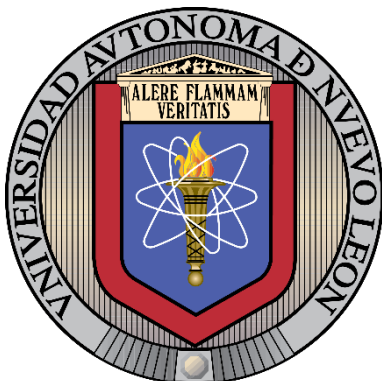


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE AGRONOMÍA



**MICROPROPAGACIÓN DE BROTES DE *Agave montium-sancticaroli* A PARTIR
DE YEMAS APICALES**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO
EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGRÍCOLA

PRESENTA

CRISTIAN REYNA MORALES

General Escobedo, Nuevo León

Noviembre del 2020

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE AGRONOMÍA



**MICROPROPAGACIÓN DE BROTES DE *Agave montium-sancticaroli* A PARTIR
DE YEMAS APICALES**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO
EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGRÍCOLA

PRESENTA

CRISTIAN REYNA MORALES

General Escobedo, Nuevo León

Noviembre del 2020

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE AGRONOMÍA



**MICROPROPAGACIÓN DE BROTES DE *Agave montium-sancticaroli* A PARTIR
DE YEMAS APICALES**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO
EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGRÍCOLA

PRESENTA

CRISTIAN REYNA MORALES

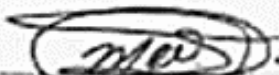
General Escobedo, Nuevo León

Noviembre del 2020

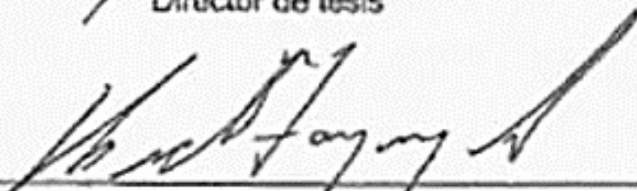
ESTA TESIS FUE REVISADA Y APROBADA POR EL COMITÉ PARTICULAR
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGRÍCOLA


COMITÉ PARTICULAR



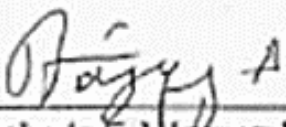
D. Sc. Marcela del Carmen Ojeda Zacarías
Director de tesis



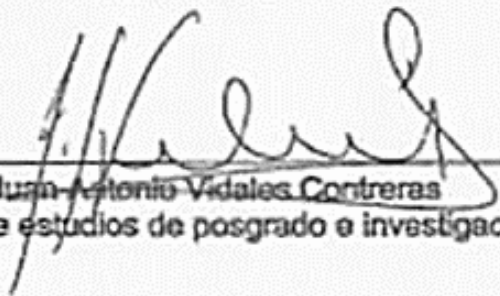
PhD. Héctor Lozoya Sadaña
Codirector de tesis



PhD. Emilio Olivares Sáenz
Asesor auxiliar



PhD. Rigoberto E. Vázquez Alvarado
Asesor auxiliar



PhD. Juan Antonio Vidales Contreras
Subdirector de estudios de posgrado e investigación

DEDICATORIA

A mis padres Javier C. Reyna Dorantes y Graciela Morales González por la formación moral y académica, su incondicional apoyo, amor y amistad, además de ser un ejemplo para seguir en mi vida.

A mis hermanos, mi tía y mis primos por estar siempre apoyándome y motivándome a seguir mi camino.

A mis sobrinos, quienes me gustaría que siguieran sus sueños y metas.

A mi padrino Octavio Rivera López[†] quien fue amigo desde de mi nacimiento y perdió la vida mientras realizaba mis estudios de maestría, recordaré esas reuniones en familia con mucho cariño.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a la D. Sc. Ma del Carmen Ojeda Zacarías, PhD. Emilio Olivares Sáenz, PhD. Héctor Lozoya Saldaña y PhD. Rigoberto E. Vázquez Alvarado por formar parte del Comité de Tesis, así como por sus valiosas sugerencias de interés en la revisión del presente trabajo.

A los profesores y académicos que me orientaron en la realización de esta tesis, en especial al D. Sc. José Argelio Santos Haliscak, quien apoyó con sus consejos.

A los laboratorios de cultivo de tejidos vegetales (unidad Escobedo) y de Biotecnología Vegetal (unidad Marín) y al equipo de servicio social por brindarme todas las facilidades necesarias para concluir este trabajo.

A la MVZ MC Ana Lilian Iñiguez Montejano por su continuo apoyo en el transcurso de la maestría.

A la Universidad Autónoma de Nuevo León por su apoyo a través del programa PAICYT para la realización de esta investigación. A la facultad de agronomía por darme la oportunidad para realizar el grado de maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por otorgar el apoyo durante el transcurso de la maestría.

ÍNDICE DE CONTENIDO

Contenido	Página
ÍNDICE DE CONTENIDO.....	vii
ÍNDICE DE CUADROS	xi
ÍNDICE DE FIGURAS	xiii
LISTA DE SÍMBOLOS Y NOMENCLATURA	xiv
RESUMEN	xvi
ABSTRACT	xviii
1. INTRODUCCIÓN	20
1.1. Hipótesis	22
1.2. Objetivos	23
1.2.1. Objetivo general.....	23
1.2.2. Objetivos específicos.....	23
2. REVISIÓN DE LITERATURA	24
2.1. Origen del <i>Agave</i>	24
2.1.1. Historia	24
2.1.2. Distribución	25
2.2. Taxonomía del <i>Agave</i>	25
2.2.1. Familia <i>Asparagaceae</i>	25
2.2.2. Subfamilia <i>Agavoideae</i>	27
2.2.3. Género <i>Agave</i>	27
2.2.3. <i>Agave montium-sancticaroli</i>	28

2.4. Importancia del <i>Agave</i>	29
2.4.1. Importancia económica.....	30
2.4.2. Producción de <i>Agave</i>	32
2.4.3. Importancia nutricionales y nutracéuticas	33
2.4.4. Importancia de su conservación	33
2.5. Propagación del <i>Agave</i>	34
2.6. Propagación <i>in vitro</i>	35
2.7. Etapas de la micropropagación <i>in vitro</i>	37
2.7.1. Etapa cero: Preparación	37
2.7.2. Etapa uno: Iniciación o inducción del cultivo	38
2.7.3. Etapa dos: Multiplicación	38
2.7.4. Etapa tres: Elongación e inducción o desarrollo de raíces	39
2.7.5. Etapa cuatro: Transferencia a condiciones de invernadero	39
2.8. Micropropagación de <i>Agave</i>	40
3. MATERIALES Y MÉTODOS	41
3.1. Localización del experimento.....	41
3.2. Material vegetal.....	42
3.3. Pre-desinfestación	43
3.4. Establecimiento aséptico de semillas.....	44
3.4.1. Medio de cultivo.....	44
3.4.2. Desinfestación	47
3.4.3. Siembra de semillas	48
3.4.4. Diseño experimental	48
3.5. Inducción de brotes.....	49
3.5.1. Medio de cultivo.....	49
3.5.2. Transferencia a medio de inducción	50
3.5.3. Diseño experimental	50
3.6. Multiplicación de brotes.....	50

3.6.1. Medio de cultivo.....	50
3.6.2. Subcultivo	51
3.6.3. Diseño experimental	51
3.7. Enraizamiento de brotes	52
3.7.1. Medio de cultivo.....	52
3.7.2. Subcultivo	52
3.7.3. Diseño experimental	53
3.8. Aclimatación de plantas <i>in vitro</i>	53
3.8.1. Sustrato	53
3.8.2. Aclimatación	54
3.8.3. Diseño experimental	55
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	56
4.1. Establecimiento aséptico de semillas.....	56
4.1.1. Asepsia.....	56
4.1.2. Germinación	57
4.2. Inducción de brotes.....	58
4.2.1. Frecuencia de explantes con brotes	59
4.2.2. Frecuencia de brotes por explante	60
4.3. Multiplicación de brotes.....	61
4.3.1. Explantes con brotes	61
4.3.2. Brotes por explante.....	62
4.3.3. Longitud de brotes	63
4.4. Enraizamiento de brotes	63
4.4.1. Raíces por explante	63
4.4.2. Longitud de raíces	65
4.5. Aclimatación de plantas regeneradas	65
4.5.1. Supervivencia de las plantas	66
4.5.2. Número de hojas	66

4.5.3. Longitud de hojas	67
4.5.4. Ancho de hojas	68
4.6. Discusión general.....	69
5. CONCLUSIONES.....	71
6. LITERATURA CONSULTADA.....	73

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1 Componentes de las sales básicas MS, suplementadas con sacarosa (Murashige & Skoog, 1962).	45
2 Preparación de vitaminas.	46
Solventes utilizados con los reguladores de crecimiento.....	47
3 Tratamientos de desinfestación de semillas de <i>A. montium-sancticaroli</i>	47
4 Tratamientos fitohormonales utilizados para la inducción de brotes de <i>A. montium-sancticaroli</i>	49
5 Tratamientos utilizados para la multiplicación y enraizamiento de brotes de <i>A. montium-sancticaroli</i>	51
6 Tratamientos utilizados en la etapa de aclimatación de plantas de <i>A. montium-sancticaroli</i>	53
7 Comparación de medias estimadas por tratamiento. Variable dependiente: Asepsia.....	57
8 Comparación de medias estimadas por tratamiento. Variable dependiente: Germinación.	57
9 Comparación de medias estimadas por tratamiento. Variable dependiente: Explantes con brotes.	60
10 Comparación de medias estimadas por tratamiento. Variable dependiente: Brotes por explante.	60
11 Comparación de medias estimadas por tratamiento. Variable dependiente: Explantes con brotes.	62
12 Comparación de medias estimadas por tratamiento. Variable dependiente: Brotes por explante.	62
13 Comparación de medias estimadas por tratamiento. Variable dependiente: Longitud de brotes.....	63
14 Comparación de medias estimadas por tratamiento. Variable dependiente: Raíces por explante.....	64
15 Comparación de medias estimadas por tratamiento. Variable dependiente: Longitud de raíces.....	65

16	Comparación de medias estimadas por tratamiento. Variable dependiente: Número de hojas.	67
17	Comparación de medias estimadas por tratamiento. Variable dependiente: Longitud de hojas.	68
18	Comparación de medias estimadas por tratamiento. Variable dependiente: Ancho de hojas.	69

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Instalaciones de la Facultad de Agronomía UANL. a) Localización del laboratorio de Cultivos Vegetales.....	41
2	Recolección de semillas de <i>Agave</i> sp en el municipio de San Carlos, Tamaulipas. a) Separación de ramos florales del qurote; b) Separación de frutos; c) Semillas de <i>Agave</i> expuestas en el fruto.....	42
3	Localización de los municipios de San Carlos (a) y Jiménez (b) del estado de Tamaulipas.....	42
4	Semillas seleccionadas de <i>A. montium-sancticaroli</i>	43
5	Diagrama de flujo del establecimiento aséptico de semillas.....	43
6	a) Balanza analítica; b) Plancha de calentamiento y agitación; c) Medición de pH utilizando potenciómetro.....	45
7	a) Bolsa de polipropileno con semillas de <i>A. montium-sancticaroli</i> en proceso de desinfestación; b) Establecimiento de semillas de <i>A. montium-sancticaroli</i> bajo condiciones asépticas.....	48
8	Diagrama de flujo del proceso de aclimatación.....	54
9	Semillas de <i>A. montium-sancticaroli</i> : a) con 10 días de establecidas; b) con 20 días de establecidas; c) con 30 días de establecidas.....	58
10	Explante de <i>A. montium sancticaroli</i> con brotes (a y b) después de 8 semanas de establecido.....	59
11	Brotes de <i>A. montium-sancticaroli</i> a partir de planta madre después de 8 semanas de establecido.....	61
12	Enraizamiento de plántulas de <i>A. montium-sancticaroli</i> después de 6 semanas de establecido: a) Vista inferior; b) Vista lateral.....	64
13	Plantas de <i>A. montium-sancticaroli</i> después de 4 semanas de aclimatación (a y b).....	66
14	<i>A. montium-sancticaroli</i> en maceta después de cuatro meses de haber sido aclimatada exitosamente.....	70

LISTA DE SÍMBOLOS Y NOMENCLATURA

%V/V	Porcentaje en volumen sobre volumen
2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
2iP	N ⁶ -(2-isopentenil)-adenina
AIA	Ácido indol-3-acético
AIB	Ácido indol-3-butírico
ANA	Ácido 1-naftalenacético
BAP	6-N-Bencilaminopurina
DOF	Diario Oficial de la Federación
HCl	Ácido clorhídrico
Kin	Kinetina
KOH	Hidróxido de potasio
m s.n.m.....	Metros sobre el nivel del mar
min	Minuto
MXN	Pesos mexicanos (\$)
NaCl	Cloruro de sodio
NaClO	Hipoclorito de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio

NOM..... Norma Oficial Mexicana
PIB Producto Interno Bruto
ppm Partes por millón
SPSS..... Statistical Package for the Social Sciences
Sig. Significancia
SIT..... Sistema de Inmersión Temporal
T Temperatura
TDZ Thidiazuron
V Volumen

RESUMEN

La Jarcia, el nombre común de *Agave montium-sancticaroli* es una especie propia de México, y se utiliza principalmente para la producción de mezcal en distintas regiones de Tamaulipas. Tradicionalmente la propagación es por hijuelos la cual está limitada por el periodo de la producción de estos. Una alternativa para contrarrestar este problema es la propagación *in vitro* de *Agave*, la cual ofrece un mayor número de brotes en menor tiempo. El objetivo de esta investigación fue desarrollar un protocolo de micropropagación de *A. montium-sancticaroli* que permita la multiplicación masiva *in vitro*.

El establecimiento *in vitro* de semillas se realizó en las sales básicas de Murashige-Skoog (MS), después de cuatro semanas se logró la germinación completa. Para la inducción de brotes se subcultivaron estos en las mismas sales; después de ocho semanas se evaluó el número de explantes con brotes y de brotes por explante obteniendo una media de 2.77 y 3.6 respectivamente.

En la multiplicación de brotes se evaluaron las dos variables de la etapa anterior y la longitud de brotes; el número de explantes con brote resultó mejor con respecto al tratamiento control en los tratamientos (T1 a T4), pero sin diferencias entre ellos; el número de brotes por explante resultó mejor en los tratamientos 2, 3 y 4 con respecto

al tratamiento 1 y el control; y la longitud de brotes el tratamiento 3 resultó el mejor para la con una media de 7.38 cm.

Para lograr el enraizamiento de los brotes se subcultivaron en las sales básicas MS con la adición de 6-bencilaminopurina (BAP) y ácido 1-naftalenacético (ANA) y se evaluó el número de raíces por explante y longitud de raíces. La mejor respuesta de enraizamiento se presentó cuando se utilizó ANA, pero también se mostró una leve disminución de su longitud cuando se combinó con la citocinina.

Para la aclimatación de las plantas se evaluaron el número de plantas vivas; número, longitud y ancho de hojas después de 10 semanas. Los tratamientos con sustrato Peat Moss:perlita en relación 50:50 y 25:75, adicionados con fertilizante (T8 y T9 respectivamente) demostraron ser superiores en el número, longitud y ancho de hojas, con la media de 6.6 hojas (T8-9), 7.52 cm de longitud (T8) y 1.31 cm de ancho de hojas (T9).

Una micropropagación exitosa de brotes de *A. montium-sancticaroli* fue lograda una vez definidas las concentraciones de reguladores de crecimiento en las sales básicas de MS con un balance hormonal adecuado. Una vez conseguida la aclimatación de las plantas regeneradas, estas pueden crecer hasta adultas sin problemas.

Palabras clave: propagación *in vitro*, protocolo, 6-bencilaminopurina, ácido 1-naftalenacético, aclimatación.

ABSTRACT

Jarcia, the common name of *Agave montium-sancticaroli* is a species of Mexico and is used mainly to produce mezcal in different regions of Tamaulipas. Traditionally the propagation is by basal shoots, which is limited by the period of their production. An alternative to counteract this problem is the *in vitro* propagation of *Agave*, which offers a greater number of shoots in less time. The objective of this research was to develop a micropropagation protocol for *A. montium-sancticaroli* that allows massive multiplication *in vitro*.

The *in vitro* establishment of seeds was carried out in the basic salts of Murashige-Skoog (MS), after four weeks full germination was achieved. For the induction of shoots, these were subcultured in the same salts; After eight weeks, the number of explants with shoots and shoots per explant was evaluated, obtaining an average of 2.77 and 3.6 respectively.

In the multiplication of shoots, the two variables of the previous stage and the length of shoots were evaluated; the number of explants with sprouts was better with respect to the control treatment in the treatments (T1 to T4), but without differences between them; the number of shoots per explant was better in treatments 2, 3 and 4 with respect

to treatment 1 and the control; and the length of shoots in treatment 3 was the best for the with a mean of 7.38 cm.

To achieve the rooting of the shoots, they were subcultured in MS basic salts with the addition of 6-benzylaminopurine (BAP) and 1-naphthaleneacetic acid (ANA) and the number of roots per explant and root length was evaluated. The best rooting response was presented when ANA was used, but a slight decrease in its length was also shown when it was combined with cytokinin.

For the acclimatization of the plants, the number of living plants was evaluated; number, length and width of leaves after 10 weeks. Treatments with substrate Peat Moss: perlite in a 50:50 and 25:75 ratio, added with fertilizer (T8 and T9 respectively) proved to be superior in the number, length and width of leaves, with the average of 6.6 leaves (T8-9), 7.52 cm long (T8) and 1.31 cm wide leaves (T9).

A successful micropropagation of shoots of *A. montium-sancticaroli* was achieved once the concentrations of growth regulators in the basic salts of MS were defined with an adequate hormonal balance. Once the regenerated plants have acclimatized, they can grow to adulthood without problems.

Keywords: *in vitro* propagation, protocol, 6-benzylaminopurine, 1-naphthaleneacetic acid, acclimatization.

1. INTRODUCCIÓN

La Jarcia (nombre común) es una especie propia de México, la cual se utiliza principalmente para la producción de mezcal en distintas regiones de Tamaulipas. Esta especie es monocotiledónea y pertenece a la familia *Asparagaceae*, subfamilia *Agavoideae*, su género *Agave* y especie *A. montium-sancticaroli* (Chase *et al.*, 2009; Stevens, 2012).

Es una planta perene, de 1.5 a 2 m de altura, 2 a 2.5 m de diámetro, con un promedio de 50 a 80 hojas por planta. Las hojas miden de 100 a 120 cm de largo y 9 a 12 cm de ancho en la parte media, lanceoladas, erectas, rígidas, fibrosas, de forma cóncava, verde-amarillentas, poseen un margen dentado con espinas de 4 a 6 mm de largo, dientes pequeños entre los más grandes, espina terminal de 2.5 a 3.5 cm de largo y cada planta puede producir de dos a ocho hijuelos. Esta especie se distribuye a lo largo de Tamaulipas, por la región centro, entre la Sierra de San Carlos y la Llanura del Golfo de México; en los municipios de Burgos, Cruillas, Jiménez, Padilla, San Carlos y San Nicolás (García-Mendoza *et al.*, 2007).

Aunque los valores nutricionales y nutraceuticos de esta especie se desconocen, un gran número de especies de la familia *Asparagaceae* ha demostrado características medicinales y benéficas a la salud (Rai *et al.*, 2012). Existen algunas especies del

género *Agave*, las cuales son utilizadas para la producción de miel, jarabe, fibras, etanol, enzimas e inulina. Normalmente el contenido de carbohidratos en el *Agave* es alto en la piña, y la inulina o agavina es un fructooligosacárido de interés ya que es utilizada como sustituto de azúcar que puede ser utilizado por personas con diabetes al no ser digerido por el tracto digestivo. Además de ser una fuente alternativa de potasio, magnesio, calcio y vitamina C (Bautista-D. & Arias-A., 2008; Ibañez-Vázquez *et al.*, 2015).

El cultivo del *Agave* cada día crece mundialmente, es utilizado en países como Australia para la elaboración de bioetanol y aprovechamiento de la fibra, además de la producción de inulina (Azad, 2018). En algunos otros países (Indonesia, India, Sudáfrica, Brasil, China, Kenia, Tanzania, Madagascar y Tailandia, entre otros) producen más de 300,000 toneladas de fibra de *Agave* (Hulle *et al.*, 2015; Santoso, 2015; Smith & Figueiredo, 2015).

El *Agave* forma parte del 1.25% del PIB agrícola nacional y el 3.04% de la producción de agroindustriales. En el año 2016 la exportación de tequila representó un valor de 1,203 millones de dólares. La demanda internacional de mezcal en 26 países ha incrementado el consumo desde el 2003, estos países en conjunto consumen anualmente 184 millones de litros (SAGARPA, 2017). El valor del precio del *Agave* ha aumentado especialmente en los últimos años, convirtiéndolo en un cultivo de alto margen de ganancia para los agricultores, el valor ha incrementado desde \$1.00 MXN kilo⁻¹ hasta un valor histórico de \$30.00 MXN kilo⁻¹ a finales del año 2019, esto debido a la demanda elevada de las piñas de *Agave* (Sanschagrín, 2020).

Esta investigación tiene como propósito el establecer un protocolo que permita la multiplicación masiva de la especie, con la finalidad de aplicarlo tanto como para

conservación de la especie en el hábitat natural, como para las plantaciones de *Agave* con el fin de producir mezcal. Es importante destacar el elevado contenido de azúcares de la especie de estudio, el cual es mayor al nivel que contiene *A. americana* subsp. *protamericana*, por lo que es altamente apreciada por los mezcaleros, lo que la convierte en una especie potencialmente bajo riesgo de extinción; además del bajo número de hijuelos y su pequeña población silvestre, esta especie debe ser contemplada para investigación *in vitro* y su propagación por semilla (García-Mendoza *et al.*, 2007).

La propagación tradicional, además de estar condicionada por el número de hijuelos que produzca la planta madre, está limitada por el periodo de la producción de estos hijuelos (Garibay-Kuri, 1988). Por otro lado, la propagación *in vitro* ofrece un mayor número de brotes en menor tiempo, pudiendo alcanzar más de 15 brotes por explante, lo cual es una gran ventaja con respecto al método tradicional (Aguilar-Jiménez *et al.*, 2018; López-Acevedo *et al.*, 2018).

1.1. Hipótesis

La micropropagación de brotes de *Agave montium-sancticaroli* se logra mediante el uso de diversas concentraciones de reguladores de crecimiento.

1.2. Objetivos

Para esta investigación se establecieron los siguientes objetivos.

1.2.1. Objetivo general

Desarrollar un protocolo de micropropagación de *A. montium–sancticaroli* que permita la multiplicación masiva *in vitro*.

1.2.2. Objetivos específicos

- 1.- Establecer asépticamente los explantes de *A. montium–sancticaroli* en medios de cultivo adecuados que favorezcan su desarrollo *in vitro*.
- 2.- Definir la combinación de reguladores de crecimiento que permitan la inducción de brotes en *A. montium–sancticaroli*.
- 3.- Evaluar la multiplicación de brotes de *A. montium–sancticaroli* con diferentes combinaciones y concentraciones de reguladores de crecimiento.
- 4.- Determinar la capacidad de enraizamiento de brotes regenerados *in vitro* de *A. montium-sancticaroli*.
- 5.- Determinar el proceso de aclimatación de las plantas regeneradas de *A. montium-sancticaroli*.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Origen del Agave

2.1.1. Historia

El *Agave* ha sido utilizado durante más de 9000 años, por distintas civilizaciones, siendo Mesoamérica el lugar donde se encuentra la mayor parte de la diversidad genética de *Agave* (Callen, 1965). El hombre al observar a los animales alimentarse de esta especie, se dio cuenta que era posible utilizar al *Agave* como alimento, y con el tiempo llegó a utilizarse como herramienta o incluso para elaborar bebidas.

Durante la época de la colonización española en las regiones norte del país se utilizaron a personas Náhuatl como intérpretes, trabajadores y granjeros. Los granjeros extendieron las costumbres de la elaboración de pulque a lo largo de las distintas regiones y esta cultura aún sigue presente en la actualidad. Algunos *Agaves* fueron objeto de interés para españoles y portugueses, quienes decidieron introducirlo a otras regiones del mundo como *Agave americana* a las islas Canarias y Azores; *Agave angustifolia*, *Agave cantala* y otros a Asia y África; de igual manera *A. americana* y *Agave lurida*, entre otros, fueron introducidos a costas mediterráneas y Europa como

ornamentales; además en Indonesia, Filipinas y África del este se incrementó el interés de utilizar la fibra que se podía obtener de estas especies (Gentry, 1982).

2.1.2. Distribución

El género *Agave* (*sensu stricto*) es endémico de América. Cuenta con más de 200 especies y 150 de estas se encuentran en México, es decir, aproximadamente un 75%, más otras 36 especies que se encuentran distribuidas desde el sur de los Estados Unidos de América, hasta Colombia y Venezuela. Incluyendo todas las islas del Caribe, desde Bahamas, Trinidad y Tobago, Aruba y Curazao (García-Mendoza, 2007).

Estas especies se catalogan como flora alóctona en algunos otros países, como España y Alemania, a veces utilizadas a manera de ornamental (Guillot-Ortiz & Van der Meer, 2016; Jäger *et al.*, 2008) y en países como Indonesia, Filipinas, Sudáfrica, Australia, India, Brasil, China, Kenia, Tanzania, Madagascar y Tailandia como cultivos para generar productos de valor agregado (Azad, 2018; Hulle *et al.*, 2015; Santoso, 2015; Smith & Figueiredo, 2015).

2.2. Taxonomía del *Agave*

2.2.1. Familia *Asparagaceae*

La numerosa familia *Asparagaceae* cuenta con un número aproximado de 2900 especies distribuidas en 114 géneros. Las subfamilias que conforman esta familia son:

Agavoideae: En esta subfamilia se pueden encontrar 23 géneros distintos y aproximadamente 640 especies, la mayoría está distribuida en regiones cálidas, tropicales y subtropicales.

Aphyllanthoideae: En este grupo se encuentra solo una especie, *Aphyllanthes monspeliensis*.

Asparagoideae: Esta agrupación anteriormente fue catalogada como una familia por separado con el nombre *Asparagaceae*. Cuenta con dos géneros, *Asparagus* el cual está conformado por más de 160 especies, y *Hemiphylacus* con cinco especies distintas.

Schilloideae: Con más de 30 géneros distintos, esta subfamilia es representada por una variedad de especies que son utilizadas por sus flores, antiguamente eran clasificadas como *Liliaceae*.

Lomandroideae: Antiguamente llamada *Laxmanniaceae*, está compuesta de 15 géneros y aproximadamente 180 especies. Uno de los géneros más destacados es el *Cordyline*.

Nolinoideae: Anteriormente tratada como *Ruscaceae* y formaba parte de la familia *Liliaceae*, está formada por 16 géneros.

Brodiaeoideae: Compuesta por 12 géneros, esta subfamilia anteriormente era tratada como la familia *Themidaceae*.

(Chase *et al.*, 2009; Christenhusz & Byng, 2016; Stevens, 2012).

2.2.2. Subfamilia *Agavoideae*

Durante el transcurso de los años la subfamilia ha cambiado su definición y composición siendo propuesta por primera vez en 1836 por el botánico austriaco Stephen Endlicher con los géneros *Agave* y *Furcraea*. Esta subfamilia, había sido conocida por el nombre de *Agavaceae* hasta el año 2009, cuando fue renombrada como *Agavoideae* con un aproximado de 640 especies agrupadas en 23 géneros.

Algunos de los géneros pertenecientes más destacados de esta subfamilia son:

<i>Agave</i> L.	<i>Chlorogalum</i> Lindl.	<i>Hesperocallis</i> A. Gray
<i>Anemarrhena</i> Bunge	<i>Chlorophytum</i> Ker Gawl.	<i>Hosta</i> Tratt.
<i>Anthericum</i> L.	<i>Clistoyucca</i> Trel.	<i>Leucocrinum</i> Nutt. ex A.
<i>Behnia</i> Didr.	<i>Echeandia</i> Ort.	<i>Gray</i>
<i>Beschorneria</i> Kunth	<i>Hastingsia</i> S. Watson	<i>Paradisa</i> Mazzuc.
<i>Bravoa</i> Lex.	<i>Herreria</i> Ruiz & Pav.	<i>Schoenolirion</i> Torr.
<i>Camassia</i> Lindl.	<i>Herrerriopsis</i> Perrier	

(Brummitt, 1992; Chase *et al.*, 2009; Stevens, 2012).

2.2.3. Género *Agave*

Este género, cuyo nombre proviene del griego (ἀγαυή, 'noble' o 'admirable'). Las hojas suculentas de la mayoría de las especies de *Agave* tienen dientes marginales afilados, una espina terminal extremadamente afilada y son muy fibrosas en su interior. El tallo grueso suele ser extremadamente corto, lo que puede hacer que la planta parezca sin tallo (Gentry, 1982). La mayoría de las especies pertenecientes a este género son monocárpicas, aunque existe una pequeña cantidad de especies que son policárpicas;

pudiendo ser consideradas en general como rosetas monocárpicas. Esta arquitectura de sus hojas en forma de roseta suele ser de utilizad en regiones áridas, ya que permite que el agua de las lluvias sea dirigida a las raíces a través de sus hojas. Las rosetas de *Agave* pueden estar conformadas por 20 a 200 hojas, dependiendo de la especie. Las hojas son gruesas y suculentas, y la mayoría están cubiertas por una capa cerosa, lo cual le permite resistir condiciones de estrés hídrico prolongado. Una de las diferencias más grandes entre las hojas de aloes y las de *Agave* es que las espinas dentadas de las hojas de *Agave* suelen estar delimitadas del tejido de la hoja, a diferencia de aloes que tienen espinas sin una diferencia notable del tipo de tejido de la hoja. El color de las hojas puede variar desde un verde vivo hasta un azul-grisáceo, el color también puede verse afectado por la cantidad de cera producida en la cutícula y por la cantidad de compuestos fenólicos como la antocianina (Irish, 1949; Pérez-Hernández *et al.*, 2016).

En general, los *Agaves* o magueyes poseen hojas alargadas carnosas dispuestas en espiral, un tallo acaule y tienen una inflorescencia de tipo quiote (Guillot-Ortiz *et al.*, 2009).

Algunas especies de *Agave* pueden producir brotes aéreos (bulbillos) y/o brotes rizomáticos (hijuelos), algunas especies como el *Agave letonae* (henequén) puede producir un promedio de 15 hijuelos durante su ciclo de vida (López-León, 2013).

2.2.3. *Agave montium-sancticaroli*

Esta especie pertenece al grupo *Marginatae* y tiene similitudes con *Agave xglomeruliflora* (Engelm.) A. Berger. Es una planta perene, de 1.5 a 2 m de altura, 2 a

2.5 m de diámetro, con un promedio de 50 a 80 hojas por planta. Las hojas miden de 100 a 120 cm de largo y 9 a 12 cm de ancho en la parte media, lanceoladas, erectas, rígidas, fibrosas, de forma cóncava, verde-amarillentas, poseen un margen dentado con espinas de 4 a 6 mm de largo, dientes pequeños entre los más grandes, espina terminal de 2.5 a 3.5 cm de largo. Posee una inflorescencia racemoso-paniculada, pudiendo alcanzar una altura de 5.5 a 7 m, de 60 a 140 ramos laterales, 10 a 20 flores de 4.5 a 5.5 cm por umbela. Puede encontrarse en planicies y lomeríos sobre rocas calizas y suelos arenosos, a una altura de 150 a 800 m s.n.m. en matorral submontano y en transición hacia bosque. Esta especie también es llamada “Jarcia” por su nombre común y es normalmente utilizada para la elaboración de mezcal. Además, se ha encontrado que es posible la formación de híbridos con las especies *Agave funkiana* y *Agave univitatta* (García-Mendoza *et al.*, 2007).

2.4. Importancia del *Agave*

Además de México es aprovechado en distintas regiones de América con diversos fines, como: medicinales, bebidas, alimentos, obtención de fibras, material de construcción, ornamentales, de soporte de terrenos, combustible y de forraje (Bautista-D. & Arias-A., 2008; Espinosa-Barrera, 2015).

Son considerados especies de gran importancia en regiones áridas y semiáridas de México, por los abundantes componentes que pueden ofrecer al ecosistema (García-Mendoza, 2007).

2.4.1. Importancia económica

El *Agave* forma parte del 1.25% del PIB agrícola nacional y el 3.04% de la producción de agroindustriales. En el año 2016 la exportación de tequila representó un valor de 1,203 millones de dólares. La demanda internacional está en aumento, 26 países han incrementado el consumo desde el 2003, estos países en conjunto consumen anualmente 184 millones de litros. En otro contexto, la superficie cultivada de maguey en México al año del 2016 constaba de 111,420 hectáreas sembradas, las cuales un 89.78% de la superficie está mecanizada, 51.89% se encuentra con tecnología aplicada a la sanidad vegetal, y el 67.78% de la superficie sembrada de este cultivo contó en algún momento con asistencia técnica. Además, el 98.65% de la producción se mantiene por temporal (SAGARPA, 2017).

Al año 2020, Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura o FIRA por sus siglas, propone financiamientos para los agricultores que desean invertir en el cultivo de *Agave*, donde se especifican en un resumen de costos (FIRA, 2020).

Dichas prestaciones ofrecidas a los productores de *Agave*, además del comportamiento económico de este cultivo en aumento durante los últimos años ha convertido al *Agave* en una alternativa atractiva que se diferencia de las otras especies cultivadas tradicionalmente. Algunos agricultores de cultivos básicos (principalmente maíz) y pastoreo, han convertido sus campos en plantaciones de *Agave*, transformando los ecosistemas agronómicos que existían con anterioridad, esta dinámica en superficie de *Agave* sembrada aunada a otros factores, han ocasionado un cambio en los precios, pasando desde \$1.00 MXN kilo⁻¹ en el año 2005 a \$6.00

MXN kilo⁻¹ en el año 2015, y valor histórico de \$30.00 MXN kilo⁻¹ a finales del año 2019 (Herrera-Pérez *et al.*, 2018; Sanschagrín, 2020).

2.4.1.1. Productos de valor agregado

En México la fabricación de destilados de alcohol ha ocasionado un movimiento favorable de dinero por lo cual se decidió especificar la elaboración de estas bebidas como productos con denominación de origen, el DOF detalla las especificaciones del mezcal como una bebida alcohólica destilada mexicana con denominación de origen, 100 % de maguey o *Agave*, obtenida por destilación de jugos fermentados con microorganismos espontáneos o cultivados, extraídos de cabezas maduras de magueyes o *Agaves* cocidos (Diario Oficial de la Federación, 2016).

Algunos otros destilados con denominación de origen como bacanora y tequila también son detallados en las NOM 006 y 168 respectivamente (Diario Oficial de la Federación, 2004, 2012, 2016).

Por otro lado, personas alrededor del mundo están contemplando al *Agave*, para la producción de bioetanol, fibras, inulina, bioplásticos, fructosa, miel, jarabe, etanol y enzimas (Azad, 2018; Ibañez-Vázquez *et al.*, 2015).

Además de los destilados, en México también se utilizan especies de *Agave* (*Agave angustifolia* Haw., *A. americana* L. var. *americana*, *A. americana* L. var. *oaxacensis* Gentry, *A. angustiarum* Trel., y *A. kerchovey* Lem.) para la fabricación de ixtle o fibras duras extraídas de las hojas de estas especies. Estas cuerdas, lazos, morrales y artículos para uso agrícola han sido elaboradas y utilizadas por distintas comunidades indígenas, principalmente zapotecas y mixtecas (Palma-Cruz, 2017).

2.4.2. Producción de *Agave*

2.4.2.1. Mundial

El *Agave* es utilizado en países como Australia para la producción de bioetanol, además de aprovechar los subproductos, como las fibras e incluso inician con elaboración de inulina (Azad, 2018).

Países como Indonesia, India, Sudáfrica, Brasil, China, Kenia, Tanzania, Madagascar y Tailandia producen más de 300,000 toneladas de fibra provenientes de las hojas de distintas especies de *Agave* (Hulle *et al.*, 2015; Santoso, 2015; Smith & Figueiredo, 2015).

2.4.2.2. Nacional y estatal

Los principales productores de mezcal en México son, Jalisco, Guanajuato, Oaxaca, Tamaulipas, Michoacán y Zacatecas, con 101,767 hectáreas para la producción de *Agave* en el año 2019 (SIAP, 2020).

En el estado de Tamaulipas, donde es proveniente la especie, se destinaron 1,866 hectáreas para producción de *Agave* en el año 2019, en contraste con las 69,738 hectáreas producidas en Jalisco (SIAP, 2020).

Aunque no existen datos oficiales de la producción de *Agave* en Nuevo León, a nivel regional existen productores de destilados de *Agave* en municipios como Aramberri, Galeana, Santiago, Bustamante, Lampazos y Villaldama (García, 2017).

2.4.3. Importancia nutricionales y nutracéuticas

Algunas de las especies de la familia *Asparagaceae* tienen propiedades medicinales y beneficios a la salud (Rai *et al.*, 2012), y en este caso, el *Agave* no es la excepción.

El contenido de carbohidratos en el *Agave* es normalmente alto en la piña, y algunos de estos son fructooligosacáridos (FOS), como la inulina o agavina, los cuales pueden actuar como un sustituto de azúcar que pueden utilizar las personas con diabetes, al no ser digerido por el tracto digestivo humano. Además de ser una fuente alternativa de potasio, magnesio, calcio y vitamina C (Bautista-D. & Arias-A., 2008; Ibañez-Vázquez *et al.*, 2015).

2.4.4. Importancia de su conservación

Los *Agaves* representan una parte fundamental en el ecosistema, además de evitar la erosión del suelo, los *Agaves* representan un buen recurso alimenticio y energético para distintas especies animales por ser una fuente de néctar y azúcares. Algunas especies de murciélagos nectarívoros mantienen una dieta mayormente constituida por *Agave*, al grado de demostrarse una relación entre los patrones de movimiento de los murciélagos y la distribución de los *Agaves* (Galeón-Alcón & Moya, 2019).

2.4.4.1. Explotación de la flora silvestre

La explotación clandestina e irracional de *Agave* para destilados representa un problema grave en México, se considera que en los próximos años existirá un déficit de materia prima debido a la sobre explotación de ejemplares jóvenes, por lo cual, en

este momento es primordial acelerar la reproducción mediante la biotecnología (Cervantes-Ramírez, 2005; Flores-Morales *et al.*, 2009; García-Mendoza *et al.*, 2007)5, por esta razón se pretende encontrar protocolos eficientes para la multiplicación de la especie de manera controlada, ya que en muchos casos las especies de *Agave* se han encontrado en categoría de amenaza o en peligro de extinción, principalmente las especies silvestres (Aguilar-Jiménez *et al.*, 2018).

2.5. Propagación del *Agave*

De manera tradicional, el *Agave* puede ser propagado a través de semilla germinando plántulas con diversidad genética, y de manera asexual puede ser propagado por medio de brotes aéreos (bulbillos) y por medio de brotes rizomáticos (hijuelos). El método de propagación por semilla suele ser el menos común, debido a que los *Agaves* en producción generalmente no se deja crecer el escapo floral, además de producir una variabilidad genética y por lo general, una menor calidad de *Agave*. Por otro lado, el método de propagación por bulbillos es utilizado por algunos productores, sin embargo, es necesario hacerlos crecer en invernadero y esperar a que alcancen tamaño adecuado (50 a 70 cm de altura) para plantarlos en campo y puede tardar un periodo de 10 años en llegar a su desarrollo final. Por último, el método de propagación por hijuelos se comienza por cortar los brotes al alcanzar una altura de 25 cm y transferirlos a un vivero, donde al alcanzar una altura de 50 a 70 cm se plantan de manera permanente en el campo; este método suele ser el más utilizado por los productores de *Agave* ya que tarda aproximadamente 7 a 9 años en alcanzar su

completo desarrollo, dependiendo de la especie, calidad, variedad y al manejo que se le pueda dar (Garibay-Kuri, 1988).

2.6. Propagación *in vitro*

Considerando lo antes mencionado, en la última década las contribuciones para las técnicas *in vitro* utilizadas para la propagación vegetal han simplificado la tecnología de micropropagación y al mismo tiempo han aparecido nuevos desafíos. Los protocolos y técnicas de micropropagación existentes han costado una serie de pasos y esfuerzo a científicos e investigadores, algunos de estos utilizados rutinariamente en laboratorios, pero de gran importancia. Los factores determinantes son la combinación de la concentración con relación al volumen del medio y la composición de reguladores de crecimiento en el medio, el estado fisiológico y la competencia de las células y sus capacidades para la expresión morfogénica (Lyam *et al.*, 2012).

Algunos autores han recomendado el uso de citocininas y auxinas en conjunto para promover la multiplicación de brotes de *Agave*; con concentraciones de 4.0 mg L⁻¹ BAP y 1.0 mg L⁻¹ AIA se generó un promedio de 32.8 brotes en *Agave angustifolia* (Ríos-Ramírez *et al.*, 2017); con 0.05 mg L⁻¹ de TDZ y 1 mg L⁻¹ BAP se obtuvieron 2.67 brotes de *Agave victoriae-reginae* en promedio (Montejo-Guzmán & Núñez-Palenius, 2016); 3.0 mg L⁻¹ Kin con 0.3 mg L⁻¹ AIB produjeron el mayor número de brotes en *Agave durangensis* (González-Durán & Núñez-Palenius, 2015); 10 mg L⁻¹ BAP con 0.04 mg L⁻¹ 2,4-D con 14 brotes promedio en *Agave salmiana* (Puente-Garza *et al.*, 2015). Este último autor ha recomendado una tasa de 250:1 de BAP con 2,4-D para la

multiplicación de brotes en esta especie. Con esto se puede observar que los niveles y distintos tipos de fitohormonas y reguladores de crecimiento cambian de una especie a otra; *Agave cupreata* respondió mejor con 1.5 mg.L⁻¹ de BAP, con un promedio de 10.5 brotes por explante; *Agave difformis* con 0.2 mg.L⁻¹ de TDZ con 8.5 brotes por explante; la especie *Agave obscura* con 0.2 mg.L⁻¹ de TDZ produjo un promedio de 11 brotes por explantes; y *Agave potatorum* con 3.0 mg.L⁻¹ de Kin se obtuvo un promedio de 6.9 brotes por explante (Domínguez-Rosales *et al.*, 2008).

Un aspecto negativo muy importante en el cultivo *in vitro* es la hiperhidricidad, este fenómeno indeseable se favorece en medios de cultivo líquido y decrece con el incremento de agar en el medio, recomendándose concentraciones de 8.0 y 10.0 mg L⁻¹ de agar para evitar este efecto; además de la concentración de agentes gelificantes, las altas concentraciones de citoquininas en la fase de multiplicación favorecen la hiperhidricidad y reducen la capacidad de enraizamiento de la plántula (Caraballo *et al.*, 2006). La simple adición de NaCl en el medio de cultivo puede resolver parcialmente el problema de la hiperhidricidad en *Agave sisalana*, revirtiendo hasta el 38% de la hiperhidricidad en plántulas de esta especie (Nikam *et al.*, 2019).

Otro de los problemas de mayor importancia que enfrenta la producción de plántulas micropropagadas a gran escala es el estrés generado por el cambio de las condiciones de cultivo *in vitro* al momento de aclimatar (Monja-Mio *et al.*, 2015).

En la micropropagación del *Agave* existen diversas tecnologías utilizadas de cultivo *in vitro*, que combinadas son una alternativa viable que puede complementar las mejores características de cada método y disminuir aquellas que se deseen; Desde este punto de vista, la multiplicación de *A. montium-sancticaroli* por medio de tecnología híbrida,

la conveniencia y utilidad del medio sólido, además del medio líquido por SIT para su propagación en masa y enraizamiento (Santacruz-Ruvalcaba & Portillo, 2009).

2.7. Etapas de la micropropagación *in vitro*

Existen cinco etapas críticas para lograr una micropropagación *in vitro* exitosa. La etapa preparativa (etapa cero) para poder desarrollar un esquema de micropropagación seguro y con repetibilidad; la etapa de establecimiento (etapa uno) es aquella que se encarga de mantener un cultivo aséptico y viable; la etapa de proliferación (etapa dos) consiste en la proliferación, sin sacrificar los objetivos de las etapas tres (producción de esquejes o plántulas) y cuatro (aclimatación en condiciones controladas), y a la fidelidad del material vegetal producido (Debergh & Read, 1991).

2.7.1. Etapa cero: Preparación

Esta etapa fue ideada como un remedio a la contaminación en los cultivos. Una planta madre sembrada y crecida en condiciones de invernadero suele ser más higiénica que aquellas encontradas en ambientes externos (Debergh & Read, 1991).

Es necesario examinar visualmente síntomas de enfermedad de las potenciales plantas donadoras, examinar las bacterias cultivables, usar aislamientos por estriado de placas y utilizar diluciones seriadas para determinar la contaminación. Además de utilizar kits específicos para los patógenos conocidos de la especie. Es recomendado rechazar individuos altamente contaminados o enfermos si resulta práctico (Cassells, 1991).

La etapa cero incluye además parámetros como la luz, esta variable es un factor importante, especialmente cuando las plantas florecen bajo cierto control fotoperiódico, además la temperatura y los reguladores de crecimiento también son consideradas ya que influyen en el comportamiento de las plantas durante esta etapa (Debergh & Read, 1991).

2.7.2. Etapa uno: Iniciación o inducción del cultivo

El objetivo de esta etapa es iniciar un cultivo aséptico. Para la mayoría de los trabajos se eligen yemas apicales o axilares para el trabajo de micropropagación, sin embargo, algunas especies también pueden ser propagadas por medio de hojas y flores. Para poder llevar a cabo la micropropagación de manera exitosa es importante la adición de auxinas para estimular el crecimiento, y limitar la síntesis de fenoles, ya que estos pueden resultar fitotóxicos (Debergh & Read, 1991).

Es requerido examinar visualmente la contaminación de los cultivos y rechazar todos aquellos que están contaminados. Monitorear organismos cultivables en los cultivos restantes y utilizar kits específicos para cada patógeno conocido del cultivo y rechazar aquellos que están contaminados (Cassells, 1991).

2.7.3. Etapa dos: Multiplicación

Durante esta etapa los cultivos *in vitro* pueden proveer brotes para propagación subsecuente, además de mantener material para mantener el stock (Debergh & Read, 1991).

Es recomendado monitorear la producción para saber si existe contaminación. De existir, es recomendado revisar si el origen viene desde arriba del proceso o si afecta también la parte de debajo de este (Cassells, 1991).

2.7.4. Etapa tres: Elongación e inducción o desarrollo de raíces

Existen dos opciones en esta etapa: producir plántulas o esquejes. Esto depende del fin que se tenga para el cultivo. Algunos de los factores que son evaluados en esta etapa, como el número de brotes, longitud de brotes, número de brotes enraizados, número de raíces y longitud de raíces no suelen ser adecuados para ser juzgados por sí mismos, ya que la vitrificación es un aspecto que afecta el resultado final al ser transferidos a la última etapa (Debergh & Read, 1991).

Al igual que la etapa dos, es recomendado monitorear la producción para saber si existe contaminación (Cassells, 1991).

2.7.5. Etapa cuatro: Transferencia a condiciones de invernadero

Como era mencionado en la etapa anterior, la vitrificación puede ocurrir en plantas que lucen de manera “normal”, ya que este fenómeno produce anomalías a veces no visibles que pueden causar estrés hídrico en las plántulas durante la aclimatación. Los órganos formados durante el cultivo *in vitro* mantienen sus características, y el cambio gradual que normalmente se realiza en invernadero es realizado con el objetivo de formación de nuevos órganos con características propias del ambiente *ex vitro*. Una manera más efectiva es producir brotes *in vitro* con características de plantas aclimatada, y de esta manera, evitar la vitrificación (Debergh & Read, 1991).

El gradiente osmótico del medio juega un papel importante para revertir la vitrificación durante esta etapa, es recomendado la adición de Polietilenglicol (PEG) y Cloruro de sodio (NaCl) (hasta el 38% de hiperhidricidad revertida en *A. sisalana*) (Nikam *et al.*, 2019).

La progenie establecida debe ser muestreada y monitoreada para identificar posibles enfermedades conocidas en el cultivo, las cuales podrían haber estado debajo del nivel de detección *in vitro* (Cassells, 1991).

2.8. Micropropagación de Agave

La micropropagación de *Agave* spp. es ampliamente utilizada por las grandes casas productoras de destilados, lo cual significa una mayor tecnificación del cultivo, pero esta técnica se mantiene alejada del potencial financiero y de recursos humanos que poseen casas productoras de menor tamaño (Coelho, 2007). Además de ser fundamental en los sistemas de conservación de esta especie a través de los bancos de germoplasma, donde se mantienen ejemplares *in vitro* de distintas especies de *Agave* (Molphe-Balch *et al.*, 2012).

Aunque no es recomendado el cultivo *in vitro* de *Agave* por medio de semillas para el cultivo en campo (ya que esto puede carecer de uniformidad genética y calidad inferior), este origen vegetal es importante para evitar disminuir la diversidad genética que se ocasiona por el uso de las poblaciones clonales de *Agave* (Mandujano-Sánchez, 1985).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Localización del experimento

Esta investigación se realizó durante el periodo de agosto del 2018 a mayo del 2020 en el laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del campus de ciencias Agropecuarias (**Figura 1**), en General Escobedo, N.L. de la Universidad Autónoma de Nuevo León.



Figura 1. Instalaciones de la Facultad de Agronomía UANL. a) Localización del laboratorio de Cultivos Vegetales.

3.2. Material vegetal

El germoplasma vegetal utilizado consistió en semillas. Estas fueron recolectadas de ejemplares de *Agave silvestres* (**Figura 2**) de la especie *A. montium-sancticaroli*, provenientes de los municipios de San Carlos y Jiménez, Tamaulipas (**Figura 3**) durante el mes de mayo del 2018.



Figura 2. Recolección de semillas de *Agave* sp en el municipio de San Carlos, Tamaulipas. a) Separación de ramos florales del quiote; b) Separación de frutos; c) Semillas de *Agave* expuestas en el fruto.



Figura 3. Localización de los municipios de San Carlos (a) y Jiménez (b) del estado de Tamaulipas.

3.3. Pre-desinfestación

Para seleccionar las semillas viables de material vegetal recolectado, se inició con la separación de las semillas de los demás restos vegetales y se seleccionaron aquellas que estaban completamente negras, sin daño aparente, con el fin de obtener embriones maduros intactos (Figura 4 y Figura 5).



Figura 4. Semillas seleccionadas de *A. montium-sancticaroli*.

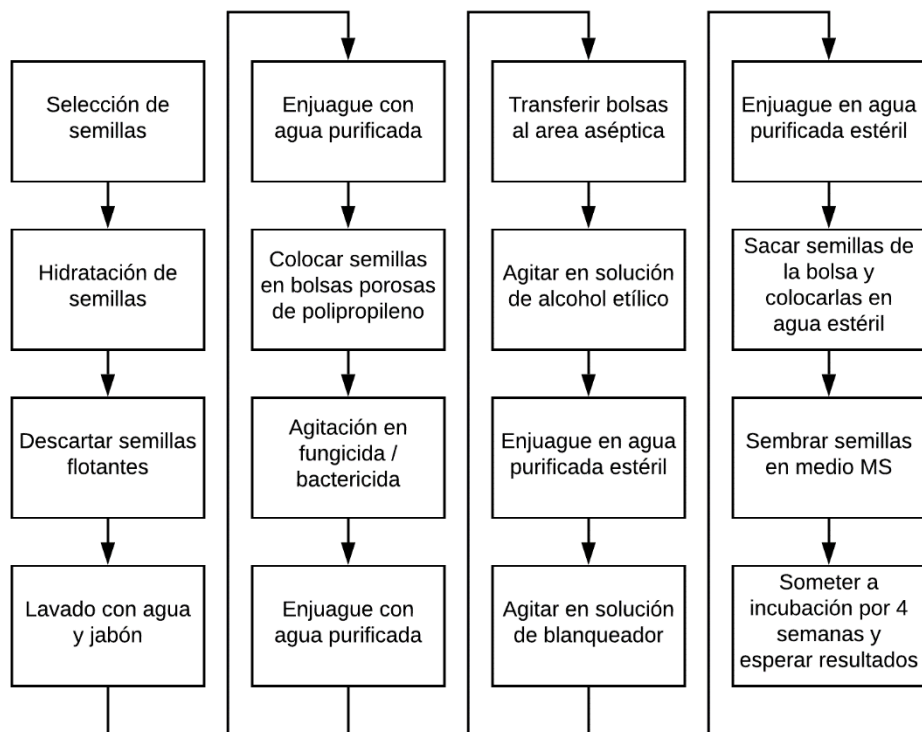


Figura 5. Diagrama de flujo del establecimiento aséptico de semillas.

Una vez separadas las semillas, estas se sumergieron en un vaso de precipitado con agua del grifo durante dos horas y se descartaron aquellas que flotaban en la superficie del vaso. Las semillas ya hidratadas se lavaron con detergente comercial líquido (Axion®) con la finalidad de eliminar los agentes contaminantes superficiales y se enjuagaron con agua del grifo. Posteriormente se colocaron en bolsas de polipropileno poroso y se sometieron a inmersión y agitación durante cuatro horas en una solución fungicida-bactericida compuesta por 3.0 g.L⁻¹ de Bavistin®, 600 mg.L⁻¹ de ácido cítrico y 2.0 g.L⁻¹ de Oxitetraciclina; continuando con un enjuague con abundante agua potable para finalmente ser llevados al proceso de desinfección bajo condiciones asépticas en campana de flujo laminar.

3.4. Establecimiento aséptico de semillas

3.4.1. Medio de cultivo

Para el desarrollo de esta etapa se utilizaron las sales básicas MS (Murashige & Skoog, 1962) (**Cuadro 1**), adicionado con 1.0 mg.L⁻¹ BAP. El pH del medio se ajustó a 5.8 ± 0.02 utilizando KOH o HCl 1.0 N y se añadieron 4.5 g.L⁻¹ de Phytigel™ como agente solidificante (**Figura 6**); después estos medios fueron dosificados 20.0 mL por frasco con capacidad de 125.0 mL y finalmente se esterilizaron en autoclave a 147.1 kPa durante 15 minutos.

Cuadro 1. Componentes de las sales básicas MS, suplementadas con sacarosa (Murashige & Skoog, 1962).

Componentes	Cantidad (mg L ⁻¹)	Componentes	Cantidad (mg L ⁻¹)
NH ₄ NO ₃	1650.000	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025
KNO ₃	1900.000	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440.000	Na ₂ ·EDTA	37.300
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370.000	FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.800
KH ₂ PO ₄	170.000	Myo-inositol	100.000
H ₃ BO ₃	6.200	Glicina	2.000
MnSO ₄ ·4H ₂ O	22.300	Ácido nicotínico	0.500
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.600	Piridoxina·HCl	0.500
KI	0.830	Tiamina·HCl	0.100
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.250	Sacarosa	30000.000

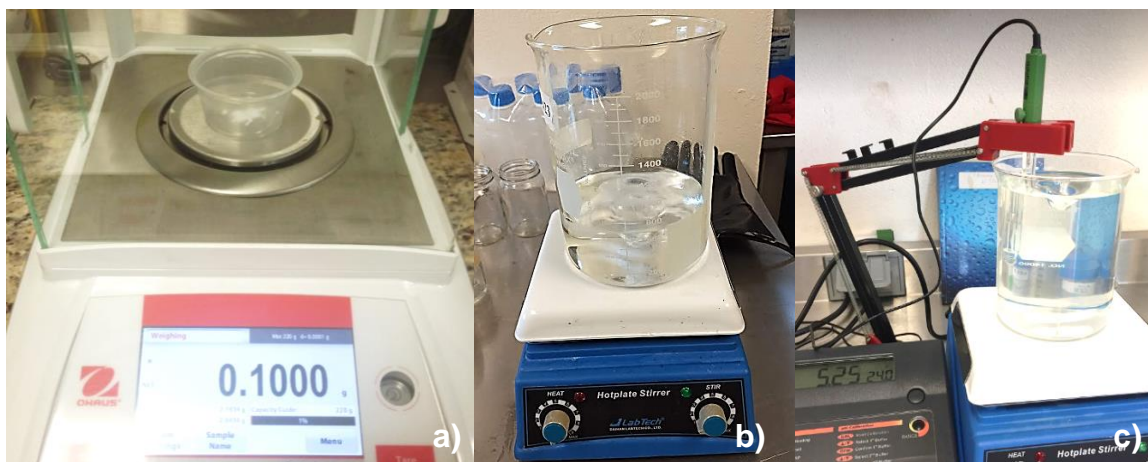


Figura 6. a) Balanza analítica; b) Plancha de calentamiento y agitación; c) Medición de pH utilizando potenciómetro.

3.4.1.1. Preparación de compuestos orgánicos

Estos compuestos de las sales básicas de MS fueron preparados en soluciones madres (**Cuadro 2**), mediante la disolución de compuestos por separado, con el fin de mezclar estos en una única solución de 20 ml. La adición de compuestos orgánicos al medio de cultivo se realizó agregando 1.0 mg de solución madre al medio, además de la incorporación del compuesto mio-inositol en 100 mg L⁻¹.

Cuadro 2. Preparación de vitaminas.

Compuesto	Cantidad (mg L ⁻¹)
Glicina	400
Ácido Nicotínico	20
Piridoxina-HCl	20
Tiamina-HCl	20

3.4.1.2. Preparación de reguladores de crecimiento

Primero se pesa el regulador de crecimiento, seguido por disolución utilizando al solvente y se aforó con agua destilada para obtener la concentración deseada (**Cuadro 3**). En el caso del regulador de crecimiento BAP se utilizó como KOH solvente ya que no produce degradación de este regulador de crecimiento (Huetteman & Preece, 1993).

Cuadro 3. Solventes utilizados con los reguladores de crecimiento.

Regulador de crecimiento	Solvente	Relación (mg:mL ⁻¹)
BAP	1N KOH	1:1
ANA	1N NaOH	1:1

3.4.2. Desinfestación

En condiciones asépticas, se colocaron las bolsas con semillas en una solución de alcohol etílico 70% (V/V) y 600 ppm de Gentamicina, agitándose durante 15 minutos y se realizaron tres enjuagues con agua bidestilada estéril. Subsiguientemente se sumergieron en una solución compuesta por blanqueador comercial (Cloralex®), 400 ppm de polisorbato (Tween™ 20) y 400 ppm de plata coloidal, agitándose durante un periodo de 7.5 min a 15.0 min (**Cuadro 4**), finalizando con tres enjuagues con abundante agua estéril (**Figura 7**).

Cuadro 4. Tratamientos de desinfestación de semillas de *A. montium-sancticaroli*.

Tratamiento	Etanol (% V/V*)	Tiempo de inmersión (min**)	Cloralex® (% V/V*)	Tiempo de inmersión (min**)
0	70.0	15.0	0.0	0.0
1	70.0	15.0	12.5	7.5
2	70.0	15.0	12.5	15.0
3	70.0	15.0	25.0	7.5
4	70.0	15.0	25.0	15.0

*Volumen sobre volumen; **Minuto (singular o plural).

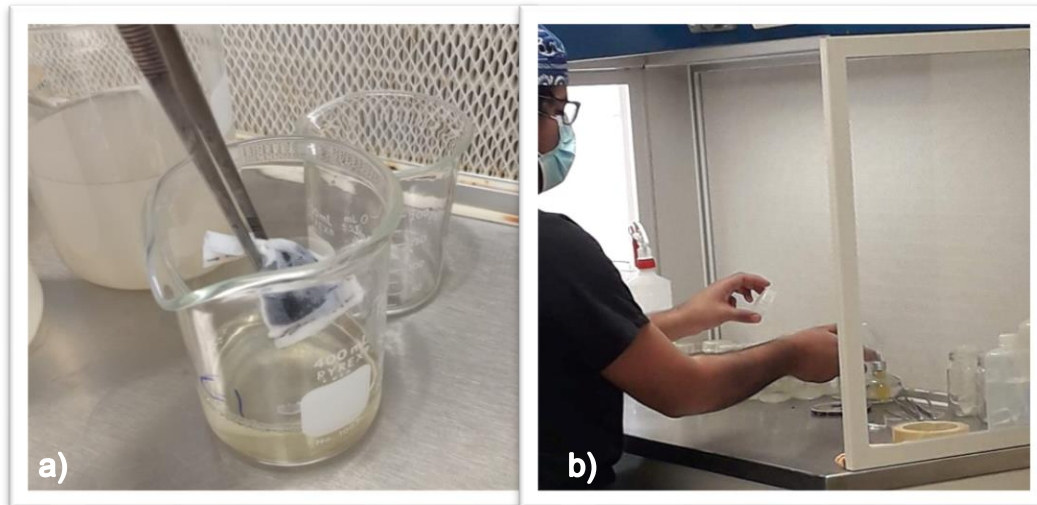


Figura 7. a) Bolsa de polipropileno con semillas de *A. montium-sancticaroli* en proceso de desinfestación; b) Establecimiento de semillas de *A. montium-sancticaroli* bajo condiciones asépticas.

3.4.3. Siembra de semillas

Concluida la desinfestación se sembraron 10 semillas por caja Magenta™ utilizando el medio de cultivo con las sales básicas de MS antes descrito, procurando distribuir las de manera uniforme en la caja y colocándolas cercanas a la superficie.

Las unidades experimentales fueron expuestas a condiciones de fotoperiodo de 16 horas luz y 8 de oscuridad a una temperatura de 24 ± 2 °C.

3.4.4. Diseño experimental

El modelo estadístico utilizado para esta etapa fue un diseño completamente al azar con arreglo factorial 2×2 ; donde el factor A es la concentración de Cloralex® y B es el tiempo de agitación (**Cuadro 4**), dando un total de cuatro tratamientos, un control y 10 repeticiones por tratamiento. Después de cuatro semanas se evaluó el porcentaje de asepsia y germinación de las semillas.

Los resultados fueron examinados con un análisis de varianza utilizando el paquete estadístico “Statistical Package for the Social Sciences” (SPSS).

3.5. Inducción de brotes

3.5.1. Medio de cultivo

Para el desarrollo de esta etapa se utilizaron las sales básicas de MS, adicionado con un balance hormonal (**Cuadro 5**), además de 30.0 g.L⁻¹ de sacarosa. El pH del medio se ajustó a 5.8 ± 0.02 utilizando KOH o HCl 1.0 N y se añadieron 4.5 ppm de Phytigel™ como agente solidificante; después este medio se aplicó en dosis de 40.0 mL por caja Magenta™, con capacidad de 360.0 mL y finalmente se esterilizaron en autoclave a 147.1 kPa durante 15 minutos.

Cuadro 5. Tratamientos fitohormonales utilizados para la inducción de brotes de *A. montium-sancticaroli*.

Tratamiento	BAP (ppm)	ANA (ppm)
0	-	-
1	1.0	-
2	2.0	-
3	1.0	0.3
4	2.0	0.3

En la figura se indica con un guion (-) la carencia de la hormona.

3.5.2. Transferencia a medio de inducción

En esta etapa se utilizaron plántulas de 1.0 cm de longitud provenientes de la etapa anterior. A estos se les eliminaron las raíces y se sembraron en medio con las sales básicas de MS con los tratamientos antes descritos. El subcultivo se realizó en condiciones de asepsia, dentro de la campana de flujo laminar. Acabada la transferencia las unidades experimentales fueron crecidas en condiciones controladas de fotoperiodo y temperatura, similares a la etapa anterior.

3.5.3. Diseño experimental

Establecidas bajo un diseño completamente al azar con arreglo factorial 2 x 2, donde (a) es la concentración de BAP y (b) la de ANA (**Cuadro 5**), dando un total de cuatro tratamientos, un testigo y 10 repeticiones por cada uno. Cumplidas ocho semanas se evaluó el número de brotes por explante y de explantes con brote. Los resultados obtenidos se analizaron con un análisis de varianza utilizando el paquete estadístico SPSS.

3.6. Multiplicación de brotes

3.6.1. Medio de cultivo

Para el desarrollo de esta etapa se utilizaron las sales básicas de MS, adicionado con un balance hormonal (**Cuadro 6**), además de 30.0 g L⁻¹ de sacarosa. El pH del medio se ajustó a 5.8 ± 0.02 utilizando KOH o HCl 1.0 N y se añadieron 4.5 ppm de Phytigel™

como agente solidificante; después estos medios fueron dosificados 40.0 mL por caja Magenta™, con capacidad de 360.0 mL y finalmente se esterilizaron en autoclave a 147.1 kPa durante 15 minutos.

Cuadro 6. Tratamientos utilizados para la multiplicación y enraizamiento de brotes de *A. montium-sancticaroli*.

Tratamiento	BAP (ppm)	ANA (ppm)
Control	-	-
1	3.0	0.1
2	4.0	0.1
3	3.0	0.3
4	4.0	0.3

En la figura se indica con un guion (-) la carencia de la hormona.

3.6.2. Subcultivo

En esta etapa se utilizaron plántulas de 1.0 cm de longitud provenientes de la etapa anterior. A estos se les eliminaron las raíces y se sembraron en las sales básicas de MS con los tratamientos antes descritos. El subcultivo se realizó en condiciones de asepsia, dentro de la campana de flujo laminar. Acabada la transferencia las unidades experimentales fueron expuestas a condiciones controladas de fotoperiodo y temperatura, similares a la etapa anterior.

3.6.3. Diseño experimental

Los tratamientos fueron establecidos bajo un diseño completamente al azar con arreglo factorial 2 x 2, donde el factor A fue la concentración de BAP y el factor B la

concentración de ANA (**Cuadro 6**), dando un total de cuatro tratamientos, un testigo y 10 repeticiones por cada uno. Cumplidas ocho semanas, se evaluó el número de explantes con brote, número de brotes por explante y longitud de brotes. Los resultados se analizaron con un análisis de varianza utilizando el paquete estadístico SPSS.

3.7. Enraizamiento de brotes

3.7.1. Medio de cultivo

Para el desarrollo de esta etapa se utilizaron las sales básicas de MS, adicionado con un balance hormonal (**Cuadro 6**), además de 30.0 g.L⁻¹ de sacarosa. El pH del medio se ajustó a 5.8 ± 0.02 utilizando KOH o HCl 1.0 N y se añadieron 4.5 ppm de Phytigel™ como agente solidificante; después este medio se aplicó en dosis de 40.0 mL por caja Magenta™, con capacidad de 360.0 mL y finalmente se esterilizaron en autoclave a 147.1 kPa durante 15 minutos.

3.7.2. Subcultivo

En esta etapa se utilizaron brotes de 3.0 cm de longitud provenientes de la etapa anterior. A estos se les eliminaron las raíces y se sembraron en las sales básicas de MS con los tratamientos antes descritos. El subcultivo se realizó en condiciones de asepsia, dentro de la campana de flujo laminar. Acabada la transferencia las unidades experimentales fueron crecidas en condiciones controladas de fotoperiodo y temperatura, similares a la etapa anterior.

3.7.3. Diseño experimental

Establecidas bajo un diseño completamente al azar con arreglo factorial 2 x 2, donde el factor A fue es la concentración de BAP y el factor B la concentración de ANA (**Cuadro 6**), dando un total de cuatro tratamientos, un testigo y 10 repeticiones por cada uno. Cumplidas seis semanas, se evaluó el número de raíces por explante y longitud de raíces. Los resultados se analizaron con un análisis de varianza utilizando el paquete estadístico SPSS.

3.8. Aclimatación de plantas *in vitro*

3.8.1. Sustrato

El sustrato utilizado para la aclimatación consistió en distintas proporciones de peat moss y perlita (**Cuadro 7**), para poder observar el efecto de la composición del sustrato en la aclimatación de la planta.

Cuadro 7. Tratamientos utilizados en la etapa de aclimatación de plantas de *A. montium-sancticaroli*.

Peat moss (%)	Perlita (%)	Fertilización foliar	
		SF*	CF**
100	0	T1	T6
75	25	T2	T7
50	50	T3	T8
25	75	T4	T9
0	100	T5	T10

*Sin Fertilizante; **Con Fertilizante.

3.8.2. Aclimatación

Para poder lograr la aclimatación de las plantas micropropagadas de *Agave* (**Figura 8**) se tomaron plantas enraizadas de la etapa anterior.

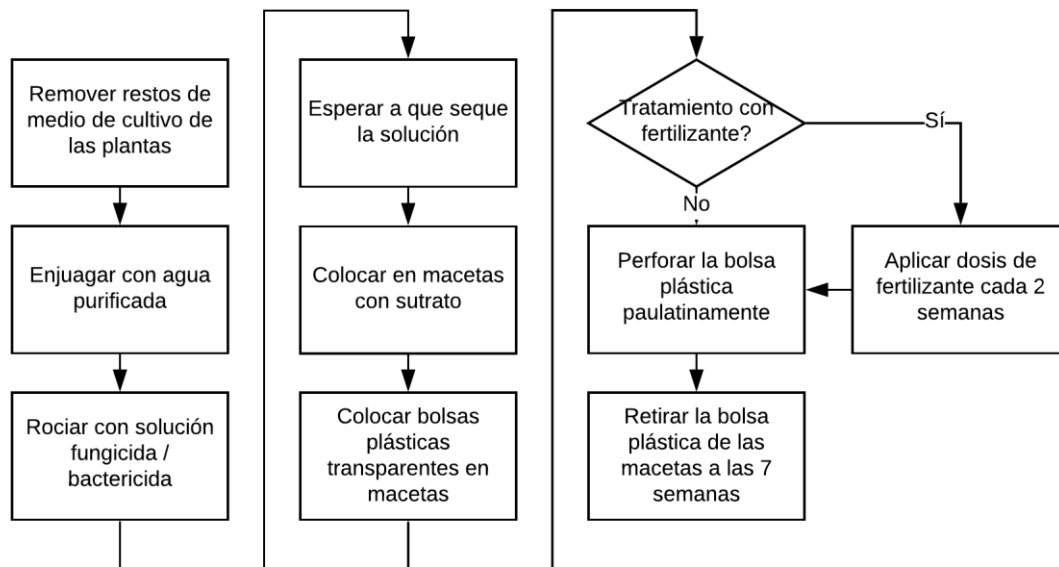


Figura 8. Diagrama de flujo del proceso de aclimatación.

Una vez seleccionadas, se prosiguió a remover el medio de cultivo de la planta, utilizando abundante agua potable. Posteriormente se humedecieron las plantas con solución fungicida-bactericida compuesta por 3.0 g.L⁻¹ de Bavistin®, 600 mg.L⁻¹ de ácido cítrico y 2.0 g.L⁻¹ de Oxitetraciclina y se dejaron reposar por cuatro horas. Después, las plantas fueron transferidas a macetas de 400 mL con los sustratos especificados anteriormente y en los tratamientos 6 a 10 (**Cuadro 7**) se aplicaron fertilizaciones foliares cada dos semanas con 5 ppm con Ferti Plus^{MR}. A las macetas se les colocaron bolsas plásticas transparentes para mantener la humedad y estas

fueron perforadas paulatinamente durante el periodo de aclimatación hasta retirar por completo la bolsa a la séptima semana.

3.8.3. Diseño experimental

Los tratamientos (**Cuadro 7**) fueron establecidas bajo un diseño completamente al azar con 10 repeticiones cada uno. Cumplidas 10 semanas se evaluó el número, longitud y ancho de hojas; además del número de plantas vivas.

Los resultados se analizaron con un análisis de varianza utilizando el paquete estadístico SPSS.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Establecimiento aséptico de semillas

La contaminación microbiana reduce la eficiencia en el establecimiento y propagación de *A. montium-sancticaroli*, por esta razón es primordial iniciar con un proceso de desinfestación para poder llevar las semillas a un ambiente *in vitro* (Abreu *et al.*, 2016). En esta etapa se evaluó la asepsia y la germinación de las semillas, cumplidas cuatro semanas de haberse establecido en el medio.

4.1.1. Asepsia

Durante el establecimiento aséptico de las semillas de *A. montium-sancticaroli* se obtuvieron resultados proporcionales a la concentración de lejía, donde el T4 (25% V/V de lejía y 15 minutos de inmersión) mostró los mejores resultados, con una media del 100% de asepsia (**Cuadro 8**), esto coincide con distintos establecimientos de *Agave* por medio de semillas (Domínguez-Rosales *et al.*, 2008; Flores-Morales *et al.*, 2009; Mejía-franco & Arzate-Fernández, 2011; Silos-Espino *et al.*, 2011).

Cuadro 8. Comparación de medias estimadas por tratamiento. Variable dependiente: Asepsia.

#	Tratamiento		Media***	Error estándar	Intervalo de confianza al 95%	
	Cl*	min**			Límite inferior	Límite superior
0	0	0.0	0.00e	0.033	-0.066	0.066
1	12.5	7.5	0.20d	0.033	0.134	0.266
2	12.5	15.0	0.56c	0.033	0.494	0.626
3	25.0	7.5	0.82b	0.033	0.754	0.886
4	25.0	15.0	1.00a	0.033	0.934	1.066

*Concentración de blanqueador en porcentaje; **minutos en agitación; ***porcentaje de asepsia (1.00=100%). Las letras (a-d) representan distintos subconjuntos homogéneos.

4.1.2. Germinación

Por otro lado, la germinación se demostró afectada negativamente en los tratamientos con lejía al 12.5% y más favorecida en los tratamientos al 25%, siendo el tratamiento T4 el que logró mejores resultados, con un 94% de germinación (**Cuadro 9**); siendo así, una menor contaminación por microbios resulta en una mejor germinación (**Figura 9**) (Abreu *et al.*, 2016; Domínguez-Rosales *et al.*, 2008).

Cuadro 9. Comparación de medias estimadas por tratamiento. Variable dependiente: Germinación.

#	Tratamiento		Media***	Error estándar	Intervalo de confianza al 95%	
	Cl*	min**			Límite inferior	Límite superior
0	0.0	0.0	0.070 c	0.039	-.007	.147
1	12.5	7.5	0.330 b	0.039	.253	.407
2	12.5	15.0	0.470 b	0.039	.393	.547
3	25.0	7.5	0.790 a	0.039	.713	.867
4	25.0	15.0	0.940 a	0.039	.863	1.017

*Concentración de blanqueador en porcentaje; **minutos en agitación; ***porcentaje de germinación (1.00=100%). Las letras (a-c) representan distintos subconjuntos homogéneos.

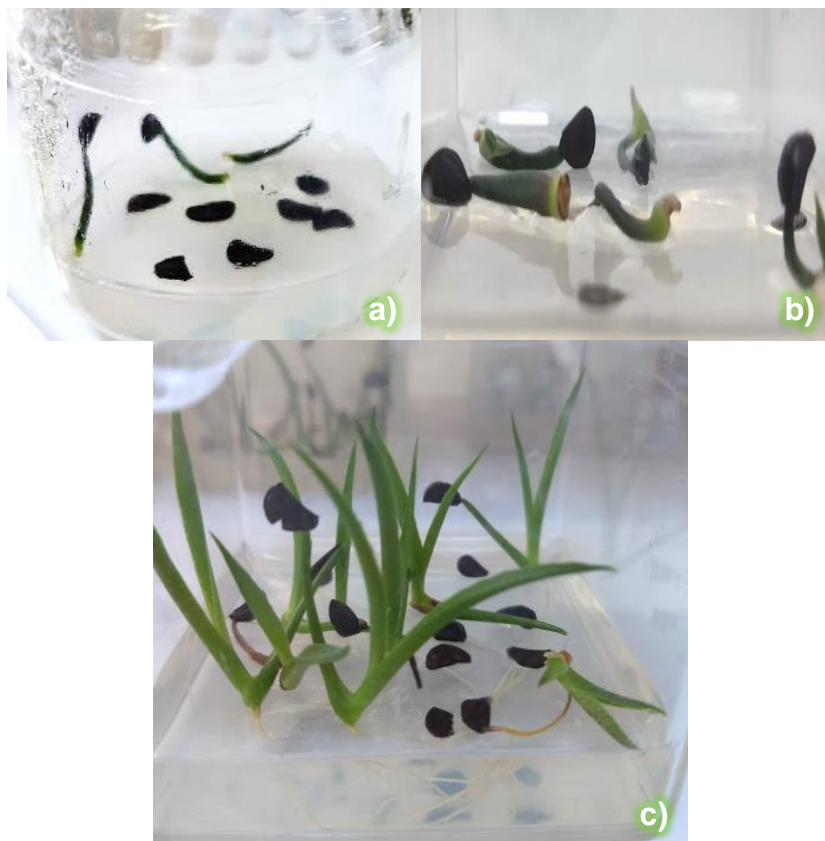


Figura 9. Semillas de *A. montium-sancticaroli*: a) con 10 días de establecidas; b) con 20 días de establecidas; c) con 30 días de establecidas.

4.2. Inducción de brotes

Una vez logrado el establecimiento aséptico, las plántulas se sometieron a inducción de brotes, evaluándose el número de explantes con brotes y brotes por explante, transcurridas seis semanas de haberse subcultivado en esta etapa. La utilización de ANA, siendo una auxina, ayuda a la elongación de los brotes, mientras que el uso de BAP estimula la división celular y la formación de células vegetativas de brotes en los explantes de *A. montium-sancticaroli* lo cual coincide con los resultados obtenidos en esta etapa (Hurtado-M. & Merino-M., 1987; Millán-Soto *et al.*, 2019).

Además se ha encontrado que la coloración de estos brotes está relacionada con el éxito en la inducción de los brotes, siendo un color amarillo crema una inducción no exitosa y un verde intenso una buena respuesta de inducción (**Figura 10**), debido a la alta concentración de citocininas, las cuales incrementan la concentración de clorofila a través de la diferenciación celular (Angeles-Espino *et al.*, 2012).

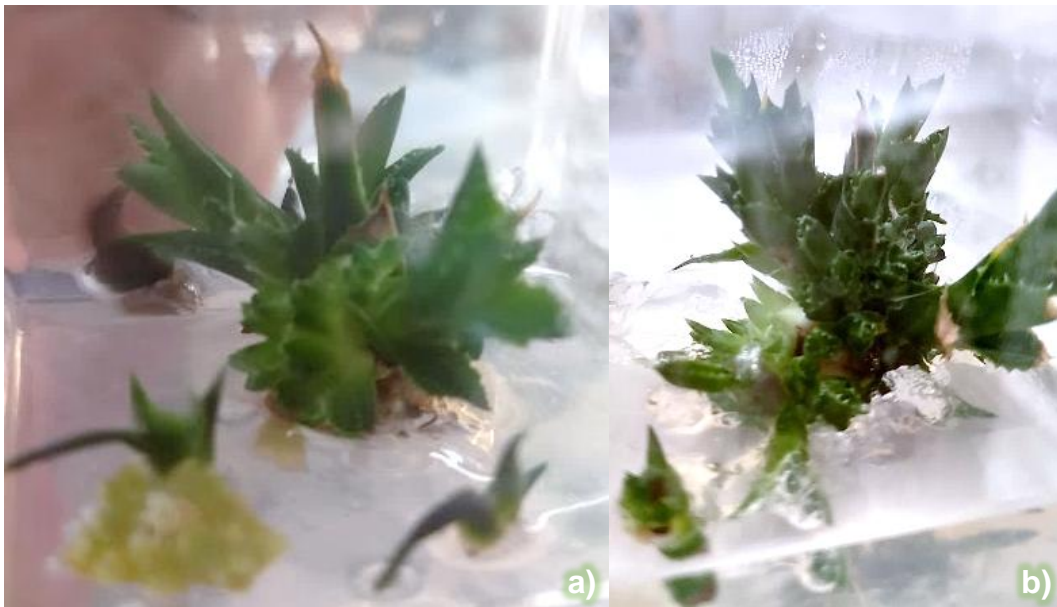


Figura 10. Explante de *A. montium sancticaroli* con brotes (a y b) después de 8 semanas de establecido.

4.2.1. Frecuencia de explantes con brotes

En cuanto al número de explantes con brotes, se encontró que el tratamiento 4 obtuvo una media 2.77 de explantes con brotes (**Cuadro 10**), lo cual coincide con lo señalado por distintos autores, en *A. potatorum* Zucc, *Agave marmorata* Roezl y *Asparagus officinalis* L. (Aguilar-Jiménez & Rodríguez-De-la-O, 2018; Aguilar-Jiménez *et al.*, 2018; Millán-Soto *et al.*, 2019), donde se observa inducción de brotes en tratamientos con combinaciones de auxinas y citocininas.

Cuadro 10. Comparación de medias estimadas por tratamiento. Variable dependiente: Explantes con brotes.

#	Tratamiento		Media***	Error estándar	Intervalo de confianza al 95%	
	BAP*	ANA**			Límite inferior	Límite superior
0	0.0	0.0	0.350 c	.178	.000	.700
1	1.0	0.0	1.650 b	.178	1.300	2.000
2	2.0	0.0	2.350 a	.178	2.000	2.700
3	1.0	0.3	2.433 a	.178	2.084	2.783
4	2.0	0.3	2.767 a	.178	2.417	3.116

*Concentración de BAP en mg.L⁻¹; **Concentración de ANA en mg.L⁻¹; ***número de explantes con brotes. Las letras (a-c) representan distintos subconjuntos homogéneos.

4.2.2. Frecuencia de brotes por explante

El número de brotes por explante resultó con una media de 3.6 brotes en el tratamiento 4 (**Cuadro 11**), esto es menor a los resultados obtenidos en *A. marmorata* Roezl, *A. salmiana* y *Agave* spp. lo cual podría indicar que las concentraciones y/o fitohormonas utilizadas no son las óptimas (Aguilar-Jiménez & Rodríguez-De-la-O, 2018; Molphe-Balch *et al.*, 2012; Silos-Espino *et al.*, 2011).

Cuadro 11. Comparación de medias estimadas por tratamiento. Variable dependiente: Brotes por explante.

#	Tratamiento		Media***	Error estándar	Intervalo de confianza al 95%	
	BAP*	ANA**			Límite inferior	Límite superior
0	0.0	0.0	0.350 c	0.197	-0.037	0.737
1	1.0	0.0	2.283 b	0.197	1.896	2.670
2	2.0	0.0	3.033 ab	0.197	2.646	3.420
3	1.0	0.3	3.567 a	0.197	3.180	3.954
4	2.0	0.3	3.633 a	0.197	3.246	4.020

*Concentración de BAP en mg.L⁻¹; **Concentración de ANA en mg.L⁻¹; ***número de brotes por explante. Las letras (a-c) representan distintos subconjuntos homogéneos.

4.3. Multiplicación de brotes

En esta etapa se subcultivaron las plántulas y después de ocho semanas se evaluó el número de explantes con brotes, los brotes por explante, además de la longitud de los brotes.

4.3.1. Explantes con brotes

Los resultados obtenidos demostraron que todos los tratamientos propiciaron un mayor número de explantes con brotes con respecto al control (**Cuadro 12 y Figura 11**) esto coincide con lo reportado por Domínguez-Rosales *et al.* (2008) quien hace análisis de BAP y otras fitohormonas.



Figura 11. Brotes de *A. montium-sancticaroli* a partir de planta madre después de 8 semanas de establecido.

Cuadro 12. Comparación de medias estimadas por tratamiento. Variable dependiente: Explantes con brotes.

#	Tratamiento		Media***	Error estándar	Intervalo de confianza al 95%	
	BAP*	ANA**			Límite inferior	Límite superior
0	0.0	0.0	0.283 b	0.039	0.206	0.361
1	3.0	0.1	0.850 a	0.039	0.773	0.927
2	4.0	0.1	0.917 a	0.039	0.839	0.994
3	3.0	0.3	0.983 a	0.039	0.906	1.061
4	4.0	0.3	0.967 a	0.039	0.889	1.044

*Concentración de BAP en mg.L⁻¹; **Concentración de ANA en mg.L⁻¹; ***número de explantes con brotes. Las letras (a-c) representan distintos subconjuntos homogéneos.

4.3.2. Brotes por explante

Asimismo, se encontró que los tratamientos con 2, 3 y 4 resultaron los mejores para la multiplicación de brotes, donde el tratamiento 4 alcanzó una media de 3.5 brotes (**Cuadro 13**), esto coincide con las observaciones realizadas en *A. angustifolia* (Ríos-Ramírez *et al.*, 2017), donde se encontró que las concentraciones de BAP tienen una alta significancia en el número de brotes por explante.

Cuadro 13. Comparación de medias estimadas por tratamiento. Variable dependiente: Brotes por explante.

#	Tratamiento		Media***	Error estándar	Intervalo de confianza al 95%	
	BAP*	ANA**			Límite inferior	Límite superior
0	0.0	0.0	0.283 c	0.176	-0.063	0.629
1	3.0	0.1	1.933 b	0.176	1.587	2.279
2	4.0	0.1	2.933 a	0.176	2.587	3.279
3	3.0	0.3	2.917 a	0.176	2.571	3.263
4	4.0	0.3	3.483 a	0.176	3.137	3.829

*Concentración de BAP en mg.L⁻¹; **Concentración de ANA en mg.L⁻¹; ***número de brotes por explante. Las letras (a-c) representan distintos subconjuntos homogéneos.

4.3.3. Longitud de brotes

En cuanto a la longitud de brotes, el tratamiento 3 obtuvo una media de 7.4 cm (**Cuadro 14**), esto coincide con lo encontrado en *A. angustifolia* (Ríos-Ramírez *et al.*, 2017), donde se demuestra la relación entre auxinas y citocininas para una mayor longitud de hojas.

Cuadro 14. Comparación de medias estimadas por tratamiento. Variable dependiente: Longitud de brotes.

#	Tratamiento		Media***	Error estándar	Intervalo de confianza al 95%	
	BAP*	ANA**			Límite inferior	Límite superior
0	0.0	0.0	0.633 c	0.311	0.022	1.245
1	3.0	0.1	5.965 b	0.311	5.353	6.577
2	4.0	0.1	7.047 ab	0.311	6.435	7.658
3	3.0	0.3	7.385 a	0.311	6.773	7.997
4	4.0	0.3	6.160 b	0.311	5.548	6.772

*Concentración de BAP en mg.L⁻¹; **Concentración de ANA en mg.L⁻¹; ***longitud de brotes (cm). Las letras (a-c) representan distintos subconjuntos homogéneos.

4.4. Enraizamiento de brotes

Las raíces forman parte esencial para la supervivencia al momento de la aclimatación. La longitud y número de raíces por explante se evaluó una vez transcurridas 6 semanas de haberse subcultivado en esta etapa.

4.4.1. Raíces por explante

La capacidad de enraizamiento en los tratamientos fue mayor estadísticamente a la obtenida en el control, el cual carecía de auxinas (**Cuadro 15 y Figura 12**), esto

coincide con lo reportado en *A. angustifolia* (Enríquez-del-Valle *et al.*, 2005), donde se recomienda el uso de ácido indolbutírico (AIB) para inducir enraizamiento, contrario a lo reportado en *A. vitoriae-reginae* (Martínez-Palacios *et al.*, 2003) donde se ha obtenido una alta tasa de enraizamiento en tratamientos donde no se habían utilizado auxinas y en *A. durangensis* (Godoy-Díaz & Núñez-Palenius, 2015) donde se obtuvieron mejores resultados a bajas concentraciones de auxinas (0.1 mgL^{-1} AIB).



Figura 12. Enraizamiento de plántulas de *A. montium-sancticaroli* después de 6 semanas de establecido: a) Vista inferior; b) Vista lateral.

Cuadro 15. Comparación de medias estimadas por tratamiento. Variable dependiente: Raíces por explante.

#	Tratamiento		Media***	Error estándar	Intervalo de confianza al 95%	
	BAP*	ANA**			Límite inferior	Límite superior
0	0.0	0.0	13.478 c	0.160	13.164	13.792
1	3.0	0.1	14.143 b	0.160	13.829	14.457
2	4.0	0.1	14.385 ab	0.160	14.071	14.699
3	3.0	0.3	14.152 b	0.160	13.838	14.466
4	4.0	0.3	14.825 a	0.160	14.511	15.139

*Concentración de BAP en mg.L^{-1} ; **Concentración de ANA en mg.L^{-1} ; ***número de raíces por explante. Las letras (a-c) representan distintos subconjuntos homogéneos.

4.4.2. Longitud de raíces

La longitud de raíces mostró mayor en el tratamiento 3, con una media de 14.36 cm (**Cuadro 16**), esto contrasta con las concentraciones de 3.0 y 10.0 mgL⁻¹ utilizadas en *A. marmorata* Roezl (Aguilar-Jiménez & Rodríguez-De-la-O, 2018).

Cuadro 16. Comparación de medias estimadas por tratamiento. Variable dependiente: Longitud de raíces.

#	Tratamiento		Media***	Error estándar	Intervalo de confianza al 95%	
	BAP*	ANA**			Límite inferior	Límite superior
0	0.0	0.0	12.592 c	0.217	12.164	13.020
1	3.0	0.1	13.485 b	0.217	13.057	13.913
2	4.0	0.1	13.908 ab	0.217	13.480	14.336
3	3.0	0.3	14.360 a	0.217	13.932	14.788
4	4.0	0.3	13.318 ab	0.217	12.890	13.746

*Concentración de BAP en mg.L⁻¹; **Concentración de ANA en mg.L⁻¹; ***Longitud de raíces (cm).

4.5. Aclimatación de plantas regeneradas

En la etapa de aclimatación una vez transferidas a las macetas se evaluó a las 10 semanas la supervivencia de las plantas (**Figura 13**), así como el número, longitud y ancho de hojas. La transición entre ambientes *in vitro* y *ex vitro* conllevan a estrés en las plantas consideradas a aclimatar, esto es debido a complejos estomatales poco desarrollados y la ausencia de cera en las hojas (Monja-Mio *et al.*, 2015). Asimismo, una pronta aplicación de nutrientes puede ayudar a obtener un mayor vigor en la planta (Ríos-ramírez *et al.*, 2018).



Figura 13. Plantas de *A. montium-sancticaroli* después de 4 semanas de aclimatación (a y b).

4.5.1. Supervivencia de las plantas

No se presentaron diferencias entre los tratamientos para la supervivencia de plantas, sin embargo, se demostró una alta supervivencia; esto coincide con lo evaluado en *A. americana*, donde se encontró que la aclimatación de esta *Agave* se realiza de mejor manera cuando se presenta un cambio paulatino de condiciones ambientales en un transcurso de 35 a 70 días (Yescas-Arreola *et al.*, 2016), aunque también puede ser realizado de manera brusca, ocasionando mayor estrés a la planta y una menor supervivencia (Kancab-Uc, 2016).

4.5.2. Número de hojas

El número de hojas de las plantas resultó mejor en los tratamientos T8 y T9 con las mayores medias de 6.6 hojas por planta (**Cuadro 17**), esto podría compararse con resultados obtenidos en *A. americana* (Yescas-Arreola *et al.*, 2016) donde se encontró que las dosis en *Agave parviflora* (Kancab-Uc, 2016) donde se encontró que el número

de hojas nuevas surgen como respuesta de la planta a nuevas condiciones ambientales, estas nuevas hojas tienen una mejor respuesta a las condiciones *ex vitro* debido a sus complejos estomatales ya madurados y empiezan a producir cera protectora (Monja-Mio *et al.*, 2015).

Cuadro 17. Comparación de medias estimadas por tratamiento. Variable dependiente: Número de hojas.

#	Tratamiento			Media***	Error estándar	Intervalo de confianza al 95%	
	FF*	Peat moss**	Perlita**			Límite inferior	Límite superior
1		100	0	4.400 bc	0.429	3.548	5.252
2		75	25	4.000 c	0.429	3.148	4.852
3		50	50	4.600 bc	0.429	3.748	5.452
4		25	75	5.200 abc	0.429	4.348	6.052
5		0	100	4.100 c	0.429	3.248	4.952
6	*	100	0	5.100 abc	0.429	4.248	5.952
7	*	75	25	5.400 abc	0.429	4.548	6.252
8	*	50	50	6.600 a	0.429	5.748	7.452
9	*	25	75	6.600 a	0.429	5.748	7.452
10	*	0	100	6.300 ab	0.429	5.448	7.152

*Fertilizante foliar (FF) aplicado en concentración de 5 mg.L⁻¹; **Porcentaje de sustrato en volumen; ***número de hojas.

4.5.3. Longitud de hojas

Una mayor longitud de hojas se hizo notar en aquellos tratamientos fertilizados en general, pero existió una mejor respuesta en los tratamientos 8 y 9, con 7.52 y 7.20 cm en promedio (**Cuadro 18**), donde se puede comparar con lo señalado en la especie *A. potatorum* Zucc. (Enríquez-Del-Valle *et al.*, 2016) donde se encontró como está

relacionada la dosis de fertilizante aplicada y materia orgánica en el sustrato con la longitud de las hojas.

Cuadro 18. Comparación de medias estimadas por tratamiento. Variable dependiente: Longitud de hojas.

#	Tratamiento		Media***	Error estándar	Intervalo de confianza al 95%			
	FF*	Peat moss**			Perlita**	Límite inferior	Límite superior	
1		100	0	3.703	d	0.385	2.938	4.468
2		75	25	4.137	d	0.385	3.372	4.902
3		50	50	4.980	cd	0.385	4.215	5.745
4		25	75	5.099	bcd	0.385	4.334	5.864
5		0	100	4.103	d	0.385	3.338	4.868
6	*	100	0	6.390	abc	0.385	5.625	7.155
7	*	75	25	6.783	ab	0.385	6.018	7.548
8	*	50	50	7.520	a	0.385	6.755	8.285
9	*	25	75	7.202	a	0.385	6.437	7.967
10	*	0	100	6.829	ab	0.385	6.064	7.594

*Fertilizante foliar (FF) aplicado en concentración de 5 mg.L⁻¹; **Porcentaje de sustrato en volumen; ***longitud de hojas (cm).

4.5.4. Ancho de hojas

Al momento de analizar el ancho de las hojas se encontró que en los tratamientos T6 a T10 tuvieron una mayor media, siendo la media del tratamiento T9 la más alta, con 1.31 cm de ancho (**Cuadro 19**), esto indica que las dosis de fertilizante ayudan a la planta a producir hojas de mayor tamaño como lo indican otros autores (Enríquez-Del-Valle *et al.*, 2016; Yescas-Arreola *et al.*, 2016).

Cuadro 19. Comparación de medias estimadas por tratamiento. Variable dependiente: Ancho de hojas.

#	Tratamiento			Media***	Error estándar	Intervalo de confianza al 95%	
	FF*	Peat moss**	Perlita**			Límite inferior	Límite superior
1		100	0	0.573 b	0.063	0.448	0.698
2		75	25	0.546 b	0.063	0.421	0.671
3		50	50	0.700 b	0.063	0.575	0.825
4		25	75	0.693 b	0.063	0.568	0.818
5		0	100	0.588 b	0.063	0.463	0.713
6	*	100	0	1.089 a	0.063	0.964	1.214
7	*	75	25	1.226 a	0.063	1.101	1.351
8	*	50	50	1.274 a	0.063	1.149	1.399
9	*	25	75	1.308 a	0.063	1.183	1.433
10	*	0	100	1.291 a	0.063	1.166	1.416

*Fertilizante foliar (FF) aplicado en concentración de 5 mg.L⁻¹; **Porcentaje de sustrato en volumen; ***ancho de hojas (cm).

4.6. Discusión general

La inducción de brotes se logró con el uso de 6-N-Bencilaminopurina, ocasionando una inducción mayor de brotes al fomentar la diferenciación celular.

Una buena multiplicación y elongación de brotes se obtuvo al utilizar la combinación de una auxina y una citocinina en estas etapas.

El enraizamiento de los brotes fue mayor cuando se adiciono al medio de cultivo el ANA, obteniendo un mayor número de raíces por brote.

Cuando se requiere transferir la planta de ambiente *in vitro* a *ex vitro* es importante la materia orgánica disponible en el sustrato, así como la aplicación de fertilizantes, ya

que estos proveen los elementos necesarios para el desarrollo de hojas nuevas de las plantas en aclimatación. Además, se demuestra que la relación perlita : Peat moss causa un efecto benéfico en los tratamientos en los que la relación era 50:50 (T3 y T8) y 75:25 (T4 y T9) respectivamente. Siendo de esta manera T8 el mejor tratamiento para aclimatar la especie (**Figura 14**).



Figura 14. *A. montium-sancticaroli* en maceta después de cuatro meses de haber sido aclimatada exitosamente.

5. CONCLUSIONES

En este trabajo se llevó a cabo exitosamente la micropropagación de brotes de *Agave montium-sancticaroli* mediante el uso de diversas concentraciones de reguladores de crecimiento. Las sales minerales del medio de cultivo con las sales básicas de Murashige y Skoog son óptimas para todas las etapas de desarrollo *in vitro* de la especie.

El protocolo de micropropagación de *A. montium-sancticaroli* permitió la multiplicación masiva *in vitro*. La técnica de desinfección del establecimiento aséptico de las semillas de la especie en estudio fue adecuada para erradicar la carga microbiana de las semillas, logrando establecerlos *in vitro* sin la presencia de alguna colonia creciendo de algún microorganismo visible en las sales básicas de MS suplementadas con reguladores de crecimiento. La inducción de brotes se vio favorecida con la combinación de una auxina y una citocinina, en este caso se logró con el uso del BAP ya que es sabido que este estimula la división celular y la formación de células vegetativas de brotes en los explantes, mientras que el uso del ANA ayuda a la elongación de los brotes. La capacidad de enraizamiento de brotes regenerados *in vitro* demostró buena respuesta y resultó en un proceso exitoso de aclimatación al transferir las plantas de *A. montium-sancticaroli* regeneradas al ambiente *ex vitro*,

donde se observó como la disponibilidad de nutrientes a partir de aplicaciones de un fertilizante foliar influye en la capacidad de la planta para generar mayor número, ancho y largo de hojas, además de poderse observar vigor en las plantas, sus características favorables como la formación de cutícula cerosa y mayor rigidez señalaron una aclimatación apropiada.

6. LITERATURA CONSULTADA

- Abreu, E., Sosa-del-Castillo, M., Ascunce-del-Sol, G., & González, G. (2016). Efecto de antibióticos en la propagación *in vitro* de *Agave fourcroydes* Lem. *Biotecnología Vegetal*, 16(1), 31–36.
- Aguilar-Jiménez, D., & Rodríguez-De-la-O, J. L. (2018). Micropropagación y aclimatación de Maguey Pitzometl (*Agave marmorata* Roezl) en la Mixteca Poblana. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 20(2), 124–131.
<https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v20n2.77084>
- Aguilar-Jiménez, D., Rodríguez-de la O, J. L., & Herrera-López, H. (2018). Obtención de brotes *in vitro* en *Agave potatorum* Zucc. *Revista Científica Multidisciplinaria*, 2(29), 5–7.
- Angeles-Espino, A., Valencia-Botín, A. J., Virgen-Calleros, G., Ramírez-Serrano, C., Paredes-Gutiérrez, L., & Hurtado-De la peña, S. (2012). *Micropropagación de Agave (Agave tequilana* Weber. var. *Azul) a través de yemas axilares*. 15, 693–698.
- Azad, A. K. (2018). Advances in Eco-Fuels for a Sustainable Environment. En A. K.

Azad (Ed.), *Woodhead Publishing Series in Energy*.

<https://doi.org/10.1016/c2017-0-04211-8>

Bautista-D., N., & Arias-A., G. C. (2008). Estudio químico bromatológico de aguamiel de *Agave americana* L. (Maguey). *Ciencia e Investigación*, 11(2), 46–51.

Brummitt, R. K. (1992). Vascular plant families and genera. Recuperado de Royal Botanic Gardens, Kew website: <http://data.kew.org/vpfg1992/AGAVACEAE.TXT>

Callen, E. O. (1965). Food Habits of Some Pre-Columbian Mexican Indians.

Economic Botany, 19(4), 335–343. Recuperado de

<http://www.jstor.org/stable/4252642>

Caraballo, M. G., García, S. A., & Oramas, G. G. (2006). *Influencia del estado físico del medio de cultivo y diferentes combinaciones de reguladores del crecimiento sobre la formación de brotes axilares en Agave fourcroydes Lem .* 6(1), 3–7.

Cassells, A. C. (1991). Problems in tissue culture: culture contamination. En P. C.

Debergh & R. H. Zimmerman (Eds.), *Micropropagation* (pp. 31–44).

https://doi.org/10.1007/978-94-009-2075-0_3

Cervantes-Ramírez, M. C. (2005). *PLANTAS DE IMPORTANCIA ECONÓMICA EN ZONAS ÁRIDAS Y SEMIÁRIDAS DE MÉXICO*. Recuperado de

<http://observatoriogeograficoamericalatina.org.mx/egal10/Procesosambientales/Usoderecursos/08.pdf>

Chase, M. W., Reveal, J. L., & Fay, M. F. (2009). A subfamilial classification for the expanded asparagalean families Amaryllidaceae, Asparagaceae and

Xanthorrhoeaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 161(2), 132–136.

<https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2009.00999.x>

Christenhusz, M. J. M., & Byng, J. W. (2016). The number of known plants species in the world and its annual increase. *Phytotaxa*, 261(3), 201–217.

<https://doi.org/10.11646/phytotaxa.261.3.1>

Coelho, A. M. (2007). Eficiencia colectiva y upgrading en el cluster del tequila.

Análisis Económico, 22(49), 169–194.

Debergh, P. C., & Read, P. E. (1991). Micropropagation. En P. C. Debergh & R. H.

Zimmerman (Eds.), *Micropropagation. Technology and Application* (1a ed., pp. 1–13). <https://doi.org/10.1007/978-94-009-2075-0>

Diario Oficial de la Federación. (2004). *Norma Oficial Mexicana NOM-168-SCFI-2004* (pp. 1–21). pp. 1–21. México: D.O.F.

Diario Oficial de la Federación. (2012). *Norma Oficial Mexicana NOM-006-SCFI-2012* (pp. 1–20). pp. 1–20. México: D.O.F.

Diario Oficial de la Federación. (2016). *Norma Oficial Mexicana NOM-070-SCFI-2016* (pp. 1–17). pp. 1–17. México: D.O.F.

Domínguez-Rosales, M. S., Alpuche-Solís, Á. G., Vasco-Méndez, N. L., & Molphe-Balch, E. P. (2008). Efecto de Citocininas en la Propagación *in vitro* de *Agaves Mexicanos*. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 31(4), 317–322.

Enríquez-Del-Valle, J. R., Alcarra-Vázquez, S. E., Rodríguez-Ortiz, G., & Miguel-

- Luna, M. E. (2016). Fertirriego en vivero a plantas de *Agave potatorum* Zucc micropropagadas-aclimatizadas. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 7(5), 1167–1177.
- Enríquez-del-Valle, J. R., Carrillo-Castañeda, G., & Rodríguez-de-la-O, J. L. (2005). Sales inorgánicas y ácido indolbutírico en el enraizado *in vitro* de brotes de *Agave angustifolia*. En *Revista Fitotecnia Mexicana* (Vol. 28). Correo.
- Espinosa-Barrera, L. A. (2015). Generalidades e importancia de los *Agaves* en México. *Herbario CICY*, 7(10), 161–164. Recuperado de https://www.cicy.mx/Documentos/CICY/Desde_Herbario/2015/2015-10-22-Espinosa_Barrera-Generalidades_e_importancia_de_los_Agaves_en_Mexico.pdf
- FIRA. (2020). Sistema de costos agrícolas Resumen de costos. Cultivo: *Agave* establecimiento. Zona: Jalisco. Recuperado de <https://www.fira.gob.mx/InfEspDtoXML/abrirArchivo.jsp?abreArc=84571>
- Flores-Morales, A., Castañeda-Hidalgo, E., Sánchez-Pérez, F. J., Romero-Aguilar, L., & Ruiz-Luna, J. (2009). Mecanismos de conservación y uso del maguey pulquero *Agave salmiana* en el altiplano Mexicano. *Somas (Sociedad Mexicana de Agricultura Sostenible)*, 6, 1–10.
- Galeón-Alcón, M. R., & Moya, I. (2019). Algunos aspectos de la historia natural del murciélago nectarívoro *Anoura peruana* (Chiroptera, Phyllostomidae) en el valle de La Paz. *Ecología en Bolivia*, 54(1), 5–17.

García-Mendoza, A. J. (2007). Los *Agaves* de México. *Ciencias* 87, 14–23.

Recuperado de

[https://www.revistaciencias.unam.mx/images/stories/Articles/87/02/Los Agaves de Mexico.pdf](https://www.revistaciencias.unam.mx/images/stories/Articles/87/02/Los_Agaves_de_Mexico.pdf)

García-Mendoza, A. J., Jacques-Hernández, C., & Salazar-Bravo, Á. (2007). UNA NUEVA ESPECIE DE AGAVE, SUBGÉNERO LITTAEA (AGAVACEAE) DE TAMAULIPAS, MÉXICO. *Journal of the Botanical Research institute of Texas*, 1(1), 79–84. Recuperado de www.jstor.org/stable/41971388

García, D. (2017). El licor artesanal, una opción más para conmemorar la Independencia. Recuperado el 12 de julio de 2020, de Milenio website: <https://www.milenio.com/estados/el-licor-artesanal-una-opcion-mas-para-conmemorar-la-independencia>

Garibay-Kuri, S. V. (1988). *ENRAIZAMIENTO DE HIJUELOS EN VIVEROS DE “AGAVE AZUL TEQUILERO” Agave tequilana WEBER. UTILIZANDO HORMONAS.*

Gentry, H. S. (1982). *Agaves of Continental North America*. Recuperado de [https://books.google.com.mx/books?id=SCqGyWNpRHwC&lpg=PR11&ots=lod6kM_WZX&dq=gentry 1982 Agaves of continental north america&lr&hl=es&pg=PR4#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.mx/books?id=SCqGyWNpRHwC&lpg=PR11&ots=lod6kM_WZX&dq=gentry+1982+Agaves+of+continental+north+america&lr&hl=es&pg=PR4#v=onepage&q&f=false)

Godoy-Díaz, C. G., & Núñez-Palenius, H. G. (2015). Micropropagación de *Agave durangensis* en un Sistema de Inmersión Temporal (SIT). *Jóvenes en la ciencia*,

pp. 60–65.

González-Durán, B. M., & Núñez-Paleniús, H. G. (2015). Micropropagación de *Agave durangensis* en un Sistema de Inmersión Temporal (SIT). *Jóvenes en la ciencia*, 1(2), 8–13.

Guillot-Ortiz, D., & Van der Meer, P. (2016). *Agave kristenii* A. Vázquez L. M. Cházaro en España. *Revista Científica Internacional Dedicada al Estudio de la Flora Ornamental*, 26, 27–30.

Guillot-Ortiz, D., Van der Meer, P., Laguna-Lumbreras, E., & Rosselló-Picornell, J. A. (2009). *El género Agave L. en la flora alóctona valenciana (Vol. 3)* (J. L. Benito Alonso, Ed.). Revista Bouteloua.

Herrera-Pérez, L., Valtierra-Pacheco, E., Ocampo-Fletes, I., Tornero-Campante, M. A., Hernández-Plascencia, J. A., & Rodríguez-Macías, R. (2018). Esquemas de contratos agrícolas para la producción de *Agave tequilana* Weber en la región de Tequila, Jalisco. *Agricultura, Sociedad y Desarrollo*, 15(4), 619–637.

Huetteman, C. A., & Preece, J. E. (1993). Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 33(1), 105–119.
[https://doi.org/https://doi.org/10.1007/BF01983223](https://doi.org/10.1007/BF01983223)

Hulle, A., Kadole, P., & Katkar, P. (2015). *Agave Americana* leaf fibers. *Fibers*, 3(1), 64–75. <https://doi.org/10.3390/fib3010064>

Hurtado-M., D. V., & Merino-M., M. E. (1987). *Cultivo de Tejidos Vegetales*. México, D.F.: Editorial Trillas.

- Ibañez-Vázquez, G., Álvarez-Herrera, M., & Doria-Mendoza, F. J. (2015). Cadena de suministro: Inulina de *Agave*. *Universidad Autónoma de Tmaulipas*, (834), 1–27. Recuperado de http://acacia.org.mx/busqueda/pdf/CADENA_DE_SUMINSTRO_INULINA_DE_AGAVE.pdf
- Irish, M. (1949). *Agaves, yuccas, and related plants: a gardener's guide* (T. Pr, Ed.). Recuperado de <https://archive.org/details/Agavesyuccasrela0000iris/page/6/mode/2up>
- Jäger, E. J., Ebel, F., Hanelt, P., & Müller, G. K. (2008). *Rothmaler - Exkursionsflora von Deutschland. Krautige Zier- und Nutzpflanzen* (E. J. Jäger, F. Ebel, P. Hanelt, & G. K. Müller, Eds.). <https://doi.org/10.1007/978-3-662-50420-8>
- Kancab-Uc, R. A. (2016). *Diseño de un protocolo para la propagación in vitro de Agave parviflora Torr. mediante organogénesis directa* (Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.). Recuperado de <http://ciad.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1006/753>
- López-Acevedo, L., Merino-Pérez, Y. E., Enríquez-Del-Valle, J. R., Rodríguez-Ortíz, G., & Lagunas-Sánchez, Z. C. (2018). Organogénesis *in vitro* en tejidos de tallo de *Agave marmorata* y *Agave angustifolia*. *Revista Mexicana de Agroecosistemas*, 5(2), 98–105.
- López-León, O. M. (2013). ESTABLECIMIENTO DE UN PROTOCOLO PARA EL INICIO DEL CULTIVO *In vitro* DE *Agave letonae* (HENEQUÉN) A PARTIR DE

YEMAS AXILARES. UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR.

- Lyam, P. T., Musa, M. L., Jamaledine, Z. O., Okere, U. A., & Odofin, W. T. (2012). The Potential of Temporary Immersion Bioreactors (TIBs) in Meeting Crop Production Demand in Nigeria. *Journal of Biology and Life Science*, 3(1), 66–86. <https://doi.org/10.5296/jbls.v3i1.1156>
- Mandujano-Sánchez, M. C. (1985). La clonalidad y sus efectos en la biología de poblaciones. En L. E. Eguiarte, V. Souza, & X. Aguirre (Eds.), *Ecología molecular* (pp. 215–250). Recuperado de <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones2/libros/530/cap7.pdf>
- Martínez-Palacios, A., Ortega-Larrocea, M. P., Chávez, V. M., & Bye, R. (2003). Somatic embryogenesis and organogenesis of *Agave victoriae - reginae* : *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 74, 135–142. <https://doi.org/10.1023/A:1023933123131>
- Mejía-franco, R., & Arzate-Fernández, A. (2011). CAPACIDAD EMBRIOGÉNICA DE CALLOS INDUCIDOS EN EJES EMBRIONARIOS CIGÓTICOS DE *Agave angustifolia* Haw. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 34(2), 101–106.
- Millán-Soto, G., Robert, M. L., Tiznado-Hernández, M. E., Gutiérrez, A., & Esqueda, M. (2019). Organogénesis de rizoma de espárrago (*Asparagus officinalis* L.) por combinación de auxinas y citocininas. *Agrociencia*, (53), 549–561.
- Molphe-Balch, E. P., Esparza-Araiza, M. J., & Pérez-Reyes, M. E. (2012). Conservación *in vitro* de germoplasma de *Agave* spp. Bajo condiciones de

crecimiento retardado. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 35(4), 279–287.

Monja-Mio, K. M., Barredo-Pool, F., Herrera-Herrera, G., Esqueda-Valle, M., & Robert, M. L. (2015). Development of the stomatal complex and leaf surface of *Agave angustifolia* Haw. 'Bacanora' plantlets during the *in vitro* to *ex vitro* transition process. *Scientia Horticulturae*, 189, 32–40.

<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.03.032>

Montejo-Guzmán, A. B., & Núñez-Palenius, H. G. (2016). Utilización de un sistema de inmersión temporal (SIT) para multiplicar plantas ornamentales de *Agave victoriae-reginae* (T. Moore). *Jóvenes en la ciencia*, 2(1), 1429–1433.

Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473–497.

Nikam, T. D., Mulye, K. V, Chambhare, M. R., Nikule, H. A., & Ahire, M. L. (2019). Reduction in hyperhydricity and improvement in *in vitro* propagation of commercial hard fibre and medicinal glycoside yielding *Agave sisalana* Perr . ex Engelm by NaCl and polyethylene glycol. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 138(1), 67–78. <https://doi.org/10.1007/s11240-019-01603-9>

Palma-Cruz, F. de J. (2017). *Agaves* productores de fibras duras en el Estado de Oaxaca, México. *Botanical Sciences*, 102(66), 93.

<https://doi.org/10.17129/botsci.1615>

Pérez-Hernández, Y., Sosa-del-Castillo, M., Fuentes-Alfonso, L., Rubio-Fontanill, Y., Valdivia-Ávila, A. L., & Pérez-Ramos, J. (2016). Caracterización bioquímica e

histológica de plantas aclimatadas *in vitro* de *Agave fourcroydes* Lem.

Biotecnología Vegetal, 16(4), 12. Recuperado de

<https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/529/html>

Puente-Garza, C. A., Gutiérrez-Mora, A., & García-Lara, S. (2015). Micropropagation of *Agave salmiana*: Means to Production of Antioxidant and Bioactive Principles.

Frontiers in Plant Science, 6(November), 1–9.

<https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01026>

Rai, P. S., Bellampalli, R., Dobriyal, R. M., Agarwal, A., Satyamoorthy, K., & Anantha Narayana, D. B. (2012). DNA barcoding of authentic and substitute samples of herb of the family Asparagaceae and Asclepiadaceae based on the ITS2 region.

Journal of Ayurveda and Integrative Medicine, 3(3), 136–140.

Journal of Ayurveda and Integrative Medicine, 3(3), 136–140.

<https://doi.org/10.4103/0975-9476.100177>

Ríos-Ramírez, S. C., Enríquez-del Valle, J. R., Rodríguez-Ortíz, G., & Ruíz-Luna, J.

(2017). Benzylaminopurine and indol-3-acetic acid concentrations in *in vitro*

proliferation of *Agave angustifolia* adventitious shoots. *Ciencia e Investigación*

AGRARIA, 44(3), 285–294. <https://doi.org/10.7764/rcia.v44i3.1810>

Ríos-ramírez, S. C., Valle, J. R. E., & Rodríguez-ortiz, G. (2018). *In vitro* formation of

adventitious shoots on caulinary tissue of physiologically contrasting *Agave*

angustifolia plants. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 30(1), 49–56.

<https://doi.org/10.9755/ejfa.2018.v30.i1.1584>

SAGARPA. (2017). *Planeación Agrícola Nacional 2017-2030, Agave Tequilero y*

Mezcalero Mexicano (p. 15). p. 15. México.

Sanschagrin, S. (2020). Las principales tendencias del tequila a tener en cuenta en 2020. Recuperado el 8 de julio de 2020, de TasteTequila website:
<https://tastetequila.com/es/2020/the-top-tequila-trends-to-watch-for-in-2020/#:~:text=Aunque los precios del Agave,kilo para fin de año.>

Santacruz-Ruvalcaba, F., & Portillo, L. (2009). Thin cell suspension layer as a new methodology for somatic embryogenesis in *Agave tequilana* Weber cultivar azul. *Industrial Crops and Products*, 29(2–3), 609–614.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2008.12.001>

Santoso, B. (2015). Peluang Pengembangan *Agave* Sebagai Sumber Serat Alam. *Perspektif*, 8(2), 84–95. <https://doi.org/10.21082/p.v8n2.2009>.

SIAP. (2020). Resumen por cultivo. Recuperado el 12 de julio de 2020, de Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera website:
http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola_siap_gobmx/ResumenDelegacion.do;jsessionid=9061CEE77BF46EDEA4636B85EAD43EDB

Silos-Espino, H., Lourdes Tovar-Robles, C., González-Cortés, N., Méndez-Gallegos, S. J., Rossel-Kipping, D., Aguascalientes-San Luis Potosí El Llano, C., & México, A. (2011). ESTUDIO INTEGRAL DEL MAGUEY (*Agave salmiana*): PROPAGACION Y VALOR NUTRICIONAL. *Revista Salud Pública y Nutrición*, (5), 75–82.

Smith, G. F., & Figueiredo, E. (2015). Notes on *Agave weberi* J.F.Cels ex J.Poiss.

(Agavaceae), a largegrowing species with invasive tendencies in Southern Africa. *Bradleya*, 33, 161–170. <https://doi.org/10.25223/brad.n33.2015.a22>

Stevens, P. F. (2012). Angiosperm Phylogeny Website. Recuperado de Versión 12, Julio 2012 website: <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>

Yescas-Arreola, E., Campos-Ángeles, G. V., Enríquez-del-Valle, J. R., Velasco-Velasco, V. A., Rodríguez-Ortíz, G., & Ruíz-Luna, J. (2016). Aclimatación de *Agave americana* var. *Oaxacensis* obtenidas *in vitro**. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 7(4), 911–922.