los ensayos para la propagación *in vitro* de *Agave kavandivi* iniciaron con la germinación *in vitro* de 375 semillas, de las que solo germinaron 39, esto representa un bajo porcentaje de germinación (10.4%) e indica una baja viabilidad en semillas almacenadas por un periodo prolongado. En los ensayos con reguladores de crecimiento, al utilizar las técnicas de micropropagación, se utilizaron 125 plántulas, generando 869 nuevos individuos y obteniendo un alto porcentaje de propagación (695.2%). El número de brotes obtenidos resulta de multiplicar siete veces el número inicial de plántulas.

En este trabajo no es comparable el número de plantas obtenidas de la germinación *in vitro* contra las obtenidas de la micropropagación, debido al bajo porcentaje de germinación por la escasa viabilidad de las semillas. Estos valores posiblemente se modificarían si se utilizaran semillas recién colectadas. No obstante, la eficiencia de la propagación por cultivo de tejidos fue demostrada en el presente trabajo.

Cabe mencionar que la propagación por semillas implica la obtención de individuos en una proporción 1:1 y asegura la variabilidad genética, sin embargo, esta puede ser conservada en las plantas micropropagadas utilizando plántulas germinadas *in vitro* como fuente de explantes, de esta manera los brotes obtenidos a partir de estas conservarán la variabilidad genética de la plántula de la que provienen.

CONCLUSIONES

- El medio MS50%+L-Arginina fue el más efectivo para la germinación *in vitro* de semillas de *A. kavandivi*, al promover el máximo porcentaje de germinación en menor tiempo y favorecer la velocidad de germinación un 30% que en el medio sin el aminoácido.
- El carbón activado en el medio de cultivo (MS50%+CA 1.5 mgL⁻¹) promovió la elongación de las plántulas germinadas y redujo los problemas de oxidación en estas y en los explantes.
- El empleo de enjuagues con antioxidantes previo a la siembra y los subcultivos frecuentes, permitieron alcanzar mayores porcentajes de explantes sobrevivientes (60-80%) durante los dos primeros meses de inducción.
- La formación de brotes *in vitro* se logró en medio MS+BA/2,4-D. La regeneración ocurrió por organogénesis directa a partir de explantes de tallo y segmentos basales de hojas y por organogénesis indirecta principalmente a partir de las hojas.
- El mejor tratamiento en los explantes de hoja fue BA/2,4-D 1/0.1 mgL⁻¹ con un promedio de 21 b/exp al emplear la solución antioxidante y 1/0.1 mgL⁻¹ (17 b/exp) en ausencia de antioxidantes.
- El mejor tratamiento en los explantes de tallo fue BA 3 mgL⁻¹ con un promedio de 17.6 b/exp al emplear la solución antioxidante y BA/2,4-D 1/0.1 mgL⁻¹ (15 b/exp) en ausencia de antioxidantes.

- El explante más regenerativo para la propagación *in vitro* de *A. kavandivi* fue la base de las hojas, al formar el mayor número promedio de brotes/explante (21 b/exp en BA/2,4-D 1/0.1 mgL⁻¹).
- La citocinina promovió una mayor proliferación de brotes en ambos tipos de explantes, al registrarse los promedios más altos en los tratamientos con BA, mientras que la combinación BA+2,4-D determinó una longitud promedio mayor de los brotes y altos porcentajes de enraizamiento.
- El enraizamiento se presentó de manera espontánea después del primer mes en el medio de elongación (MS+CA 1.5 mgL⁻¹), alcanzando los mayores porcentajes en brotes provenientes de las concentraciones más bajas de RCV.
- Peat moss+agrolita fue el sustrato que favoreció la mayor sobrevivencia (84%) y la mayor altura promedio (6.45 cm) de los brotes enraizados durante la aclimatización de *A.kavandivi* después de tres meses en el Invernadero templado de la Facultad de Ciencias.

PERSPECTIVAS

La información generada en este trabajo sirve como un antecedente para dar continuidad a los estudios *in vitro* de *A. kavandivi* y otras especies del mismo género, entre los que se sugieren:

- 1) Explorar el potencial regenerativo de las hojas en otras especies del género *Agave*.
- 2) Repetir los mejores tratamientos con explantes procedentes de semillas recién cosechadas y/o colectadas de varios individuos.
- 3) Realizar más ensayos del empleo de soluciones antioxidantes para obtener un mayor número de regenerantes en *A. kavandivi*.
- 4) Evaluar la variabilidad genética de plantas de *A. kavandivi* obtenidas *in vitro*, para conocer si ésta se ve alterada con el proceso de micropropagación.
- 5) Realizar los análisis químicos de las plantas regeneradas *in vitro* para evaluar el contenido de sapogeninas sugerido para la especie u otros compuestos de importancia médica.
- 6) Este trabajo sirve como base para generación de un plan de conservación *ex situ* e *in situ* de la especie estudiada.

ANEXOS

ANEXO 1. Clasificación taxonómica y descripción botánica de *Agave kavandivi*

REINO: Plantae

DIVISIÓN: Magnoliophyta

CLASE: Liliopsida

ORDEN: Asparagales

FAMILIA: Asparagaceae

SUBFAMILIA: Agavoideae

GÉNERO: *Agave* L. 1753

SUBGÉNERO: *Littaea* (Tagl.) Baker

ESPECIE: *Agave kavandivi* García-Mend. et Chávez-Rendón

GRUPO: Striate



***Agave kavandivi* García-Mend. et Chávez-Rendón, sp. Nov**

(García-Mendoza y Chávez-Rendón, 2013)

Plantas rosetófilas perennes, coloniales; rosetas compactas, hemiesféricas, 30-50(-60) cm de alto, 40-60(-70) cm de diámetro, **tallos decumbentes** hasta 50 cm de largo. **Hojas** 60-80(-100) por individuo, 25-35(42) cm de largo, (1.2-)-1.5-2 cm de ancho en la parte media, 1.2-1.8 cm de ancho en la base, angostamente elípticas; **vainas** 2-2.5 cm de largo, 2-3 cm de ancho, blanquecinas, deltoides, carnosas; **láminas** planas, rígidas, erectas o algo incurvadas, coriáceas, glaucas o glaucoamarillentas, estriadas, con papilas dispersas sobre algunas venas; **margen recto**, finamente denticulado, escabroso, amarillento; **espina terminal**

6-8 (-15) mm de largo, 1-2 mm de diámetro, cónico-subulada, plana cerca de la base en haz, pardo-rojiza. **Inflorescencias** 60-150(-250) cm de largo, inclinadas o arqueadas; **pedúnculo** purpúreo o pardo; espiga 40-70(-120) cm de largo, en el tercio o mitad superior, densa; **brácteas del pedúnculo** (6-)11-15 cm de largo, 2-5(-12) mm de ancho en la base, disminuyendo en tamaño hacia el ápice, lineares, base deltoide, rojizas a purpúreas, espina ligeramente marcada; **brácteas florales** (2.5-)3-6.5 cm de largo, (1-)3-5 mm de ancho en la base, lineares, base deltoide, las superiores más cortas; pedicelos ca. 1 mm de largo. **Flores** (2.2-)2.5-3.3 cm de largo, campanuladas, purpúreas; **ovario** (6-)10-14 mm de largo, 3-5 mm de ancho, cilíndrico, sin cuello, sulcado, el ápice se proyecta escasamente en el interior del tubo, verde o verde-rojizo; **tubo del perigonio** (5-)8-15 mm de largo, 9-12 mm de diámetro en la porción distal, algo sulcado; **tépalos** 1-1.4 cm de largo, 4-7 mm ancho los externos ligeramente menos angostos que los internos, éstos con una costilla triangular 4-4.5 mm de ancho, ovados, erectos, ligeramente incurvados en el ápice; **estambres con filamentos** (2.5-)3-4.7 cm de largo, insertos en la parte media del tubo, purpúreos; **anteras** (7-)10-15 mm de largo, 1-2 mm de ancho, purpúreas; estilo 3-4.5 cm de largo. **Cápsulas** 1-1.8 cm de largo, 0.7-1.2 cm de diámetro, elipsoidales y trilobadas, con estrías transversales, con una marca anular en el ápice, sésiles, rostradas, verde-rojizas, con el perianto persistente; **semillas** 2-3(-3.8) mm de largo, 2-2.4 mm de ancho, negras, engrosadas y ornamentadas con costillas transversales en la cara distal convexa

ANEXO 2. Formulación del medio de cultivo Murashige y Skoog (1962)

	Reactivo	mgL⁻¹
Macronutrientes	NH ₄ NO ₃	1650
	KNO ₃	1900
	MgSO ₄ (7H ₂ O)	370
	KH ₂ PO ₄	170
	CaCl ₂	440
Micronutrientes	KI	0.83
	H ₃ BO ₄	6.2
	MnSO ₄ (4H ₂ O)	22.3
	ZnSO ₄ (7H ₂ O)	16.89
	Na ₂ MoO ₄ (2H ₂ O)	0.25
	CuSO ₄ (5H ₂ O)	0.025
	CoCl ₂ (6H ₂ O)	0.025
	Na ₂ EDTA	37.3
	FeSO ₄ (7H ₂ O)	27.8
Compuestos orgánicos	Inositol	100
	Ácido nicotínico	0.5
	Piridoxina HCl (B ₆)	0.5
	Tiamina HCl (B ₂)	0.1
	Glicina	2
	Sacarosa	30 000
	Agar	8 000

pH: 5.7-5.8

ANEXO 3. Total de especies del género *Agave* incluidas en la NOM-059-SEMARNAT-2010. En las referencias se señalan las cultivadas *in vitro*.

Especie	Categoría de riesgo NOM-059-SEMARNAT-2010	Referencias
<i>A. abisaii</i>	A	--
<i>A. andreae</i>	A	--
<i>A. bracteosa</i>	P	Pérez Molphe Balch <i>et al.</i> , 2012
<i>A. chiapensis</i>	Pr	Pérez Molphe Balch <i>et al.</i> , 2012
<i>A. congesta</i>	Pr	--
<i>A. dasylirioides</i>	A	Kean Galeno, 2017
<i>A. guiengola</i>	P	Chávez-Ortiz <i>et al.</i> , 2021
<i>A. gypsophila</i>	A	--
<i>A. impressa</i>	A	--
<i>A. kewensis</i>	P	Santíz <i>et al.</i> , 2012
<i>A. kristenii</i>	A	--
<i>A. nizandensis</i>	P	Sánchez Pérez <i>et al.</i> , 2009 Pérez Molphe Balch <i>et al.</i> , 2012
<i>A. ornithobroma</i>	Pr	Pérez Molphe Balch <i>et al.</i> , 2012
<i>A. pablocarrilloi</i>	A	--
<i>A. parrasana</i>	Pr	Santacruz-Ruvalcaba <i>et al.</i> , 1999
<i>A. parviflora</i>	A	Anaya-Dick <i>et al.</i> , 2010 Anaya-Dick, 2011 Kancab Uc, 2016
<i>A. peacockii</i>	Pr	Pérez Molphe Balch <i>et al.</i> , 2012
<i>A. polianthiflora</i>	A	--
<i>A. titanota</i>	A	Pérez Molphe Balch <i>et al.</i> , 2012
<i>A. vera-cruz</i>	P	Tejavathi y Gayathamma, 2007
<i>A. victoriae-reginae</i>	P	Rodríguez-Garay <i>et al.</i> , 1996 Martínez-Palacios <i>et al.</i> , 2003 Pérez Molphe Balch <i>et al.</i> , 2012 Rivera Fuentes, 2015 González Cervantes <i>et al.</i> , 2020
<i>A. vizcainoensis</i>	A	--

A= Amenazada; Pr= Sujeta a protección especial; P= En peligro de extinción.

LITERATURA CITADA

- Abdelnour-Esquivel A. y J. Vicent-Escalant. 1994. Conceptos básicos del cultivo de tejidos vegetales. Centro agronómico tropical de investigación y enseñanza. Costa Rica. Turrialba. 43 pp.
- Abdelwahd R, N. Hakam, M. Labhilili, S. UduPA. 2008. Use of an adsorbent and antioxidants to reduce the effects of leached phenolics *in vitro* plantlet regeneration of faba bean. *African Journal of Biotechnology* 7:997-1002.
- Aguilar-Jiménez D. y J.L. Rodríguez de la O. 2018. Micropropagación y aclimatación de Maguey Pitzometl (*Agave marmorata* Roezl) en la Mixteca Poblana. *Revista Colombiana de Biotecnología* 2:124-131.
- Alvez B. y M. Oropeza. 2015. Efecto de Dicamba y de ácido 2,4-Diclorofenoxiacético sobre la embriogénesis somática en caña de azúcar. *Revista Colombiana de Biotecnología* (12) 2:85-94.
- Amiot M., F. Forget y P. Goupy. 1996. Polyphenol, oxidation and colour: progress in the chemistry of enzymatic and non-enzymatic derived products. *Herba Polonica* 42: 237-247.
- Anaya-Dyck J.M., A. Ochoa-Meza, D. Martínez-Heredia y S.F. Moreno-Salazar. 2010. Organogénesis indirecta de *Agave parviflora*, una especie en peligro y con alto potencial económico. En: VII Simposio Internacional sobre la Flora Silvestre en Zonas Áridas, del 17 al 19 de marzo 2010. Sonora, México, p: 124-134.
- Anaya-Dyck J.M. 2011. Organogénesis indirecta de *Agave parviflora*, una especie en peligro y con alto potencial económico. Tesis. (Ingeniero Agrónomo). Universidad de Sonora. México. 63 pp.
- Angeles Vázquez B.V., Y. Mercado Flores, A. García Mendoza, B. Rodríguez Garay, M.A. Anducho Reyes y J. Álvarez Cervantes. 2017. Embriogénesis somática: Una alternativa para el cultivo masivo del maguey pulquero *Agave salmiana* var. *salmiana*. *Ciencias Multidisciplinarias (SIMCI)*. Proceedings-©ECORFAN-México 37-50.
- Angeles-Espino A., A.J. Valencia-Botín, G. Virgen-Calleros, C. Ramírez-Serrano, L. Paredes-Gutiérrez y S. Hurtado-De la Peña. 2012. Micropropagación de *Agave tequilana* Weber var. *azul*. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 15:693-698.
- Arizaga S. y E. Ezcurra. 2002. Propagation Mechanisms in *Agave macroacantha* (Agavaceae), a tropical arid-land Succulent Rosette. *American Journal of Botany* 4:632-641.

- Arzate-Fernández A.M. y R. Mejía-Franco. 2011. Capacidad embriogénica de callos inducidos en ejes embrionarios cigóticos de *Agave angustifolia* Haw. *Revista Fitotecnia Mexicana* 34:101-106.
- Aureoles-Rodríguez F., J.L. Rodríguez-de la O, J.P. Legaria-Solano, J. Sahagún-Castellanos y M.G. Peña-Ortega. 2008. Propagación *in vitro* del 'maguey bruto' (*Agave inaequidens* Koch), una especie amenazada de interés económico. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 14:263-269.
- Azofeifa A. 2009. Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. *Agronomía mesoamericana* 20(1):153-175.
- Barry J.M. y J.S. Barry. 1989. Arginine Metabolism in Developing Soybean Cotyledons. *Plant Physiology* 91:170-174.
- Benerjee N., D. Vuylsteke y E. De Langhe. 1985. Meristem. Culture of Musa. Histo-morphological studies of shoot bud proliferation. En: Withers, L.A. y Alderson P.G. (eds.): *Plant tissue culture and its agricultural applications*. London: Butter worth's. p: 139-147.
- Bhojwani S.S. y D.P. Kumar. 2013. *Plant Tissue Culture: An Introductory Text*. Springer New Delhi Heidelberg New York Dordrecht London. 318 pp.
- Bidwell, R.S. 1979. *Fisiología vegetal*. AGT Editor. México. D.F. p: 409-438.
- Binh L.T, L.T. Muoi, H.T.K. Oanh, T.D Thang y D.T Phong. 1990. Rapid propagation of *Agave* by *in vitro* tissue culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 23:67-70.
- Bray E., J. Bailey, y E. Weretilnyk. 2000. Responses to abiotic stresses. En: Buchanan, B; Gruissem, W; Jones, R. eds. *Biochemistry and molecular biology of plants*. *American Society of Plant Physiologists*. Maryland, USA. p: 1158-1203.
- Calva C.G. y L.R. Ríos. 1999. Cultivo de callos y acumulación de metabolitos secundarios. En: Rodríguez V.R., C.G. Calva, R.E Ramos, M.A Salazar. (eds.) *Aspectos aplicados de la biotecnología*. Instituto Politécnico Nacional. México. p: 267-301.
- Cárdenas A. y A. Villegas. 2002. Potencial osmótico del medio de cultivo con diferentes componentes para la propagación *in vitro*. *Revista Fitotecnia Mexicana* 25(2):213-217.
- Cassells R. y F. Curry. 2001. Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineer. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 64:145-157.

- Chávez-Ortiz L.I., J.F. Morales-Domínguez, A. Rodríguez-Sahagún y E. Pérez-Molphe-Balch. 2021. *In vitro* Propagation of *Agave guiengola* Gentry Using Semisolid Medium and Temporary Immersion Bioreactors. *Phyton-International Journal of Experimental Botany* 90(3):2-9.
- Colunga-García-Marín P., A. Larqué, L.E. Eguiarte, D. Zizumbo-Villarreal. 2007. El futuro de lo ancestral. En: En lo Ancestral hay Futuro: del tequila, los mezcales y otros agaves. M P Colunga-García, A. Larqué, L. E. Eguiarte, D. Zizumbo-Villarreal (eds). Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C. Mérida, Yucatán, México. p: 19-34.
- CONABIO (Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad). 2020. ¿Por qué se pierde la biodiversidad? Página en red: www.biodiversidad.gob.mx. Consultada 28 de febrero 2020.
- Concepción O., L. Nápoles, A.T. Pérez, M. Hernández, N. Peralta y R. Trujillo. 2005. Efecto de tres antioxidantes en el cultivo *in vitro* de ápices de guayaba (*Psidium guajava* L.). Relación entre el origen del explante y el contenido de compuestos fenólicos. *Cultivos Tropicales* 26(1):33-39.
- Cruz M., M. Acosta M. Leiva, Y. Alvarado y M. Lezcano. 2002. Evaluación del efecto del complejo carbendazim-β-ciclodextrina para el control de hongos filamentosos contaminantes del cultivo *in vitro* de plantas. *Biotecnología Vegetal* 2(2):73-76.
- Cruz-García H., G.V. Campos-Ángeles, J.R. Enríquez del Valle, V.A. Velasco-Velasco y G. Rodríguez-Ortiz. 2017. Senescencia foliar en plantas micropropagadas de *Agave americana* durante su aclimatización. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 8(2):381-391.
- Debergh P. y R.H. Zimmerman. 1991. *Micropropagation: technology and Application*. Kluwer Academic Publishers. 484 pp.
- Domínguez-Rosales M.S., M.L. González Jiménez, C. Rosales Gómez, C. Quiñones Valles, S. Delgadillo-Díaz de León, S.J. Mireles-Ordaz y E. Pérez-Molphe-Balch. 2008a. El cultivo *in vitro* como herramienta para el aprovechamiento, mejoramiento y conservación de especies del género *Agave*. *Investigación y Ciencia* 16:53-62.
- Domínguez-Rosales M.S, A.G. Alpuche-Solís, N.L. Vasco-Méndez y E. Pérez- Molphe-Balch. 2008b. Efecto de citocininas en la propagación *in vitro* de Agaves mexicanos. *Revista Fitotecnia Mexicana* 31:317-322.
- Eguiarte L.E., V. Souza y A. Silva-Montellano. 2000. Evolución de la familia Agavaceae: Filogenia, biología reproductiva y genética de poblaciones. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. Universidad Nacional Autónoma de México 66: 131-151.

- Enríquez del Valle J.R., G. Carrillo Castañeda y J.L. Rodríguez de la O. 2005. Sales inorgánicas y ácido indolbutírico en el enraizado *in vitro* de brotes de *Agave angustifolia*. *Revista fitotecnia mexicana* 28(2):175-178.
- Enríquez V.J.R. y B.R. Díaz. 1994. Experiencias sobre propagación *in vitro* de plantas. Instituto Tecnológico Agropecuario de Oaxaca. Serie Cuadernos de los Centros. 37 pp.
- Ferl R. y A.L. Paul. 2000. Genome organization and expression. En: Buchanan B., W. Gruissem y R. Jones. (eds.). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. USA: American Society of Plant Physiologists. p: 312-357.
- Flores-Abreu I.N., R.E. Trejo-Salazar, L.L. Sánchez-Reyes, S.V. Good, S. Magallón, A. García-Mendoza y L.E. Eguiarte. 2019. Tempo and mode in coevolution of *Agave sensu lato* (Agavoideae, Asparagaceae) and its bat pollinators, Glossophaginae (Phyllostomidae). *Molecular Phylogenetics and evolution* 133:176-188.
- Fridborg G., M. Pedersen, L.E. Landstrom y T. Eriksson. 1978. The Effect of Activated Charcoal on Tissue Cultures: Adsorption of Metabolites Inhibiting Morphogenesis. *Physiology Plant* 43:104-106.
- Galván R. y S. Zamudio. 2013. Una nueva especie de *Agave* del subgénero *Littaea* (Agavaceae) de la Sierra Madre Oriental, México. *Acta Botánica Mexicana* 105:1-10.
- García-Mendoza, A.J. 2002. Distribution of *Agave* (Agavaceae) in Mexico. *Cactus and Succulent Journal (US)* 74(4):177-187.
- García-Mendoza A.J. 2007. Los agaves de México. *Ciencias* 87:17-23.
- García-Mendoza A.J. 2011. Agavaceae. En: Medina, R. (ed.) *Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán*. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D. F. 88:1-95.
- García-Mendoza A.J. y C. Chávez-Rendón. 2013. *Agave kavandivi* (Agavaceae: grupo *Striatae*), una especie nueva de Oaxaca, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 84:1070-1076.
- García-Mendoza A.J., I.S. Franco-Martínez y D. Sandoval-Gutiérrez. 2019. Cuatro especies nuevas de *Agave* (Asparagaceae, Agavoideae) del sur de México. *Acta Botánica Mexicana* 126:1-18.
- Gentry H.S. 1982. *Agaves of Continental North America*. University of Arizona Press, Tucson. 670 pp.

- George E.F. 1993. Plant propagation by tissue culture. Chapter 5, Part1. 2nd Ed. Exegetics Ltd. p. 130-143.
- George E.F., M.A. Hall y G.J. De Klerk. 2008. Plant Propagation by Tissue Culture. 3rd edition. The Netherlands. Springer. 504 pp.
- George E.F. y P.C. Debergh. 2008. Chapter 2. Micropropagation: Uses and Methods. En: George E. F., Hall M. A y Klerk G. J. (eds.). Plant Propagation by Tissue Culture. 3a Edición. Springer. Dordrecht, The Netherlands. p: 29-35.
- Gisbert-Doménech C. 2010. Morfogénesis: la ruta organogénica *versus* la ruta embriogénica. Universidad Politécnica de Valencia. 5 pp.
- Gonzales-Zertuche L. y A. Orozco-Segovia. 1996. Métodos de análisis de datos en la germinación de semillas, un ejemplo: *Manfreda brachystachya*. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 58:15-30.
- González G., S. Alemán, R. Trujillo, M. Keb, E. Abreu, F. Barredo, M.L. Robert, R. Ortiz y M.T. Cornides. 2004. El cultivo *in vitro* como alternativa de la recuperación henequenera (*Agave fourcroydes*). *Biotecnología Aplicada* 21(144):44-48.
- González Cervantes G., A.G. Martínez Enríquez, I.A. Ortiz Sánchez, E.C. Gamero Posada y S. Valdez Ortega. 2020. Germinación *in vitro* de *Agave victoriae-reginae* T. Moone en medio de cultivo orgánico. *Sapiens* 1:16-17.
- Guerra O.J., A. Meneses, A.M. Simonet, C.N. Macías, A. Gómez y A.J. Escario. 2008. Saponinas esteroidales de la planta *Agave brittoniana* (Agavaceae) con actividad contra el parásito *Trichomonas vaginalis*. *Revista Biología Tropical* 4:1645-1652.
- Guilfoyle, T., G. Hagen, T. Ulmasov y J. Murfett. 1998. How does auxin turn on genes? *Plant Physiology* 118:341-347.
- Guillén S., A. Martínez-Palacios, H. Martínez y J.G. Martínez-Ávalos. 2015. Organogénesis y embriogénesis somática de *Beaucarnea inermis* (Asparagaceae), una especie amenazada del noreste de México. *Botanical Sciences* 93(2):221-230.
- Halpern M., A. Bar-Taly, M. Ofeky, D. Minzy, T. Mullerx y U. Yermiyahu. 2014. The Use of Biostimulants for Enhancing Nutrient Uptake. Chapter 3. Amino Acids. *Advances in Agronomy* 130:9-14.
- Hastie T.J. y D. Pregibon. 1992. Generalized linear models. Chapter 6 of Statistical Models in S: Chambers J.M y T.J. Hastie. Wadsworth y Brooks/Cole. 608 pp.

- Hernández Y. y M.E. González. 2010. Efectos de la contaminación microbiana y oxidación fenólica en el establecimiento *in vitro* de frutales perennes. *Cultivos Tropicales* 31(4):58-69.
- Jaimes-De Lindarte G. y C. Bustamante-Corzo. 1997. Fundamentos de Biotecnología Vegetal. *Respuestas of Engineering Journal* 2(1):18-29.
- Jiménez González E.A. 1998. Generalidades del cultivo *in vitro*. En: J.N. Pérez Ponce (ed). Propagación y mejora genética de Plantas por Biotecnología. Vol. 1. Instituto de Biotecnología de Plantas. Santa Clara, Cuba. p: 13-24.
- Kakkar R.K., P.K. Nagar, P.S. Ahuja y V.K. Rai. 2000. Polyamines and Plant Morphogenesis. *Biologia Plantarum* 43:1-1.
- Kancab Uc R.A. 2016. Diseño de un protocolo para la propagación *in vitro* de *Agave parviflora* Torr. mediante organogénesis directa. Tesis de Maestría (Ciencias). Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. Hermosillo Sonora. 65 pp.
- Kean Galeno T. 2017. Establecimiento de un banco de germoplasma de *Agave* spp. Tesis de Licenciatura (Bióloga). Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma del Estado de México. México. 68 pp.
- Kevers C., T. Franck, R.J. Strasser, J. Dommes y T. Gaspar. 2004. Hyperhydricity of micropropagated shoots: a typically stress-induced change of physiological state. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 77:181-191.
- King J.E. y D.J. Gifford. 1997. Amino Acid utilization in seeds of loblollypine during germination and early seedling growth (L-arginine and arginase activity). *Plant Physiology* 113:1125-1135.
- Kozai T. 1991. Photoautotrophic micropropagation. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 27:47-51.
- Kozai T., Y. Koyama e I. Watanabe. 1988. Multiplication of potato plantlets *in vitro* with sugar free medium under high photosynthetic photon flux. *Acta Horticulturae* 230:121-128.
- Leifert C, C.E. Morris y W.M. Waites. 1994. Ecology of microbial saprophytes and pathogens in tissue culture and field grown plants: reason for contamination problems *in vitro*. *Critical Reviews in Plant Sciences* 13:39-183.
- Leifert C. y A. Cassells. 2001. Microbial hazards in plant tissue and cell cultures. *In Vitro Cellular and Developmental Biology- Plant* 37:133-138.

- Leifert C., W.M. Waites, H. Camotta y J.R. Nicholas. 1989. *Lactobacillus plantarum*; a deleterious contaminant of plant tissue. *Journal of Applied Microbiology* 67:363-370.
- Litz R.E. y R.L. Jarret. 1993. Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos: embriogénesis somática y organogénesis. Capítulo 7. En: Roca W.M. y L.A. Mroginski (eds). Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura tropical. p: 144-171.
- Lock G.W. 1962. Sisal: Thirty Years' Sisal Research in Tanzania (Tropical Agriculture Series) John Wiley & Sons, Nueva York. 365 pp.
- López-Escamilla A.L. 2000. Organogénesis *in vitro* y adquisición de la competencia morfogénica a partir de embriones maduros de *Picea chihuahuana* Martínez (Gymnospermae), especie en peligro de extinción. Tesis de Doctorado en Ciencias (Biología). Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México. 130 pp.
- López-Gómez P., L. Iracheta-Donjuan, M. Castellanos-Juárez, I. Méndez-López, A. Sandoval-Esquivez, J.F. Aguirre-Medina, M.C. Ojeda-Zacarías y A. Gutiérrez-Díez. 2010. Influencia del explante y medio de cultivo en la embriogénesis somática en hojas de café. *Revista fitotecnia mexicana* 33(3):205-213.
- Manjula S., A. Thomas y D.B, Nair. 1997. *In vitro* plant regeneration of *Aristolochia indica* through axillary shoot multiplication and organogenesis. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 51:145-8.
- Marcano, D. y A. Pire. 1993. Evaluación de diferentes desinfectantes y fungicidas en el control de sarna común *Streptomyces scabies* en semilla prebásica de *Solanum tuberosum* L. *Agronomía Tropical* 43(5):203-215.
- Martínez S. 1995. Evaluación de poblaciones obtenidas por cultivo *in vitro* e inducción de mutaciones en plátanos (*Musa sp*). *Centro Agrícola* 19(2):93-96.
- Martínez-Palacios A., M.P. Ortega-Larrocea, M.V. Chávez y R. Bye. 2003. Somatic embryogenesis and organogenesis of *Agave victoriae-reginae*: Considerations for its conservation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 74:135-142.
- Mauricio Salgado R. 2019. Propagación *in vitro* de *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck y *Agave obscura* Schiede (Agavaceae). Tesis de Licenciatura (Bióloga). Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México. 90 pp.
- Miguel-Luna M.E., J.R Enríquez del Valle, V.A. Velasco- Velasco, Y. Villegas Aparicio y J.C. Carrillo-Rodríguez. 2014. Concentración de benciladenina, tipo y dosis de

carbohidratos en el medio de cultivo para proliferación de brotes de *Agave americana*. *Revista FCA UNCUYO* 46(1):97-107.

Mok M.C., R.C. Martin y D.W.S. Mok. 2000. Cytokinins: Biosynthesis, metabolism and perception. *In vitro culture cell* 36:102-107.

Moreno M.E. 1984. Análisis físico y biológico de semillas agrícolas. 1a Edición. Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 383 pp.

Murashige T. y F. Skoog. 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiology Plantarum* 15:473-497.

Nekola J.C. y P.S. White. 1999. The distance decay of similarity in biogeography and ecology. *Journal of Biogeography* 26:867-878.

Niño Vázquez R. 2013. Germinación y viabilidad seminal de *Agave angustifolia* subsp. *tequilana* y *Agave mapisaga*. Tesis de ingeniería (Ingeniero Agrónomo Fitotecnista). Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Autónoma de San Luis Potosí. México. 41 pp.

Nobel P.S. 1996. Ecophysiology of roots of desert plants, with special emphasis on Agaves and cacti: Y. Waissel, A. Eshel, Ukafkafi (eds.) *Plant Roots: The Hidden Half*. 2nd Edn. Marccel Dekker, Nueva York, p: 823-844

Olguín-Santos L.P. 2012. Organogénesis *in vitro* de *Picea chihuahuana* Martínez (Pinaceae). Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Vegetal). Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México. 126 pp.

Olmos S., G. Luciani y E. Galdeano. 2016. Micropropagación. Capítulo I. En: Levitus G. y Echenique V. (eds). *Biotechnología y mejoramiento vegetal Volumen II*. Argentina: Argenbio. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. p: 356-362.

Orea-Lara G., L.A. Cifuentes-Díaz, S. Gómez-Ortiz. y V. Hernández-Vargas. 2006. Germinación de semillas (*Agave durangensis*) a diferentes temperaturas y efecto de la fertilización en el desarrollo de las plántulas. *Vidsupra* 1:51-56.

Pan M.J. y J. van Staden. 1998. The use of charcoal in *in vitro* culture A review. *Plant Growth Regulation* 26:155-16.

Pedroza-Manrique J.A. 2009. Efecto del carbón activado, ácido indolacético (AIA) y bencil amino purina (BAP) en el desarrollo de protocormos de *Epidendrum elongatum* Jacq bajo condiciones *in vitro*. *Revista Colombiana de Biotecnología* 11(1):17-32.

- Pérez Molphe Balch E., M.J. Esparza Araiza y M.E. Pérez Reyes. 2012. Conservación *in vitro* de germoplasma de *Agave spp* bajo condiciones de crecimiento retardado. *Revista de Fitotecnia Mexicana* 35(4):279-287.
- Phillips G.C. 2004. Invited review: *In vitro* morphogenesis in plants-Recent advances. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 40:342-345.
- Phillips G.C. y M. Garda. 2019. Plant tissue culture media and practices: an overview. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 55:242-257.
- Powers D.E. y R.A. Backhaus. 1989. *In vitro* propagation of *Agave arizonica* Gentry & Weber. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 16:57-60.
- Ramírez H.M., C.B.Peña, C. Trejo, R. Aguirre y H. Vaquera. 2014. Seed germination of *Agave* species as influenced by substrate water potential. *Biological Research* 47(1):0-9.
- Rivera Fuentes B.R. 2015. Cultivo *in vitro* con fines de conservación en *Agave victoriae-reginae* T. moore (Agavaceae). Tesis de Licenciatura (Bióloga). Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México.México. 169 pp.
- Robert M.L., J.L. Herrera, F. Contreras y K.N. Scorer. 1987. *In vitro* propagation of *Agave fourcroydes* Lem. (Henequen). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 8:37-48.
- Rodríguez, M., M. Chacón, y R. Carrillo. 2014. Efecto de la concentración y de los componentes del medio de cultivo MS sobre la germinación *in vitro* de *Ungi molinae*. *Bosque (Valdivia)* 35(1):119-122.
- Rodríguez-Garay B., A. Gutiérrez-Mora., B. Acostadueñas. 1996. Somatic embryogenesis of *Agave victoriareginae* Moore. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 46:85-87.
- Royo-Márquez M.H., A. Melgoza-Castillo y G. Quintana-Martínez. 2014. Especies vegetales en peligro, su distribución y estatus de conservación de los ecosistemas donde se presentan. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales* 5(22):86-103.
- Rzedowski, J. 1981. Vegetación de México. Limusa, México, D. F. 342 pp.
- Sánchez-Cuevas M.C y J.L. Salaverría. 2004. Control de la contaminación y la oxidación en el cultivo *in vitro* de fresa (*Fragaria X ananassa* Duch.). *Revista UDO Agrícola* 4(1):21-26.
- Sánchez-Islas A.V. y L.P. Portillo. 2014. Proliferación de brotes axilares en tres especies de *Agave* Efecto de sacarosa. *Boletín Nakari* 3:47-49.

- Sánchez Pérez M.S., M. López Del V. y B.L. Nader G. 2009. Cultivo *in vitro* para la obtención de brotes de la especie *Agave nizandensis* Cutak a partir de explantes de hoja. En: Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, del 21 al 26 de junio 2009, Veracruz, México. p: 24.
- Sandoval-Lozano K. 2017. Comunicación personal. Reporte técnico de Servicio Social "Germinación *in vitro* de tres especies del género *Agave*", Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Santacruz-Ruvalcaba F., H. Gutiérrez-Pulido y B. Rodríguez-Garay. 1999. Efficient *in vitro* propagation of *Agave parrasana* Berger. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 56:163-167.
- Santíz J.A., R. Rincón-Rosales y F.A. Gutiérrez-Miceli. 2012. Propagación *in vitro* de *Agave grijalvensis* B.Ullrich, una especie endémica de Chiapas bajo protección especial. *Gayana Botánica* 69:23-30.
- SEMARNAT (Secretaría de medio ambiente y recursos naturales). 2019. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. *Diario Oficial de la Federación*. Página en red: www.semarnat.gob.mx. Consultada el 6 de diciembre de 2019.
- Silos-Espino H., C.L. Tovar-Robles, N. González-Cortés, S.J. Méndez-Gallegos y D. Rossel-Kipping. 2010. Estudio integral del maguey (*Agave salmiana*): propagación y valor nutricional. IX Simposio Taller nacional y II Internacional de producción del nopal y el maguey. Escobedo Nuevo León, México 12 y 13 de noviembre 2010.
- Silos-Espino H., N. González-Cortés, A. Carrillo-López, F. Guevara Lara, M.E. Valverde-González y O. Paredes-López. 2007. Chemical composition and *in vitro* propagation of *Agave salmiana* Gentry. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 82:355-359.
- Skirvin R.M., M.A. Motoike, M. Norton, Z.K. Ozgur, AL-Juboory y O.M.Mc Means. 1999. Workshop on micropropagation establishment of contaminant-free perennial plants *in vitro*. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 35:296-298.
- Slocum R. D. 2005. Genes, enzymes and regulation of arginine biosynthesis in plants. *Plant Physiology Biochemistry* 43:729-745.
- Soto E.L., M.J.Jasso, H.J. Vargas, R.H. González y A.V. M. Cetina. 2006. Efecto de diferentes dosis de AIB sobre el enraizamiento de *Ficus benjamina* L. en diferentes épocas del año. *Revista Sociedad, Cultura y Desarrollo Sustentable* 2(3):795-814.

- Tabiyeh D., F. Bernard y H. Shacker. 2006. Investigation of glutathione, salicylic acid and GA3 effects on browning in *Pistacia vera* shoot tips culture. *Acta Horticulturae* 726: 201-204.
- Tejavathi D. H. y K. Gayathamma. 2007. Induction of somatic embryos from cultures of *Agave vera-cruz* Mill. *Hindagril-Horticultural Society* 2:113-116.
- Thomas T.D. 2008. The role of activated charcoal in plant tissue culture. *Biotechnology Advances* 26(6):618-631.
- Valenzuela-Sánchez K.K. 2006. Desarrollo de tecnologías para la regeneración *in vitro* y transformación genética de maguey (*Agave tequilana* Weber var. *azul*). Tesis de Doctorado (Biotecnología de Plantas). Centro de Investigación y estudios avanzados, Instituto Politécnico Nacional. Irapuato, Guanajuato. México. 148 pp.
- Valenzuela-Sánchez K.K., R.E. Juárez-Hernández, A. Cruz-Hernández, V. Olalde-Portugal, M.E. Valverde y O. Paredes-López. 2006. Plant regeneration of *Agave tequilana* by indirect organogenesis. *In Vitro Cellular and Development Biology-Plant* 42:336-340.
- van Etten C.H., I.A. Wolff, Q. Jones y R.W. Miller. 1963. Amino acid composition of seeds from 200 angiospermous plant species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1:399-410.
- van Staden J., C. Fennell y N. Taylor. 2006. Plant stress *in vitro*: the role of phytohormones. *Acta Horticulturae* 725: 55-62.
- Villalobos A.V.M. y T.A. Thorpe. 1993. Micropropagación, metodología y resultados. En: Roca W.M. y L.A. Mroginski (eds.). Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura tropical. Colombia p: 128-141.
- Villalobos A.V.M., J.M. Mejias y H.S. Escobar. 1993. Micropropagación de Opuntias y Agaves. En: Roca W.M. y L.A. Mroginsky (eds.). Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura tropical. Colombia p: 643-644.
- Werbrouck S.P.O., B. van der Jeugt, W. Dewitte, E. Prinsen, H.A. van Oucke y P.C. Debergh. 1995. The metabolism of benzyladenine in *Spathiphyllum floribundum* "Schott Petite" in relation to acclimatisation problems. *Plant Cell Reports* 14:662-665.
- Winter G., C. Todd, M. Trovato, G. Forlani y D. Funk. 2015. Physiological implications of arginine metabolism in plants. *Frontiers in Plant Science* 6(534):1-14.

Yescas-Arreola E., G.V. Campos-Ángeles, J.R. Enríquez del Valle, V.A. Velasco- Velasco, G. Rodríguez-Ortiz y J. Ruiz-Luna. 2016. Aclimatación de *Agave americana* var. *oaxacensis* obtenidas *in vitro*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 7(4):911-922.