

Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

**Establecimiento de cultivos asépticos, morfogénesis y proliferación en tejidos de
Agave angustifolia Haw.**

TESIS QUE PRESENTA:

Fátima Manuel Zárate

Como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN PRODUCTIVIDAD EN AGROECOSISTEMAS

DIRECTOR:

Dr. José Raymundo Enríquez del Valle

CODIRECTOR:

Dr. Alfonso Vásquez López





EDUCACIÓN
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO®

Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

Establecimiento de cultivos asépticos, morfogénesis y proliferación en tejidos de *Agave angustifolia* Haw.

TESIS QUE PRESENTA:

Fátima Manuel Zárate

Como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS EN PRODUCTIVIDAD EN
AGROECOSISTEMAS**

DIRECTOR:

Dr. José Raymundo Enríquez del Valle

CODIRECTOR:

Dr. Alfonso Vásquez López



CONAHCYT
CONSEJO NACIONAL DE HUMANIDADES
CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS

Ex Hacienda de Nazareno, Xoxocotlán, Oaxaca.
Agosto de 2024.

La presente tesis titulada: **Establecimiento de cultivos asépticos, morfogénesis y proliferación en tejidos de *Agave angustifolia* Haw.**, fue realizada bajo la dirección del consejo particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN PRODUCTIVIDAD EN AGROECOSISTEMAS

DIRECTOR:

DR. JOSÉ RAYMUNDO ENRÍQUEZ DEL VALLE



CODIRECTOR

DR. ALFONSO VÁSQUEZ LÓPEZ



ASESOR:

DR. GERARDO RODRÍGUEZ ORTIZ



ASESOR:

DR. VICENTE ARTURO VELASCO VELASCO



	Nombre de la Información Documentada: Formato Autorización del comité para entrega de tesis.	Código: ITVO-AC-PR-08-02
	Referencia a la Norma ISO 9001:2015 8.2.1, 8.2.2, 8.2.3, 8.5.2	Revisión: 1
		Página 1 de 1

EXPEDIENTE: 20DIT0009G

No. DE OFICIO: DEPI/0586/2024

Nazareno, Xoxocotlán, Oaxaca: 13/Junio/2024

ASUNTO: Autorización del comité para entrega de Tesis.

C. FÁTIMA MANUEL ZÁRATE

ESTUDIANTE DEL PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS

EN PRODUCTIVIDAD EN AGROECOSISTEMAS

P R E S E N T E

Los que suscriben, miembros de su Comité Tutorial, le comunicamos que hemos revisado el contenido de su tesis "Establecimiento de cultivos asépticos, morfogénesis y proliferación en tejidos de *Agave angustifolia* Haw.". Por lo que con base en los lineamientos para la Operación de Estudios de Posgrado en el Tecnológico Nacional de México se le otorga la **AUTORIZACIÓN** para que proceda a la entrega del documento final de la misma en formato digital (PDF); para continuar con su trámite y asignarle la fecha de su examen de grado.

Sin más por el momento nos permitimos reconocer su esfuerzo y felicitarle por el logro de su documento de tesis.

ATENTAMENTE

*Excelencia en Educación Tecnológica®.
Ciencia y Tecnología para el Campo*


JOSÉ RAYMUNDO ENRÍQUEZ DEL VALLE
DIRECTOR DE TESIS


ALFONSO VÁSQUEZ LÓPEZ
CO-DIRECTOR


GERARDO RODRÍGUEZ ORTIZ
ASESOR


VICENTE ARTURO VELASCO VELASCO
ASESOR



YURI VILLEGAS APARICIO
JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN



INSTITUTO TECNOLÓGICO DEL VALLE DE OAXACA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

C.p. Comité Tutorial.
Expediente.
YVA/mglh

	Nombre de la Información Documentada: Formato Autorización de DEPI para entrega de Tesis.	Código: ITVO-AC-PR-08-03
	Referencia a la Norma ISO 9001:2015 8.2.1, 8.2.2, 8.2.3, 8.5.2	Revisión: 1
		Página 1 de 1

EXPEDIENTE: 20DIT0009G
No. DE OFICIO: DEPI/0614/2024
Nazareno, Xoxocotlán, Oaxaca: 18/Junio/2024
ASUNTO: Autorización de entrega de Tesis.

C. FÁTIMA MANUEL ZÁRATE
ESTUDIANTE DEL PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS
EN PRODUCTIVIDAD EN AGROECOSISTEMAS
P R E S E N T E

Con base en los Lineamientos para la Operación de Estudios de Posgrado en el Tecnológico Nacional de México, respecto a la presentación del examen de grado, me es muy grato comunicarle que esta División de Estudios de Posgrado e Investigación a mi cargo, **AUTORIZA** la entrega del documento final de su tesis en formato digital (PDF) titulada: **"Establecimiento de cultivos asépticos, morfogénesis y proliferación en tejidos de *Agave angustifolia* Haw."**.

Cuyo contenido ha sido revisado y aprobado por su Comité Tutorial y cumple en lo general con el formato establecido para este documento, como requisito parcial para obtener el grado de Maestra en Ciencias en Productividad de Agroecosistemas.

Sin más por el momento le felicito cordialmente por el logro de esta meta y le reitero el respaldo institucional de su Alma Mater.



ATENTAMENTE
Excelencia en Educación Tecnológica®.
Ciencia y Tecnología para el Campo

INSTITUTO TECNOLÓGICO DEL VALLE DE OAXACA

**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE
 POSGRADO E INVESTIGACIÓN**


DR. YURI VILLEGAS APARICIO
**JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
 E INVESTIGACIÓN**

C.p. Expediente.
 Alumno interesado.
 YVA/mglh

El presente trabajo se llevó a cabo con el apoyo del Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT), a través del número de becario 1239702, con el tema de investigación: Establecimiento de cultivos asépticos, morfogénesis y proliferación en tejidos de *Agave angustifolia* Haw.

ÍNDICE GENERAL

INDICE DE CUADROS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
RESUMEN	v
SUMMARY	vi
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Hipótesis.....	4
1.2 Objetivos	5
1.2.1 Objetivos específicos	5
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO	6
2.1 Micropropagación.....	6
2.1.1 Etapas de la micropropagación	7
2.2 Uso de antimicrobianos	8
2.3 Uso de los reguladores de crecimiento para estimular la proliferación de tejidos	14
CAPÍTULO III. CONTAMINACIÓN DE CULTIVOS <i>in vitro</i> DE <i>Agave</i> <i>Angustifolia</i> Haw. EN ETAPAS DE MICROPROPAGACIÓN ...	19
3.1 Introducción.....	21

3.2 Materiales y métodos	255
3.2.1 Lugar de trabajo y material vegetal.....	25
3.2.2 Obtención de tejidos de tallo de plantas en vivero para el establecimiento de cultivos asépticos	26
3.2.3 Brotes adventicios en cultivos asépticos <i>in vitro</i> , tratamiento 3	28
3.2.4 Brotes adventicios en cultivos contaminados, tratamiento 4.....	28
3.2.5 Diseño experimental	29
3.3 Resultados y discusión.....	30
3.4 Conclusiones.....	36
3.5 Referencias	37
CAPÍTULO IV. PROLIFERACIÓN DE BROTES DE <i>Agave angustifolia</i> Haw.	
EN RESPUESTA A CITOQUININAS Y GELIFICANTE <i>in vitro</i>	41
4.1 Introducción.....	43
4.2 Materiales y métodos	45
4.2.1 Selección y manipulación del material vegetal	45
4.2.2 Variables evaluadas y análisis estadístico	47
4.3 Resultados y discusión.....	48
4.4 Conclusiones.....	54
4.5 Referencias	55
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES GENERALES	60
CAPÍTULO VI. RECOMENDACIONES.....	61
CAPÍTULO VII. REFERENCIAS	62

INDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Referencias sobre antimicrobianos en las primeras etapas de cultivos <i>in vitro</i>	9
2	Precedentes de la propagación <i>in vitro</i> de especies de Agave.....	14
3	Resumen de cuatro Análisis de Varianza de porcentajes de cultivos asépticos, contaminados, porcentaje de cultivos viables y número de brotes formados en cada explanto	33
4	Cultivos <i>in vitro</i> de tejidos de tallo contaminados o asépticos, y formación de brotes de <i>Agave angustifolia</i>	33
5	Análisis de varianza de la formación de brotes de <i>A. angustifolia</i> cultivados en <i>in vitro</i> micropropagadas, establecidas en etapa II	52
6	Características de las vitroplantas de <i>Agave agustifolia</i> , transcurridos 60 días de la etapa de proliferación de brotes..	53

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Micropropagación de <i>A. angustifolia</i> . a) planta en vivero en la etapa 0; b) Tallo de 7 cm altura y 8 cm diámetro, que se llevó al laboratorio; c) tejidos de tallo establecidos en medio de cultivo y que durante de 30 días de incubación <i>in vitro</i> se observó que aumentó en tamaño, su coloración tornó a verde, como muestra de viabilidad, y a los 50 días se observaron pequeños brotes. Etapa I; d) Racimo de brotes adventicios formados en tejidos de tallo en que ocurrió la organogénesis en la etapa I	32
2	Características de cultivos de <i>Agave angustifolia</i> , que estuvieron en medio de cultivo con diferente citocinina: A) Desarrollo de varios brotes y sin raíces, en medios de cultivo BAP; B) Un brote que no formó nuevos brotes, pero desarrolló varias raíces en medio de cultivo 2i-P	54
3	Características del medio de cultivo del tipo de gelificante con tipo de citocinina A) desarrollo de brotes en agar-agar, B) brotes con desarrollo de raíces en pytagel de <i>Agave angustifolia</i>	54

RESUMEN

Varias especies del género se usan como materia prima para elaborar la bebida mezcal, y el *Agave angustifolia* es por sus características, como el corto tiempo de madurez de 7 a 9 años, la principal especie aprovechada. Para propagar esta especie se propone usar la técnica de cultivo de tejidos vegetales. Se evaluó el establecimiento de cultivos asépticos de tejidos caulinares obtenidos de plantas de dos edades diferentes, 5 y 2 años, las que previamente en vivero se sometieron a la aplicación de antimicrobianos (fungicidas y bactericidas) en etapa 0, I, II. Los tejidos caulinares extraídos de las plantas se sometieron a desinfección superficial y establecieron en medios de cultivo con sales minerales MS al 100%. Transcurridos 30 y 50 días de incubación en la etapa I, del 4 a 9 % de tejidos *in vitro* resultaron asépticos y con formación de brotes adventicios en etapa I. La edad del tejido influyó en la morfogénesis, Los brotes adventicios de la etapa I que se transfirieron a la etapa II de multiplicación de propágulos, el 90 % se mantuvieron asépticos. Los brotes adventicios obtenidos en la etapa I, pero contaminados (10%) al transferirlos a medio de cultivo con antimicrobianos de la etapa II, el 52% fue posible excluir de bacterias, permitiendo cultivos asépticos y con proliferación. En un segundo experimento se evaluó la multiplicación de propágulos a partir de tallos que se establecieron en medios de cultivo que variaron en dos citocininas (N6-bencilaminopurina y N6-(2-isopentenyl) adenine, 2i-P), dos concentraciones (2 y 4 mg L⁻¹) y dos tipos de gelificante (agar-agar y pytagel). Al transcurrir 60 días de incubación, en los explantos se formaron en promedio de 1.1 a 3.3 brotes nuevos, de 9 a 20 hojas, 13.8 a 23.4 cm² de área foliar. Los tallos establecidos en medio de cultivo con 2 mg L⁻¹BAP y agar-agar formaron cantidad mayor de nuevos brotes y ninguna raíz. Los tallos establecidos en medio de cultivo con la citocinina N6-(2-isopentenyl) adenine, 2i-P) formaron menor cantidad de brotes nuevos y de 1.5 a 6.4 raíces adventicias.

SUMMARY

Several species of the genus are used as raw materials to make the mezcal drink, and the *Agave angustifolia* is the main species used due to its characteristics, such as the short maturity time of 7 to 9 years. To propagate this species, it is proposed to use the plant tissue culture technique. The establishment of aseptic cultures of root tissues obtained from plants of two different ages, 5 and 2 years, which were previously subjected to the application of antimicrobials (fungicides and bactericides) in stage 0, I, II, was evaluated. The root tissues extracted from the plants were subjected to surface disinfection and established in culture media with 100% MS mineral salts. After 30 and 50 days of incubation in stage I, 4 to 9% of in vitro tissues were aseptic and with the formation of adventitious buds in stage I. The age of the tissue influenced morphogenesis. The adventitious buds of stage I that were transferred to stage II of propagule multiplication, 90% remained aseptic. The adventitious shoots obtained in stage I, but contaminated (10%) when transferred to culture medium with antimicrobials of stage II, 52% were possible to exclude bacteria, allowing aseptic cultures and proliferation. In a second experiment, the multiplication of propagules was evaluated from stems that were established in culture media that varied in two cytokinins (N6-benzylaminopurine and N6-(2-isopentenyl) adenine, 2i-P), two concentrations (2 and 4 mg L⁻¹) and two types of gelling agent (agar-agar and pytagel). After 60 days of incubation, an average of 1.1 to 3.3 new shoots, 9 to 20 leaves, and 13.8 to 23.4 cm² of leaf area were formed in the explants. The stems established in culture medium with 2 mg L⁻¹BAP and agar-agar formed a greater number of new shoots and no roots. Stems established in culture medium with the cytokinin N6-(2-isopentenyl) adenine, 2i-P) formed fewer new shoots and 1.5 to 6.4 adventitious roots.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

Los Agaves son endémicos de América, siendo su distribución desde el sur de los Estados Unidos hasta Colombia y Venezuela (Castañeda-Nava et al., 2019). En conjunto, brinda alrededor de 100 cualidades de uso, siendo 70, las más demandadas, proporcionando cierto tipo de beneficio a las personas (Esparza-Ibarra et al., 2015). En México, han sido el sustento de representativas actividades socio-económicas, generadoras de riqueza para la industria desde niveles artesanales hasta la producción más tecnificada (López-Romero et al., 2018) destacando la elaboración de bebidas destiladas como el tequila y mezcal.

En el año 2020, el Consejo Mexicano Regulador de la Calidad del Mezcal (COMERCAM), reporta que el 85.8 % de la industria nacional de mezcal se obtiene de *Agave angustifolia*, especie seleccionada por los productores mezcaleros, debido al precario tiempo que va desde los siete a nueve años, en que llega a la madurez y porque produce piñas de gran tamaño desde los 67 cm de alto, 80 kg de peso promedio, 21 % de azúcares en base a peso fresco, (Cruz-

García et al., 2013) por lo que se propaga y cultiva con intenciones comerciales (Espinosa et al., 2002). Esta especie de Agave es posible propagarla ya sea mediante germinación de semillas, sexual, o asexualmente mediante propágulos vegetativos, hijuelos de rizoma, bulbilos de inflorescencia, y micropropagación (Alfonso-León, 2014; Enríquez-del Valle, 2008).

En el año 2000, el mercado creciente del tequila originó un incremento en su producción y amplió las áreas de remoción de maguey para alcanzar su demanda, en la industria empleando la materia prima de otras regiones mecaleras, principalmente en los estados de Oaxaca y Guerrero provocando modificaciones a las técnicas de cultivo, se aumentó el consumo de agroquímicos, se excluyeron las fases de descanso de los suelos y formas de reproducción (Bautista & Smit, 2012)

Una alternativa prometedora para apoyar a solucionar el abastecimiento de plantas de calidad para establecer en campo; es la aplicación de las tecnologías de propagación y mejoramiento procedentes de la biotecnología vegetal (Flores-Morales et al., 2021). Esto amplía las probabilidades de disposición de las especies de Agave, al garantizar un suministro constante de plantas sin depender de la disponibilidad de los otros métodos como hijuelos o semillas (Domínguez et al., 2008a); algunos antecedentes de micropropagación de *Agave wocomahi* (Reyes-Silva et al., 2022), *A. fourcroydes* (Monja-Mio y Robert, 2013), *A. tequilana* (Delgado-Aceves et al., 2021) que describen los procedimientos de propagación *in vitro*. Los beneficios que tiene esta tecnología, con relación a la

agricultura industrial son: asegurar un abastecimiento continuo de plantas con calidad y rendimiento equilibrado; producción en corto tiempo; no se ve afectada por cambios estacionales y geográficas, ni por factores ambientales. Cuando se tienen cultivos de tejidos vegetales *in vitro* es posible realizar investigación para originar nuevos agregados que no se localizan normalmente en la planta madre (Urías-García et al., 2023).

La técnica micropropagación de tejidos vegetales, inicia con el establecimiento en medio de cultivo de los explantes, tejidos o células, que debe ser en ambientes asépticas en medios de cultivo de composición definida de nutrimentos y reguladores de crecimiento. Lo que aprueba la producción de plantas masivas corpulentas, fuertes, rejuvenecidas y contribuiría en compensar la erosión de poblaciones (Sánchez et al., 2020). En las etapas de micropropagación vegetal, la infección por hongos y bacterias es un problema perversion frecuente pues restringe el éxito, haciendo necesarias las prácticas de desinfección (Cruz et al., 2007), la primera etapa es considerada la mayor limitante del desarrollo de un protocolo de micropropagación (Esquivel y Bonilla 2016). Por consiguiente, es importante el estudio de métodos que conduzcan a la eliminación de los contaminantes microbianos presentes en el cultivo de tejidos vegetales (López, 2012).

Una vez logrado que en condiciones de laboratorio se establezcan cultivos asépticos en un medio artificial, se pasa a la siguiente etapa para la multiplicación de propágulos (Bello-Bello y Spinoso-Castillo, 2023) basada en principios como

la totipotencia, y la regulación de eventos de división celular y morfogénesis, mediante el control de la composición del medio de cultivo que incluye reguladores del crecimiento; así como condiciones físicas de incubación (Oblitas, 2019). Ya se tienen aplicaciones que manifiestan que cada especie de Agave demanda concentraciones y combinaciones particulares de los reguladores de crecimiento, esto para lograr una eficientemente regeneración de vitroplantas (Ramírez-Malagón et al., 2008). Aun así, es posible investigar sobre modificaciones para aumentar la eficiencia en la respuesta. Por lo que el objetivo de este trabajo fue evaluar el establecimiento de cultivos asépticos *in vitro* de explantos de tejido de tallo de *A. angustifolia* Haw, e inducir la respuesta de morfogénesis y proliferación de propágulos.

1.1 Hipótesis

- En las primeras etapas de micropropagación de cultivos vegetales, el uso de antimicrobianos, reduce los porcentajes de cultivos contaminados, sin afectar la respuesta de morfogénesis y proliferación.
- En la etapa de multiplicación de propágulos, el tipo y dosis de citocininas tiene efecto en la magnitud de proliferación de brotes adventicios.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivos específicos

- Evaluar diferentes sustancias antimicrobianas para lograr el establecimiento de cultivos de tejidos caulinares de *A. angustifolia* Haw asépticos y respuesta de morfogénesis en la etapa I; y cantidades de brotes asépticos durante la etapa II.
- Evaluar las citocininas (2iP y BAP) en concentraciones de 2 mg L⁻¹ y 4 mg L⁻¹, así como tipo de gelificante (agar-agar o Phytigel) en el medio de cultivo, en su efecto sobre la proliferación de brotes de *A. angustifolia* Haw.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 Micropropagación

Los cultivos *in vitro* han otorgado la renovación de al redor de 1,000 especies vegetales diversas (Alvarez et al., 2020). Partiendo de ejemplares seleccionados, importantes para la productividad agrícola, por las cualidades genéticas, fisiológicas y sanitarias, estas plantas obtenidas intervienen en los beneficios y compensación de las cosechas (Rueda, 2013; Arzate et al., 2016).

Las variantes de manipulación que interactúan en la efectividad de reproducción son los ejemplares selectos, el periodo de vida del material vegetal, el estado fisiológico de las plantas madre, el ambiente de propagación que comprende, el uso de reguladores de crecimiento (RC), el sustrato o soporte físico de la planta, el nivel de temperatura, la humedad relativa, el abastecimiento nutricional, la vigilancia de plagas y enfermedades (Blanco-Valdés, 2019).

2.1.1 Etapas de la micropropagación

Etapa 0. Período inicial que abarca la elección de la planta orteto que posee características sobresalientes. De esta planta se toman partes vegetativas para propagarla en vivero y las plantas rameto que se obtienen se someten a pre tratamiento para optimizar su estado fisiológico antes de tomar de estas plantas partes vegetativas.

Etapa I. Estos son tejidos somáticos que se obtienen de plantas en vivero se llevan a laboratorio en donde se someten a tratamiento de desinfección superficial, para eliminar microorganismos, hongos y bacterias y entonces se establecen en medio de cultivo aséptico. En esta etapa se espera que los cultivos de tejidos vegetales sean asépticos, y que sean viables en que se logre respuesta de división celular para formar ya sea callo, o morfogénesis en forma de brotes axilares, o brotes adventicios, o embriones somáticos.

Etapa II. Etapa de multiplicación de propágulos. El envase de cultivo vegetal *in vitro* en el que ciertamente ha obtenido alguna respuesta de morfogénesis y ocurrió la formación e incremento en la cantidad de propágulos, éstos se separan en grupos pequeños de propágulos, para distribuirlos a varios recipientes con medio de cultivo nuevo para que, en el transcurso de varias semanas, dependiendo de la especie, continúen incrementando los propágulos. Este procedimiento de separar los propágulos y distribuirlos a recipientes con medio nuevo se repite periódicamente para lograr multiplicar

gran proporción de plantas. Es común que las composiciones del medio sean apropiadas para estimular la proliferación crecidamente de brotes, pero se inhibe que formen raíces.

Etapa III. Correspondiente al enraizamiento o etapa. Que cuando ya se tiene gran cantidad de propágulos y siguen incrementando en cantidad en la etapa II, algunos de estos se transfieran a medio de cultivo nuevo que difiere en composición para inducir que en los brotes se formen raíces.

Etapa IV. Transferencia de los recipientes donde se encuentran las plantas micropropagadas a la etapa de pre-aclimatación en un invernadero con condiciones controladas de temperatura y humedad. Las plantas (brotes enraizados) se extraen del cultivo *in vitro* y establecen en recipientes con sustratos adecuados y asépticos, finalmente se colocan en un acondicionamiento progresivo de adaptación.

2.2 Uso de antimicrobianos

Debido a la demanda de plantas en diferentes especies de Agave se ha propuesto la aplicación de herramientas biotecnológicas, como método alternativo o complementario a los métodos convencionales. Sin embargo, para aplicar las técnicas de cultivo de tejidos se requiere: 1) eliminar microorganismos de los tejidos vegetales mediante procedimientos de desinfección superficial; 2) mantener condiciones de limpieza en laboratorio; en el área donde se manipulan

y establecen *in vitro* las células y tejidos vegetales se deben excluir microorganismos; 3) los medios de cultivo se deben esterilizar; 4) las herramientas que se usan para cortar y establecer *in vitro* los materiales vegetales se esterilizan.

Para el mantenimiento de cultivos *in vitro* asépticos se indican obstáculos entre las que se encuentran la manifestación de contaminantes endofíticos, relacionados a sesos del individuo durante cambio de los cultivos *in vitro* (Kulus, 2014). No obstante, el uso de antimicrobianos (Cuadro 1) se usa con la finalidad de aminorarlo, aunque su manejo se ve limitado debido a sus ciertos efectos fitotóxicos sobre los materiales vegetales (Sabale et al., 2015).

Cuadro 1. Referencias sobre antimicrobianos en las primeras etapas de cultivos *in vitro*

Especie	Avance reportado	Evaluación de tratamientos de desinfección de microorganismos	Autores de
Bambú <i>Guadua</i>	Reproducción <i>in vitro</i> de yemas axilares	Se evaluó el (HgCl ₂) y el (NaClO): en distintos tiempos de aplicación. Con un medio suplementado de sales y vitaminas (MS): 0.0025 ppm de BAP, 0.01 ppm de myoinositol, 30 ppm de sacarosa y gelificado con 2.5 ppm gelrite.	Marulanda et al., 2005
<i>Solanum tuberosum</i> L cv. Desirée	Control de contaminante en la multiplicación	Concentración de un bactericida: 0.00125 ppm de Sulfato de Gentamicina.	Alvarado-Capó et al., 2006

<i>Dioscorea alata</i> L. clon caraqueño	Células expresen potencial intrínseco inducido	Concentraciones de su intervalo de inmersión (NaClO) para el establecimiento <i>in vitro</i> de explantes primarios. La desinfección consistió en diferentes concentraciones 1.5; 2 y 2,5% y tiempos de inmersión de 10; 20 y 30 min.	con Borges-García et al., 2009
<i>Ugni molinae</i>	Porcentaje de explantes que forman callos indirecta a partir de explantes	Desinfección de las semillas en lugar estéril con una solución de los fungicidas Mancozeb® y de Benomil®, más 20 gotas Tween durante 20 min. Adición de (NaClO) al 2 % durante 10 min y etanol 70 % por 5 seg, y 3 enjuagues contiguos de agua destilada estéril.	Rodríguez et al., 2014
<i>Solanum tuberosum</i> L.	Uso de desinfectantes <i>in vitro</i> para ápices de papa	Desinfección con agua y detergente, seguido de 3 enjuagues con agua destilada durante 5 min, lavados durante 15 min de agua destilada más seis gotas de Tween por 20 min, se enjuagaron, por consiguiente, se zambulleron en etanol al 70 % durante 5 min y enjuagando con abundante agua destilada estéril. En ambientes estériles, realizando cortes de ápices y se	Pérez-Álvarez et al., 2016

establecieron en (NaClO) al 2 % en el transcurso de 15 min, consecutivamente se limpiaron con agua destilada estéril 3 veces y se secaron 15 min antes de ubicar de manera individual en tubos de ensayo.

Guadua weberbaueri

Etapa 0. Aplicación a nivel foliar de fungicidas: Benlate® a 2 ppm y Phyton® 2 ppm, durante cuatro semanas previas. Etapa I. Desinfección superficial con detergente a una solución de 20 ppm, limpieza con ayuda de una escobilla dental, se sumergieron los explantes en un tratamiento 1 de Benlate®, a una concentración de 1 ppm, por una hora, tratamiento 2 se sumergieron los explantos de nodales en un tratamiento 2 de Phyton®, a 7 ppm, durante una hora.

Casanova-Alvino, Domínguez-Torrejón, Tapia-Figueroa., 2019

Banano *Musa spp.* Establecimiento *in vitro* de meristema apical

Concentraciones de (NaClO) para la esterilización fueron de 5% y 10%, con un tiempo de inmersión de 5 minuto.

Mongelós-Franco et al., 2020

A. salmina var. Púa Larga Reproducción magüeyes de 2 y 5 años de edad, vía

Proceso de desinfestación y rompimiento de latencia de yemas axilares, se realizó con Benomil®, en una

Flores-Morales, Chávez-Avila,

organogénesis directa concentración de 4 ppm, se asperjaron las plantas periódicamente en un tiempo de 3 semanas, a su vez se empleó BAP 3 ppm cada tercer día. La desinfección de los explantes; esqueje, yemas axilares y partes de hojas inmaduras centrales se les realizó un lavado con jabón (Dial®). solución de etanol al 96% por 30 seg, se enjuagó y se adicionó Agrimicin® 0.004 ppm, 30 min en agitación continua. Se introdujeron en solución de NaClO al 30% por 30 min. Se realizaron 3 enjuagues con los antioxidantes; ácido ascórbico (0.15 ppm) y ácido cítrico (0.15 ppm). Se introdujeron los explantes en solución de (NaClO) en una concentración de 10% por 10 min y realizando 3 enjuagues con los antioxidantes.

Jiménez-Estrada., 2021

A. salmiana y *A. marmorata* Zona meristemática de plántulas ex vitro

El antimicrobiano Agry-gent® Plus 800 a una concentración de 1 ppm más 1 ppm de Cercobin®M de ingrediente

Arzate-Fernández et al., 2020

		activo Tiofanato metílico durante 10 min.	
yuca (<i>Manihot esculenta Crantz</i>)	Explantes segmentos uninodales de tallos	La desinfestación con Tween (20%) agitando el material vegetal y eliminando residuos, se realizaron 3 enjuagues posteriormente. Los explantos se colocaron en alcohol etílico al 70 % en movimiento constante en el transcurso de 1 min, enjuagando, todo en ambientes estériles en la cámara de flujo laminar. Método 1 (M1), método 2 (M2) y método 3 (M3) respectivamente, los cuales fueron modificados, utilizando únicamente la concentración y los lapsos de inmersión de los explantes en (NaClO). Para el M1 se sumergieron los explantes en NaClO al 5.25 % por un periodo de 10 min, para el M2 se utilizó NaClO al 2.5 % por un lapso de 10 min, mientras que para el M3 se usó NaClO al 2 % durante 15 min. Realizaron 3 enjuagues con agua destilada estéril por el lapso de 1 min cada uno.	Aguilera- Arango et al., 2021

2.3 Uso de los reguladores de crecimiento para estimular la proliferación de tejidos

Actualmente existen una cadena para suministros que optimizan la mejora y desarrollo de los cultivos. Entre estos frecuentemente lo más usado, por los cultivadores, se encuentran los reguladores de crecimiento (RC) que son definidos como: agregados naturales y sintetizados que actúan en los procesos metabólicos (Gollagi et al., 2019).

Cuadro 2. Precedentes de la propagación *in vitro* de especies de Agave.

Agave	Trabajos reportados	Medio de cultivo / Reguladores del crecimiento	Referencia
<i>Agave sp.</i>	Reproducción de la especie a través de organogénesis indirecta.	Medio de cultivo Linsmaier y Skoog con 0.001 ppm de 2,4-D y 0.001 ppm de cinetina para tejidos callosos. Medio de cultivo Linsmaier y Skoog con 0.0002 ppm de 2,4-D y 0.001 ppm de cinetina para la generación de brotes a partir del callo.	Groenewald, Wessels, Koeleman., 1977
A. <i>angustifolia</i>	Generación de brotes vía directa de organogénesis a partir de fracciones de tallo.	El medio Murashige-Skoog con 0.001 ppm de BAP.	Enríquez del Valle et al., 2005

<i>A. tequilana</i>	Regeneración por embriogénesis somática.	Se uso medio de cultivo de MS: las combinaciones de 2,4-D/BA μ M para la formación de callo. MS más distintas concentraciones de BA, cinetina, 2iP y TDZ para la diferenciación de embriones somáticos.	Portillo y Santacruz-Ruvalcaba., 2007
<i>A. cupreata</i> , <i>A. difformis</i> , <i>A. karwinskii</i> , <i>A. obscura</i> y <i>A. potatorum</i> .	Organogénesis directa	Medio de cultivo (MS) adicionado con 30 ppm de sacarosa, 8 ppm de agar y varios tratamientos con citocininas [6-bencilaminopurina (BA), 6- γ , γ -dimetilalilaminopurina (2iP), cinetina (Cin), tidiazurón (TDZ) y meta-topolina o N6 -(metahidroxibencil)adenina (MT)]	Domínguez et al., 2008
<i>A. fourcroydes</i> Lem		La combinación de 6-bencilaminopurina (BAP) (0.00075 ppm) e indolbutírico ácido (IBA) (0.001 ppm).	Garriga-Caraballo et al., 2010
<i>A. americana</i> var. <i>oaxacensis</i>	Organogénesis indirecta	MS con diversas concentraciones de benciladenina (BA) (0, 2, 4, 6, 8 y 10 mg L ⁻¹), tipo de carbohidrato (sacarosa o jarabe fructosado) y concentración de carbohidrato (20, 30, 40 ppm)	Miguel et al. 2014

<i>A. salmiana</i>	micropropagaron a partir de brotes axilares	Medio Murashige y Skoog suplementado con vitaminas L2, 0.00004 ppm de ácido 2,4-diclorofenoxiacético y 0.01 ppm. Azúcares solubles totales de la fracción acuosa y fenólicos totales.	Puente-Garza et al., 2015
<i>A. victoriae-reginae</i>	Primordios de brotes generados de novo	Murashige & Skoog (MS) en 1962 al 50%, suplementado con diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento	Montejo-Guzmán y Núñez-Pañenius., 2016
<i>A. angustifolia</i> HAW.	Embriones somáticos encapsulados	Concentraciones de 3, 4 y 5 % de la matriz de alginato de sodio, en tiempo de inmersión 15 y 30 min en CaCl ₂ . Las sales del medio MS fueron de 50 y 100 % como endospermo sintético, enriquecido con 0.0, 4.4 y 8.8 µmol de BAP	Arzate-Fernández et al., 2016
<i>A. angustifolia</i>	Efecto en la respuesta organogenética	Murashige y Skoog que tenía diferentes concentraciones de BAP (0.0005, 0.001, 0.002 y 0.004 pmm) e IAA (0.0001, 0.003 y 0.001 ppm).	Ríos-Ramírez et al., 2017
<i>A. marmorata</i> Roehl	organogénesis directa	concentraciones de BAP fueron 0.01, 0.003 y 0.001 ppm con respecto a AIA 0.003, 0.001, 0.0003 y 0.000 ppm	Aguilar & Rodríguez., 2018

<i>A. salmiana</i> y <i>A. marmorata</i>	Regeneración de plantas a través de organogénesis directa e indirecta.	MS al 100 y 25(%) y concentración 10 mg L ⁻¹ BAP de la citocinina BAP y de la auxina 2,4-D, para la morfogénesis <i>in vitro</i> de las dos especies	Arzate-Fernández et al., 2020
<i>A. marmorata</i> Roelz	Regeneración de plantas en organogénesis y embriogénesis somática	Uso de Sistemas de Inmersión Temporal (SIT). Sales MS al 25%, suplementado con vitaminas L2 (Phillips y Collins, 1979), 60 ppm de sacarosa, 0.005 ppm de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), 0.003 ppm de BA y 8 ppm de agar.	Martínez-Martínez et al., 2021
<i>A. guiengola</i>	Brotos axilares mejorados a partir de segmentos de tallo	Medio semisólido y Biorreactores de inmersión temporal, las condiciones de cultivo fueron MS complementado con citoquininas BAP y con 2i-P.	Chávez-Ortiz et al., 2021
<i>A. salmiana</i> var. Púa Larga	Vía organogénesis directa e Indirecta.	MS, adicionado con reguladores de crecimiento K y 2,4-D (0.1, 0.5, 1.0 y 2.0 g L ⁻¹), de ANA, BAP: K (1:1, 1:2 y 2: 1 g L ⁻¹) y 2-iP (0.5, 1.0 y 1.5 mg L ⁻¹)	Flores-Morales et al., 2021
<i>A. tequilana</i> Weber	Producción de brotes laterales de tallos	Medio sólido como líquido MS, se evaluaron los efectos de la 6-benzilaminopurina 0.0, 4.4 y	Vázquez-Martínez et al., 2022

	sagitales segmentados	13.2 μ M y la cinetina 0.0, 9.4, 18.8 y 37.6 μ M.	
A. <i>maximiliana</i> Baker	Proliferación de sus yemas axilares	Tres elementos: 1) la auxina (2,4-D) en cuatro dosis: 0, 0.00001, 0.00002 y 0.0003 ppm; 2) la citocinina (BAP) en dosis de 0, 0.004, 0.008 y 0.012 ppm, y 3) dos genotipos G1 y G6.	Santacruz- Ruvalcaba et al., 2022
<i>Agave angustifolia</i> HAW.	Organogénesis	Sales basales de Murashige y Skoog, (1962) al 100 %, 0.001 ppm de tiamina, 0.1 ppm de myo-inositol, 25 ppm de sacarosa y 0.001 ppm de ácido indol-3-acético (AIA). El pH se ajustó a 5.8 antes de agregar 5.7 ppm de agar	Enríquez-del Valle et al., 2023

CAPITULO III

CONTAMINACIÓN DE CULTIVOS *in vitro* DE *Agave angustifolia* Haw. EN ETAPAS DE MICROPROPAGACIÓN

[CONTAMINATION OF *in vitro* CULTURES OF *Agave angustifolia* Haw. IN MICROPROPAGATION STAGES]

Fátima Manuel Zárate¹ (<https://orcid.org/0009-0009-8192-1015>), José Raymundo Enríquez-del Valle¹ (<https://orcid.org/0000-0002-7700-3790>), Alfonso Vásquez López² (<https://orcid.org/0000-0001-5628-5525>), Gerardo Rodríguez-Ortiz¹ (<https://orcid.org/0000-0003-0963-8046>), Vicente Arturo Velasco Velasco¹ (<https://orcid.org/0000-0002-3575-0181>)

¹Tecnológico Nacional de México. Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca. C.P. 71230. Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca, México.

²Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Oaxaca. C.P. 71230. Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca, México.

*Autor de correspondencia: jenriquezdelvalle2@yahoo.com

RESUMEN

La contaminación es un problema en cultivo de tejidos vegetales. Diversas sustancias antimicrobianas se usan para solucionar dicha situación. Principalmente durante el establecimiento de cultivos *in vitro* ocurren afectaciones cuantiosas, por lo que el objetivo de este trabajo fue, evaluar las cantidades de tejidos de tallo de *Agave angustifolia* Haw que se logren establecer *in vitro* asépticos y con respuesta de morfogénesis, durante: 1) el establecimiento *in vitro* de tejidos de tallo, en etapa I; 2) aplicación de

antibióticos a tejidos de tallo en que ocurrió la formación de brotes, en etapa I, pero estaban contaminados por bacterias; 3) brotes adventicios que en la etapa I se lograron asépticos y se transfirieron a la etapa II de multiplicación de propágulos. El experimento se estableció de acuerdo a un diseño completamente aleatorio simple. Se evaluaron los porcentajes de cultivos asépticos versus contaminados, tejidos viables y tejidos con respuesta de organogénesis. Las evidencias muestran que, al usar tejidos de tallo de agave, el 3.68 a 8.73% de cultivos se lograron asépticos durante la etapa I; mientras que de cultivos de brotes contaminados y tratados con antibióticos fue posible que 52.50% de éstos se lograsen asépticos. En los cultivos que en la etapa I se lograron asépticos y ocurrió la formación de brotes, al realizar su transferencia a medio de cultivo de la etapa II, el 89.88% mantuvo su condición de asepsia, el 100% fueron viables y en todos ocurrió la formación de nuevos brotes.

Palabras clave: cultivos asépticos, establecimiento de cultivos asépticos, patógenos, microorganismos.

ABSTRACT

Contamination is a problem in plant tissue culture. Various antimicrobial substances are used to solve this situation. Mainly during the establishment of *in vitro* cultures, numerous effects occur, so the objective of this work was to evaluate the quantities of *Agave angustifolia* Haw stem tissues that were established aseptic *in vitro* and with a morphogenesis response, during: 1) the *in vitro* establishment of stem tissues, in stage 1; 2) application of antibiotics to stem tissues in which shoot formation occurred, in stage 1, but these were contaminated by bacteria; 3) adventitious shoots that were aseptic in stage I and transferred to stage II of propagule multiplication. The experiment was set up according to a simple completely randomized design. The percentages of aseptic versus contaminated cultures, percentage of viable tissues and organogenesis response were recorded. Evidence shows that, when agave stem tissues were used, 3.68 to 8.73% of *in vitro* cultures were aseptic during stage I; while from contaminated shoots cultures treated with antibiotics, 52.50% of these were achieved aseptic. In the cultures that were aseptic in stage I and shoot formation occurred, and these were transferred to stage II culture medium, 89.88% maintained their aseptic condition, 100% were viable and all the formation of new shoots occurred on all of these.

Key words: aseptic cultures, establishment of aseptic cultures, pathogens, microorganisms.

3.1 Introducción

La especie Agave, se sitúa en la familia *Agavaceae*, e incluye diversas especies de plantas adaptadas a condiciones de aridez (Domínguez-Rosales 2008). Estas especies que de acuerdo al grado de domesticación se tienen tres tipos: silvestres, semicultivadas y cultivadas (Bautista & Smit 2012), las que son de importancia económica y cultural, y se emplean para elaborar diversos productos (Olvera-Vargas et al. 2022). Según el Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP 2019), los cultivos de agaves se reportan en 363 municipios de quince entidades federativas, con un área sembrada de 120,000 ha, de las que el 14,6 % corresponde a especies que se destinan a la producción de mezcal. En Oaxaca, Guanajuato y Guerrero, se encuentran el 55.4, 14.9 y 8.7% de superficie cultivada con agaves mezcaleros, respectivamente. En la primera entidad destaca el *A. angustifolia*, comúnmente denominado espadín (SIAP 2019) y debido a la importancia de esta especie es conveniente realizar estudios para su mayor conocimiento.

En el estado de Oaxaca, México, el *Agave angustifolia* Haw. ocupa 80% de las 10 mil ha cultivadas con agaves (Jarquín-Rosales et al. 2022) y es la más utilizada como materia prima para la elaboración de mezcal. La planta tiene características morfológicas de succulencia, que forma una gran roseta de 1.5 a 2 m de altura y 1.5 a 2 m de diámetro, de hojas rígidas, con espinas en los márgenes y extremo distal de cada hoja; despliega un escapo floral que logra una altura de hasta 6 m. El tallo de la roseta, designada piña, que en promedio su

peso fresco es de 80 kg, contiene en base a su peso fresco, 21.16% de azúcares reductores totales (González-González et al. 2007; Cruz et al. 2013).

El uso de plantas de calidad sanitaria, fisiológica, para establecer plantaciones, es un factor que se complementa con las prácticas de cultivo para acrecentar la productividad y disminuir los costos. El *A. angustifolia* es una especie monocárpica y su propagación sexual se practica poco, debido al periodo largo, siete a nueve años, para que la planta llegue a la etapa reproductiva sexual y produzca semillas, por esta razón la reproducción asexual por vástagos de rizoma es la más usada, no obstante, posee la desventaja de que éstos transporten de inicio los patógenos que pudieran estar afectando a la planta madre (Domínguez-Rosales 2008) transmitiéndose de generación en generación.

Las técnicas biotecnológicas como el cultivo *in vitro* de células, órganos vegetales, aporta una alternativa de reproducción asexual que resulta importante para la investigación y aplicación en la agricultura (Fortes y Pais 2000; Zeng et al. 2007). La micropropagación de agaves mediante la morfogénesis de meristemas y desarrollo de brotes con la posterior formación de raíces (Robert et al. 1992; Esqueda y Vargas 2007; Millán-Soto et al. 2016) permite la producción masiva de plantas vigorosas, sanas, rejuvenecidas, que contribuiría en compensar la disminución de poblaciones.

El esquema de propagación *in vitro* consta de cinco etapas principales: 0) selección de una planta sobresaliente, que se establece en vivero para su preparación en sanidad y fisiológica; 1) el establecimiento del cultivo aséptico, 2) proliferación de propágulos, 3) enraizamiento de brotes en preparación para trasplante a suelo y, 4) la planta micropropagada se trasplanta a sustrato para su aclimatación en invernadero. Se ha reportado la propagación *in vitro* de diversas especies de Agave: *A. fourcroydes* (Abreu et al. 2016), *A. tequilana* (Morales et al. 2015), *A. angustifolia* (Ríos-Ramírez et al. 2018) por la vía organogénesis de novo y adventicia, o bien mediante la activación de meristemas, técnica eficiente para la propagación masiva de plantas (Miguel-Luna et al. 2013). Estas técnicas deben realizarse en instalaciones especiales con estrictas condiciones de higiene, utilizando procedimientos asépticos de manipulación y cultivo del material. Aun así, se observa que cada especie y tipo de tejido somático requiere de protocolos particulares para lograr el establecimiento de cultivos asépticos y multiplicación masiva *in vitro*.

Las razones prácticas para inducir la proliferación celular y formación de callos son limitadas por el tipo de explante como disponibilidad, facilidad de manipulación, homogeneidad, contaminación con microorganismos y respuesta *in vitro*. Es común el uso de plantas jóvenes que crecen en invernaderos, que ayudaría a tener un explante con mayor proporción de células capaces de reiniciar divisiones que den origen a grupos de células en las que se formen estructuras meristemáticas, en comparación a tejido vegetal adulto.

Una condición importante para realizar cultivo de tejidos vegetales, es la asepsia. Las pérdidas de cultivos *in vitro* debidas a hongos y/o bacterias latentes presentes en los tejidos del explante inicial, pueden evitarse mediante la indexación regular de las plantas en vivero, para descartar aquellas que estén infectadas. Hay plantas que no muestran síntomas a pesar de que en sus tejidos contengan bacterias endofíticas (Chandra y Chandra 2011). Otro factor de posible contaminación de cultivos *in vitro* por microorganismos, es durante la manipulación del explante en el laboratorio, por el uso de herramientas, o medios de cultivo deficientemente esterilizados (Leifert y Cassells 2001).

Durante la etapa II, de proliferación de propágulos se induce que la cantidad de propágulos ya sea brotes adventicios, embriones somáticos o brotes con yemas axilares, se incremente. En esta etapa es donde se genera gran cantidad de individuos que constituyen la población clonal, en un periodo corto de tiempo, libres de enfermedades; aunque debido a errores de procedimiento un porcentaje de cultivos se contamina con microorganismos, por lo tanto, superar esta etapa *in vitro* es de vital importancia (Pancaningtyas, 2015). Durante esta etapa se debe evitar que ocurra la oxidación de tejidos, que se inicia en las zonas de los cortes realizados en los explantes (Azofeifa, 2009).

Los microorganismos son la causa más importante de las pérdidas de *cultivos in vitro* de células, tejidos y órganos vegetales (Leifert y Waites 1992). De los cultivos que se contaminan, del 10 a 15 % es debido a hongos de los géneros *Fusarium*, *Neurospora*, *Microsporium*, *Cladosporium* y *Phialophora* (Enjalric et

al. 1988). Del 20 a 55 % de contaminación es por bacterias, y se ha demostrado que muchas se encuentran en tejidos vegetales donde no producen síntomas ni un crecimiento visible, y se les denomina "latentes", "internas", "endofíticas" o "endógenas" (Leifert & Waites 1990).

Los medios de cultivo utilizados en este sistema contienen una mezcla rica en nutrientes que es propicia para la rápida proliferación de hongos y bacterias. Una vez que los microorganismos contaminantes se establecen en el medio de cultivo, crecen rápidamente agotando los nutrientes del medio y produciendo toxinas dañinas para el explante vegetal (Guri et al. 2016). Por lo que, durante el establecimiento de los cultivos, así como en las etapas siguientes de multiplicación de propágulos y la preparación para trasplante a suelo, se deben mantener cultivos completamente asépticos. Las contaminaciones microbianas en la base del explante o alrededor de él, constituyen una gran problemática en el cultivo *in vitro*, por lo que el objetivo de este trabajo fue, evaluar las cantidades de tejidos de tallo de *Agave angustifolia* Haw que se logren establecer *in vitro* asépticos y con respuesta de morfogénesis en la etapa 1; y cantidades de brotes asépticos durante la etapa II.

3.2 Materiales y métodos

3.2.1 Lugar de trabajo y material vegetal

La presente investigación se realizó en un vivero y el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales del Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca, localizado en el municipio de Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca, México. El material vegetal fue de tres tipos: 1) plantas en vivero, de las que se obtuvieron tejidos de tallo para la etapa de establecimiento de cultivos asépticos *in vitro*; 2) brotes adventicios en cultivos *in vitro* contaminados; 3) brotes adventicios en cultivos asépticos *in vitro*.

3.2.2 Obtención de tejidos de tallo de plantas en vivero para el establecimiento de cultivos asépticos

Se tuvieron plantas de *A. angustifolia* micropropagadas, de dos a cinco años de crecimiento *ex vitro*, las que en la etapa 0 en vivero se establecieron individualmente en macetas de 5 dm³ con un sustrato de arena, y se fertilizaron cada cuatro días durante seis meses, con solución nutritiva Steiner (1984) diluida a 50% y asperjadas dos veces por semana con Benomilo[®] (IUPAC: 1-benzimidazol-2-ilcarbamato de metilo CA: [1-[carbonil]-1H-benzimidazol-2-il]carbamato de metilo) y Oxitetraciclina[®] (Oxitetraciclina: clorhidrato de oxitetraciclina con un contenido de oxitetraciclina no menor del 75%). Las plantas se extrajeron del sustrato, se les cortaron las hojas y raíces, llevando el tallo al laboratorio para continuar con la etapa I de establecimiento de cultivos asépticos, de acuerdo al procedimiento de preparación del medio de cultivo y el establecimiento de tejidos descrito por Ríos-Ramírez et al (2018).

En laboratorio los tallos se lavaron con agua corriente para remover partículas de tierra que pudieran traer de la etapa 0, y entonces se sometieron a alguno de los procedimientos siguientes: tratamiento 1, tallos de plantas de dos años, que se sometieron a desinfección superficial mediante lavado en solución 0.1% detergente por quince minutos, un enjuague con agua, lavado con solución 0.2% shampoo por cinco minutos, enjuague con agua, inmersión durante veinte minutos en solución 0.1% de bactericida Oxitetraciclina[®], tres enjuagues con agua, inmersión durante quince minutos en solución hipoclorito de sodio al 0.6%, cinco enjuagues con agua esterilizada; tratamiento 2, tallos de tres plantas de cinco años, se sometieron a desinfección superficial mediante lavado en solución 0.1% detergente por quince minutos, un enjuague con agua, lavado con solución 0.2% shampoo por cinco minutos, tres enjuagues con agua, inmersión durante quince minutos en solución 0.6% hipoclorito de sodio al 0.6%, cinco enjuagues con agua esterilizada.

El medio de cultivo que se usó para el establecimiento de cultivos asépticos, e inducir la organogénesis, se preparó con las sales minerales MS (Murashige y Skoog 1962), 0.2 mg L⁻¹ de cada una de las vitaminas piridoxina, tiamina y ácido nicotínico y del aminoácido glicina; sacarosa 25 g L⁻¹, inositol 0.1 g L⁻¹, ácido ascórbico 0.05 g L⁻¹, ácido cítrico 0.05 g L⁻¹, N6-Bencilaminopurina (BAP) 1 mg L⁻¹, y auxina ácido indol-3-acético (AIA) 0.15 mg L⁻¹. El pH se ajustó a 5.8, y después se agregó agar-agar 6 g L⁻¹, que se disolvió con calor y agitación en una parrilla con agitación magnética y entonces se vaciaron 20 ml en cada frasco de

vidrio de 145 cm³. A cada frasco se colocó una tapa de polipropileno para esterilizarse durante 15 minutos en autoclave, a 120 °C y 1.2 kg cm⁻² de presión.

En ambientes asépticos compensados por una campana de flujo laminar horizontal, cada tallo se colocó en una caja petri 10x 100 mm, de vidrio, esterilizada y, usando pinzas y bisturí esterilizados se cortaron en fragmentos de 1,5×1,5 cm y 0,3 cm de espesor. Cada fragmento se colocó en el recipiente con el medio de cultivo descrito. Se colocó nuevamente la tapa de polipropileno y se selló con polietileno adherente. Los cultivos *in vitro* se incubaron durante 10 semanas en iluminación LED a 35 μmol m⁻² s⁻¹, fotoperiodos de 16 h y 8 h de oscuridad; temperatura en el rango de 15 a 29 °C.

3.2.3 Brotes adventicios en cultivos asépticos *in vitro*, tratamiento 3

Los racimos de 3 a 5 brotes adventicios obtenidos mediante organogénesis a partir de tejidos de tallo, que se lograron asépticos, se extrajeron del recipiente de cultivo, se situaron en caja Petri esterilizada y mediante pinza y bisturí esterilizados se separaron en racimos con dos a tres brotes, para establecer un racimo en cada frasco con medio de cultivo para inducir la organogénesis. Los frascos se taparon y sellaron con polietileno adherente, para colocar los cultivos *in vitro* en las condiciones y tiempo de incubación ya descritas.

3.2.4 Brotes adventicios en cultivos contaminados, tratamiento 4

Los brotes que se formaron a partir de los tejidos de tallo en la etapa I, pero que presentaban contaminación por bacterias, en condiciones de la campana de flujo laminar horizontal, y usando pinzas, bisturí y recipientes de vidrio esterilizados, se extrajeron del recipiente de cultivo *in vitro*, para someterlos al tratamiento 4, de desinfección que consistió de: inmersión durante 15 segundos en etanol 70%, y entonces se secaron con papel absorbente esterilizado, para entonces establecerlos en el medio de cultivo para inducir la organogénesis, gelificado, esterilizado, que contenía los antibióticos cloranfenicol 2 ml L⁻¹, ampicilina 0.100 g L⁻¹. Se colocó la tapa al frasco y selló, para colocar los cultivos *in vitro* en el área de incubación, en condiciones similares que los cultivos de los otros tratamientos (Ríos-Ramírez et al. 2018).

3.2.5 Diseño experimental

El experimento se estableció de acuerdo a un diseño completamente aleatorio simple. La cantidad total de cultivos *in vitro* fue 724, de las cuales en los tratamientos 1, 2, 3 y 4 se tuvieron 190, 159, 336 y 45 cultivos. Del total de cultivos en cada tratamiento se separaron en unidades experimentales que en el tratamiento 1 tenían en promedio 38 cultivos *in vitro*, de 53 en el tratamiento 2, 8 cultivos *in vitro* en el tratamiento 3 y en el tratamiento 4 fueron de 15 cultivos *in vitro*, y su número de repeticiones fueron 5, 3, 42 y 3, respectivamente. Las variables que se evaluaron fueron: porcentaje de cultivos asépticos versus % de contaminados, % de los cultivos asépticos que fueron viables (que los tejidos presentaron aumento de tamaño y cambio de coloración de blanco a

pigmentación verde) y la formación de brotes (cuantificado en los cultivos viables) en las etapas antes mencionadas. Para analizar los datos en porcentajes de contaminación, se transformaron con la función arcoseno. Los datos se sometieron a análisis de varianza. Para la prueba de Tukey para comparación de medias ($p \leq 0.05$) se usaron los datos sin transformar.

3.3 Resultados y discusión

En *A. angustifolia* se tienen reportes de su micropropagación con descripción de todas las etapas desde el manejo de las plantas durante la etapa 0 en vivero y las posteriores de cultivo *in vitro*: establecimiento de cultivos asépticos, multiplicación de propágulos mediante formación de brotes múltiples, el enraizado de los brotes, la transferencia de las plantas micropropagadas a sustrato e invernadero para su aclimatación (Ríos-Ramírez et al. 2018). Así también se ha descrito el desarrollo de las plantas en vivero hasta que tienen tamaño para su transferencia a campo. En 1987 en Oaxaca, México, se establecieron las primeras ocho mil plantas micropropagadas en cultivos en campo y se cosecharon de 7 a 9 años después para su uso como materia prima para la agroindustria de mezcal (Enríquez-del Valle 2008). La experiencia muestra que es posible evaluar modificaciones en las diversas etapas del procedimiento para aumentar su eficiencia. Y en el presente trabajo fue para reducir los índices de contaminación en la etapa I. Abreu et al (2016) para la propagación de *A. fourcroydes* usaron antibióticos en el medio de cultivo, hasta 50 mg L⁻¹ de Ticarcilina y hasta 100 mg L⁻¹ de Cefotaxima, que inhibieron el

crecimiento de bacterias contaminantes. Mientras que para cultivos *in vitro* de *A. tequilana*, Obledo-Vázquez et al (2004) incorporaron al medio de cultivo un extracto comercial de toronja (citricidal®), como alternativa al uso de antibióticos.

La figura 1 muestra la condición de las plantas en la etapa 0 en vivero (1a), los tallos que se llevaron de vivero a laboratorio (1b), segmentos de tejido de tallo que en la etapa I se establecieron en medio de cultivo (1c) y brotes adventicios que se obtuvieron en tejidos de tallo en que ocurrió la organogénesis (1d). Cuando el cultivo *in vitro* inicia a partir de tejidos del tallo, que es una estructura que está en estrecho contacto con el suelo y en sus tejidos hay poblaciones de microorganismos endógenos, por lo que disminuye la eficiencia de tratamientos para eliminar microorganismos. Ríos-Ramírez et al (2018) reportaron que, para la micropropagación de *A. angustifolia*, en la etapa I, entre 38.7 y 83.4% de los cultivos se contaminó, mientras que López-Acevedo et al (2018) reportan que 29.8% de los tejidos de tallo que establecieron *in vitro*, resultaron asépticos, viables y en los que hubo formación de brotes adventicios. En los trabajos citados, así como en el presente, se coincide con Deberg y Maene (1985) sobre la importancia de la etapa 0 de manejo previo de las plantas en vivero, para reducir la incidencia de contaminación de tejidos vegetales cuando se establezcan *in vitro*.

a.



b.



c.



d.



Figura 1. Micropropagación de *A. angustifolia*. a) planta en vivero en la etapa 0; b) Tallo de 7 cm altura y 8 cm diámetro, que se llevó al laboratorio; c) tejidos de tallo establecidos en medio de cultivo y que durante de 30 días de incubación *in vitro* se observó que aumentó en tamaño, su coloración tornó a verde, como muestra de viabilidad, y a los 50 días se observaron pequeños brotes. Etapa I; d) Racimo de brotes adventicios formados en tejidos de tallo en que ocurrió la organogénesis en la etapa I.

Los análisis de varianza (cuadro 1) muestran que las etapas de propagación tuvieron diferencias de efecto altamente significativas ($P \leq 0.01$) en los porcentajes de cultivos que se obtuvieron asépticos, los porcentajes de cultivos contaminados, los porcentajes de cultivos que se obtuvieron viables, y efectos significativos ($P \leq 0.05$) en la cantidad de brotes que se formaron en los explantos.

Cuadro 3. Resumen de cuatro Análisis de Varianza de porcentajes de cultivos asépticos, contaminados, porcentaje de cultivos viables y número de brotes formados en cada explanto.

Cuadrados medios y significancia					
FV	GL	Arco seno % aséptico	Arco seno % contaminados	Arco seno % viables	Número de brotes
Trat	3	9980.00 **	10633.00 **	10679.91 **	0.77 *
Error	49	256.13	164.21	123.09	0.17
Total	52				

FV= fuente de variación, GL= grados de libertad. *= valor de F significativo ($P \leq 0.05$); **= valor de F altamente significativo ($P \leq 0.01$); ns= valor de F no significativo ($P > 0.05$).

Cuadro 4. Cultivos *in vitro* de tejidos de tallo contaminados o asépticos, y formación de brotes de *Agave angustifolia*.

Tratamiento	% Aséptico	% Contaminados	% asépticos viables	Cultivos viables	Número de brotes
1, Etapa 1	3.68 ± 3.6d	96.32 ± 3.68 a	11.12 ± 11.12c		0.40 ± 0.40b
2, Etapa 1	8.73 ± 7.14 c	91.27 ± 7.14 b	57.33 ± 29.78 b		1.33 ± 0.66 a
3, Etapa 2	89.88 ± 1.68 a	10.12 ± 1.68 d	100 ± 0 a		1.07 ± 0.04 a
4, Etapa 2	52.50 ± 13.76 b	47.50 ± 13.76 c	100 ± 0a		1.00 ± 0a

T1= tejidos de tallo de plantas de dos años de edad, para el establecimiento de cultivos asépticos; T2= tejidos de tallo de plantas de cinco años de edad, para el establecimiento de cultivos asépticos; T3= brotes de cultivos asépticos que se transfirieron a medio de cultivo para multiplicación de propágulos; T4= brotes obtenidos *in vitro*, contaminados, que se desinfectaron superficialmente y establecieron en medio de cultivo con antibióticos. Los datos muestran el promedio \pm error estándar. En cada columna promedios con la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey, 0.05).

Obtención de tejidos de tallo de plantas en vivero para el establecimiento de cultivos asépticos.

Conforme los tejidos de agave son de edad mayor se dificulta cortarlos debido a que sus fibras tienen paredes celulares de grosor mayor en comparación a tejidos de tallos jóvenes. Conforme las plantas son de edad mayor tiene más probabilidad de tener en sus tejidos microorganismos endófitos, por lo que se tomó en cuenta este factor. Durante los primeros 10 días de incubación de cultivos de la etapa 1, se diagnosticaron los microorganismos contaminantes de los géneros *Fusarium* y *Aspergillus*, así como bacterias gram negativas, en los tejidos cultivados *in vitro*, las evidencias muestran que del total de tejidos de tallo de agave que se establecieron *in vitro*, solamente el 3.68% y 8.73% de los tejidos de tallo en el tratamiento 1 y en el tratamiento 2, se lograron asépticos, respectivamente. Sin embargo, algunos cultivos de tejidos de tallo que se contaminan se mantienen viables y ocurrió la organogénesis de brotes, por lo que

estos tejidos de tallo se sometieron al tratamiento 4, para tratar de eliminar los microorganismos.

Lo anterior puede ser debido a que los fungicidas y antibióticos aplicados a las plantas en vivero en etapa 0, no fueron suficientemente eficientes para eliminar microorganismos endógenos. Al usar estos tejidos de tallo para la etapa i de establecimiento de cultivos asépticos, gran parte de los cultivos se contaminaron ya que la desinfección superficial no fue eficiente, pues las sustancias utilizadas solo actúan a nivel superficial y no alcanzan a penetrar en los tejidos vegetales, donde es probable haya microorganismos. Debido al cuidado en la manipulación de los tejidos vegetales, se descarta el hecho de que parte de contaminación por microorganismos fuese debido a la inadecuada esterilización de materiales, medios de cultivo y errores de manipulación. Sánchez y Salaverria (2004) al micropropagar plantas de fresa, comentan que la abundante pubescencia de los tejidos y su contacto directo con el suelo son condiciones para que, al llevar las plantas del campo a laboratorio, al establecer cultivos in vitro ocurra alta contaminación.

Brotos adventicios provenientes de cultivos asépticos

Al lograr cultivos de tejidos de tallo en la etapa I, asépticos y viables, en los que ocurrió la formación de brotes, éstos se transfirieron a nuevo medio de cultivo. Transcurridas ocho semanas el 89.88% de cultivos mantuvo su condición de asepsia, el 100% fueron viables y en todos ocurrió la formación de 1.07 nuevos brotes en promedio (cuadro 2). El porcentaje alto de cultivos viables, en que

ocurrió formación de nuevos brotes, en la etapa II, es debido a que los materiales vegetales ya no se someten al procedimiento de desinfección superficial. Dicho procedimiento que en la etapa 1 se aplicó a los tejidos vegetales para eliminar microorganismos, también daña al material vegetal.

Brotos adventicios en cultivos contaminados

Cuando en la etapa I, ocurrió la organogénesis de brotes adventicios a partir de tejidos de tallo, pero estos cultivos presentaban contaminación por bacterias, se extrajeron del medio de cultivo para someterlos al tratamiento 4, que incluyó la desinfección superficial y entonces se establecieron en un medio de cultivo para inducir organogénesis, pero que además contenía los antibióticos cloranfenicol 2 ml L⁻¹, y ampicilina 0.100 g L⁻¹. Transcurridos 20 días de incubación el 52.5% ya no mostraban crecimiento de hongos o bacterias, significativamente (Tukey, 0.05) menor en comparación a la contaminación de cultivos en la etapa 1. En ensayos previos a este experimento se determinaron las dosis usadas en el tratamiento 4. Cuando las sustancias cloranfenicol, y ampicilina se agregaron al medio de cultivo en concentraciones mayores a las que se indican como efectivas, produjeron fitotoxicidad, ocurriendo necrosis en los tejidos.

3.4 Conclusiones

Ocurren diferentes niveles de contaminación por microorganismos en cultivos *in vitro* de *A. angustifolia* de acuerdo a la etapa de propagación. La mayor parte de la contaminación, 91.2 a 96.3%, durante la etapa I fue debido a microorganismos

presentes en los tejidos de tallo y que no pudieron ser eliminados mediante la aplicación de fungicidas y antibióticos a las plantas en vivero, ni debido a los procedimientos de desinfestación superficial de los tejidos al inicio de la etapa I. En cultivos *in vitro* de tejidos de tallo en que ocurrió la formación de brotes adventicios, pero contaminados por bacterias, al someterlos a un procedimiento de desinfección y establecerlos en un medio de cultivo con antibióticos fue posible que 52.5% de éstos se lograsen asépticos. La procedencia del material vegetal es fundamental para su propagación *in vitro* que influye en la presencia de contaminantes microbianos. Cuando en tejidos de tallo se obtuvo la organogénesis de brotes adventicios y estos cultivos fueron asépticos en la etapa I, al separar los racimos de brotes en racimos más pequeños, para subcultivar a medio de cultivo para multiplicación de propágulos de la etapa II, la ocurrencia de contaminación por microorganismos se redujo a 10.1%.

3.5 Referencias

- 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. *Biotechnología Vegetal* 16 (1): 31 – 36.
- Azofeifa A. (2009) Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro* *Agron. Mesoam.*, 20: 153-175.
- Bautista, J. A., & Smit, M. A (2012) Sustentabilidad y agricultura en la “región del mezcal” de Oaxaca. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 10(3) 655-668.

- Chandra, J. R. y Chandra, S. K (2011) Endogenous microbial contamination during In vitro culture of sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam): identification and prevention". *Journal of Agricultural Technology*, 7 (6): 1725–1731. ISSN 1686-9141.
- Cruz, H.; Enríquez-del-Valle, J. R.; Velasco, V. A.; Ruiz, J.; Campos, G. V. y Aquino, D. E (2013) Nutrimientos y carbohidratos en plantas de *Agave angustifolia* Haw. y *Agave karwinskii* Zucc. *Rev. Mex. Cienc. Agríc.* 6(4):1161-1173.
- Domínguez Rosales, M. S; González Jiménez, Ma. de la Luz; Rosales Gómez, C; Quiñones Valles, C; Delgadillo Díaz de L, S; Mireles Ordaz, S.J; Pérez Molphe B, E (2008) El cultivo *in vitro* como herramienta para el aprovechamiento, mejoramiento y conservación de especies del género agave. *Investigación y Ciencia*, 16. 41, 53-62
- Enialric, F., Carron, M.P. & Lardet, L (1988) Contamination of primary cultures in tropical areas: The case of *Hevea braziliensis*. *Acla Hort.* 225: 57 - 65.
- Enríquez, del V. J. R (2008) La propagación y crecimiento de agaves. Fundación Produce Oaxaca, A. C. Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca. Oaxaca. México: 46.
- Esqueda, M. y Vargas, G (2007) Biotecnología aplicada en el aprovechamiento sostenible de agave. *Reconversión*. 9:10-13.
- Fortes, A. M. and M. S. Pais (2000) Organogenesis. From intemode-derived nodules of *Humulus lupulus* var. Nugget (*Cannabaceae*): *histological studies and changes in the starch content*. *Am. J. Bot.* 87 (7): 971-979.
- George, E. F. y Debergh, P. C (2008) Micropropagation: uses and methods. In: George, E. F.; Hall, M. and De Klerk, G. *Plant propagation by tissue culture*. 3er edition The Background. *Springer*. 29-64
- González-González, L. R.; García-Pérez, M. I. B.; Gutiérrez, L. K. y García, A (2007) Obtención de azúcares fermentables a partir de inulinasas inmovilizadas por el método del sol-gel. *Rev. Cienc. Tecnol.* 6(6):106-111
- Guri, A. Z. y Patel, K. N. (2006) Composiciones y métodos para prevenir la contaminación microbiana de medios de cultivo de tejidos vegetales. no. CL. 7: C12N 5/02, Inst. Oficina Española de Patentes y Marcas, España.

- Jarquín-Rosales D., J. R. Enríquez-del Valle, J. J. Alpuche-Osorno, G. Rodríguez-Ortiz, M. P. Martín and G. V. Campos-Ángeles (2022) The effects of fertirrigation and *Azospirillum brasilense* inoculation on photosynthetic compounds of *Agave angustifolia*. *Australian Journal of Crop Science* 16:162-168, <https://doi.org/10.21475/ajcs.22.16.01.p3280>
- Leifert, C. Ritchie Y. and Waites W. M (1990) Contaminants of plant tissue cultures. *PhD thesis, Nottingham University, School of Agriculture*. 452-469
- Leifert C, Waites WM (1992) Bacterial growth in plant tissue culture media. *Journal of Applied Bacteriology* 72: 460-466
- Leifert, C. y Cassells, A. C (2001) "Microbial hazards in plant tissue and cell cultures". In *Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 37,. 2, 133-138, ISSN 1054-5476, 1475-2689, DOI 10.1007/s11627-001-0025-y.
- Miguel-Luna, M. E., Enríquez-del Valle, J. R, Velasco Velasco, V. A., Villegas-Aparicio, Y, Carrillo-Rodríguez, J. C, & Rodríguez-Ortiz, G (2013) Composición del medio de cultivo y la incubación para enraizar brotes de Agave. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 41151-1159.
- Millán-Soto, G.; Gutiérrez, A.; Esqueda, M.; Gardea, A.; Tiznado, M. and Orozco, J. A (2016) Respiratory metabolism of *Agave angustifolia* Haw. clonal lines at different temperatures. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 125(1)71-80. Doi: 10.1007/s11240-015-0930-0
- Morales González, B., & Nuñez Palenius, H. G (2015) Micropropagación de *Agave tequilana* Weber variedad Azul "El coronel" en un sistema de inmersión temporal (sit). *jóvenes en la ciencia*, 1(2), 77-82. <https://www.jovenesenlaciencia.ugto.mx/index.php/jovenesenlaciencia/article/view/420>(consultado: 12/05/2023)
- Murashige, T. and Skoog, F (1962) A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures". *Physiologia Plantarum*, 15,. 3 473-497, ISSN 1399-3054, DOI 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
- Obledo-Vázquez, E.N., N. Flores-Verduzco, y J. Cervantes-Martínez (2004) Detección del Efecto de un Extracto Vegetal Antimicrobiano Sobre Plantas de Agave (*Agave tequilana* Weber var. azul) Cultivadas *in vitro* Utilizando Fluorescencia Inducida por Laser (LIF). *Revista Mexicana de Fitopatología* 22(3): 328-332.

- Pancaningtyas, S (2015) Study on the presence and influence of phenolic compounds in callogenesis and somatic embryo development of cocoa (Theobroma cacao L.) *Pelita Perkebunan.*, 31 14-20.
- Ríos-Ramírez S.C., J.R. Enríquez-del Valle, G. Rodríguez-Ortiz, J. Ruíz-Luna and V. A. VelascoVelasco (2018) *In vitro* formation of adventitious shoots on caulinary tissue of physiologically contrasting *Agave angustifolia* plants. *Emirates Journal of Food and Agriculture.* 30(1).285-294.
- Robert, M. L.; Herrera, J. L.; Chan, J. L. and Contreras, F (1992) Micropropagation of *Agave spp.* In: Bajaj, Y. P. S. (Ed.) *Biotechnology in Agriculture and Forestry.* 19. SpringerVerlag,306-329. doi: 10.1007/978-3-662-07770-2-19
- Sánchez M, Salaverria J (2004) Control de la oxidación y la contaminación en el cultivo *in vitro* de fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.) [Tesis]. Laboratorio de Biotecnología; 4th ed. Maturín. Universidad de Oriente. 22<https://dialnet.unirioja.es/download/articulo/2221549.pdf>
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera [SIAP] (2019) Anuario Estadístico de la Producción Agrícola [base de datos]. <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola>
- Steiner, R (1984) The universal nutrient solution. In: Proceedings of IWOSC 1984 6 the International Congress on Soilless Culture. April 29-May 5, 1984. Wageningen, The Netherlands. 633-650. [https://www.scirp.org/\(S\(i43dyn45teexjx455qlt3d2q\)\)/reference/ReferenceSPapers.aspx?ReferenceID=1833796](https://www.scirp.org/(S(i43dyn45teexjx455qlt3d2q))/reference/ReferenceSPapers.aspx?ReferenceID=1833796)
- Zeng, F., X. Zhang, L. Cheng, L. Hu, L. Zhu, J. Cao and X. Guo (2007) A draft gene regulatory network for celular totipotency reprogrammiing during plant somatic embryogenesis. *Genomics.* 90 620-628.

CAPÍTULO IV

PROLIFERACIÓN DE BROTES DE *Agave angustifolia* Haw. EN RESPUESTA A CITOQUININAS Y GELIFICANTE *in vitro*

[PROLIFERATION OF SHOOTS OF *Agave angustifolia* HAW. IN RESPONSE TO CYTOKININS AND GELLING AGENT *in vitro*]

Fátima Manuel Zárate¹ (<https://orcid.org/0009-0009-8192-1015>), José Raymundo Enríquez-del Valle¹ (<https://orcid.org/0000-0002-7700-3790>), Alfonso Vásquez López² (<https://orcid.org/0000-0001-5628-5525>), Gerardo Rodríguez-Ortiz¹ (<https://orcid.org/0000-0003-0963-8046>), Vicente Arturo Velasco Velasco¹ (<https://orcid.org/0000-0002-3575-0181>)

¹Tecnológico Nacional de México. Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca. Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca, México. C.P. 71233.

²Instituto Politécnico Nacional, Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Oaxaca. Santa Cruz Xoxocotlán, C.P. 71230.

*Autor de correspondencia: jenriquezdelvalle2@yahoo.com

RESUMEN

Agave angustifolia, es una especie favorecida por agricultores de mezcal debido a su corto tiempo, 7 a 9 años en que llega a la cosecha. Las plantas que se usan en plantaciones se consiguen mediante propagación asexual: vástagos de rizoma, bulbilos de inflorescencia y la técnica de cultivo de tejidos vegetales, CTV. Aun cuando se tienen reportes sobre la estructura de los medios de cultivo para inducir la organogénesis y la embriogénesis somática, es posible investigar sobre modificaciones en los medios de cultivo para incrementar la eficiencia.

El objetivo del trabajo fue evaluar ocho variantes (tratamientos) de medio de cultivo que difirieron en dos citocininas (2i-P y BAP), dos concentraciones de citocinina (2 o 4 mg L⁻¹) y dos tipos de gelificante (agar-agar o Phytigel) en su efecto para la proliferación en brotes. A partir de tallos (explantos) que se establecieron durante 60 días en los diversos tratamientos, hubo diferencias en la cantidad de nuevos brotes y de raíces, debido a los componentes de medio de cultivo. Los tallos que se establecieron en medio de cultivo con 2 mg L⁻¹ de BAP formaron mayor cantidad de brotes nuevos, mientras que los tallos que se establecieron en medio de cultivo con 2i-P formaron menor cantidad de nuevos brotes, pero si abundantes raíces. Los tipos de gelificante no tuvieron diferencias de efecto en la formación de nuevos brotes.

Palabras clave: concentraciones, explantos, reguladores, propagación

ABSTRACT

Agave angustifolia is a preferred species for mezcal producers due to the short time, 7-9 years, in which it reaches maturity. The plants used in plantations are obtained through asexual propagation: rhizome shoots, inflorescence bulbils and the plant tissue culture technique, CTV. Even though CTV has reports on the composition of the culture media to induce organogenesis and somatic embryogenesis, it is possible to investigate modifications in the culture media to increase efficiency. The objective of the work was to evaluate eight variants (treatments) of culture medium that differed in two cytokinins (2i-P and BAP), two concentrations of cytokinin (2 or 4 mg L⁻¹) and two types of gelling agent (agar-agar or Phytigel) in its effect for the proliferation of shoots. From stems (explants) that were established for 60 days in the various treatments, there were differences in the amount of new shoots and roots, due to the components of the culture medium. The stems that were established in culture medium with 2 mg L⁻¹ of BAP formed a greater number of new shoots, while the stems that were established in culture medium with 2i-P formed a smaller number of new shoots, but abundant roots. The types of gelling agent had no differences in effect on the formation of new shoots.

Index words: concentrations, explants, regulators, propagation

4.1 Introducción

El agave es endémico del continente americano y su distribución va desde los países de México, Estados Unidos, Cuba y Guatemala; contando con el mayor número de especies y otros países tienen menos de ocho que corresponden al 3% (Pérez et al., 2016) aunque debido a la utilidad de diversas especies, desde fines del siglo XIX se han establecido plantaciones en África y Asia (Nobel., 1994). La gran diversidad de este género, brindan más de 100 formas de uso, de éstas, 70 se aprovechan en actividades económicas generadoras de empleo (Esparza-Ibarra et al., 2015; López-Romero et al., 2018).

En Oaxaca en el transcurso del año 2023 se tuvieron 11,726.69 ha de plantaciones de agave, y se cosecharon 256,523.14 t en 3,681.98 ha (SIAP, 2023). El 88.11% de la producción nacional de mezcal se obtiene de *A. angustifolia*, especie reconocida por los agricultores de maguey debido al corto tiempo en que llega a la madurez, 7 a 9 años (COMERCAM, 2022), produciendo piñas (el tallo de la roseta) de gran tamaño, 67 cm de alto, 80 kg de peso promedio, con 21% de azúcares reductores totales en base a peso fresco (Cruz-García et al., 2013) de modo que se siembra con propósitos comerciales.

Los sembradíos de esta especie se siembran cultivan con plantas producidas mediante propagación asexual, siendo la mayoría vástagos de rizoma, pero en este sistema de propagación la planta madre en campo no recibe cuidados fitosanitarios, por lo que se podrían estar produciendo plantas infectadas con

patógenos. Otra opción usada en menor proporción es la propagación mediante bulbilos de inflorescencia, pero los agricultores evitan que las plantas desarrollen la inflorescencia, cortando el escapo floral al inicio de su desarrollo, para promover que en el tallo se acumulen azúcares (Enríquez-del Valle, 2008; Garnica-García et al., 2020). Se tienen antecedentes del uso de la técnica de cultivo de tejidos vegetales, CTV, para la propagación de diversas especies de agaves. En el año 1977 se publicó un primer reporte de aplicación de la técnica de CTV para la propagación masiva *in vitro* de *Agave* sp. que permite producir poblaciones clonales a partir de plantas seleccionadas, en tiempos y espacios mínimos (Groenewald et al., 1977). Además, cuando ya se cuenta con cultivos *in vitro*, es posible su uso para estudios básicos, la producción *in vitro* de metabolitos secundarios (Domínguez-Rosales, 2008), o generar variación genética al exponer los cultivos *in vitro* a agentes mutágenos u otras alternativas de modificación genética (Ángeles-Espino et al., 2020).

Existen trabajos relacionados al cultivo y propagación *in vitro* de *A. angustifolia* (Arzate-Fernández et al., 2016; Enríquez-del Valle et al., 2018), así como en *A. tequilana* (Vázquez-Martínez et al., 2022), *A. fourcroydes* (Malavert et al., 2018) y *A. potatorum* (Bautista-Castellanos et al., 2020), en las que han determinado condiciones y entorno de incubación para diversas etapas del procedimiento de propagación: establecimiento de cultivos asépticos, multiplicación de propágulos, enraizado de brotes en preparación para trasplante a suelo.

En cultivos *in vitro* de células vegetales los reguladores de crecimiento más utilizados son las auxinas y citocininas. En auxinas, el ácido 2,4-

diclorofenoxiacético (2,4-D), combinado con Benciladenina (BA) y Cinetina, promueve la inducción y mantenimiento de tejido caloso embriogénico en cultivos *in vitro* de *Agave tequilana* (Ángeles-Espino et al., 2018). La citocinina 2-isopenteniladenina (2i-P) promueve crecimiento por división celular en cultivos de *Agave cupreata*, *A. karwinskii*, *A. obscura*; mientras que en *A. angustifolia* la N6-bencilaminopurina (BAP) induce la formación de brotes (Ríos-Ramírez et al., 2017).

Aun cuando se tienen reportes sobre la composición de los medios de cultivo para inducir la organogénesis y la embriogénesis somática en cultivos *in vitro* de las especies de agaves, es posible investigar sobre modificaciones en los medios de cultivo para aumentar la eficiencia en la respuesta de morfogénesis. En este contexto el objetivo del presente trabajo fue evaluar dos citocininas (2i-P y BAP) en concentraciones de 2 mg L⁻¹ y 4 mg L⁻¹ y, tipo de gelificante (agar-agar o Phytigel) en su efecto para la proliferación en brotes en *A. angustifolia* Haw.

4.2 Materiales y métodos

4.2.1 Selección y manipulación del material vegetal

La presente investigación se realizó en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales del Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca, localizado en el municipio de Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca, México.

El material vegetal fueron cultivos *in vitro* de racimos de 2 a 6 brotes heterogéneos en tamaño de *A. angustifolia* obtenidos por organogénesis en

tejidos de tallo. En condiciones asépticas proporcionadas por una campana de aire filtrado de flujo laminar horizontal, el uso de pinzas y bisturí esterilizados, los racimos de brotes se extrajeron del recipiente con medio de cultivo, se colocaron en cajas de Petri 10×100 mm de vidrio esterilizadas y se separaron aquellos brotes de 1 a 2 cm de altura, para transferirlos a frascos de cultivo de 145 cm³ que contenían 20 mL de alguna de las ocho variantes de medio de cultivo gelificado esterilizado. El medio basal de cultivo contenía las sales minerales de MS (Murashige y Skoog, 1962) al 100 %, 1 mg L⁻¹ de tiamina-HCl, 100 mg L⁻¹ de myo-inositol, 30 g L⁻¹ de sacarosa, 50 mg L⁻¹ de ácido ascórbico, 50 mg L⁻¹ de ácido cítrico y 0.1 mg L⁻¹ de ácido indol-3-acético (AIA). Teniendo el medio basal se prepararon ocho variantes (tratamientos = Ti) de medio de cultivo, que difirieron en tres factores: 1) tipo de citocinina en el medio de cultivo (N6-bencilaminopurina, BAP, o N6-(2-isopentenyl) adenine, 2i-P); 2) concentración de citocinina en el medio de cultivo, en dos niveles, 2 mg L⁻¹ o 4 mg L⁻¹; 3) tipo de gelificante, en dos niveles, agar-agar 6 g L⁻¹ o Phytigel 2 g L⁻¹. Consistiendo el T1= 2 mg L⁻¹ de BAP y 6 g L⁻¹ agar-agar; T2= 4 mg L⁻¹ de BAP y 6 g L⁻¹ agar-agar; T3= 2 mg L⁻¹ de 2i-P y 6 g L⁻¹ agar-agar; T4= 4 mg L⁻¹ de 2i-P y 6 g L⁻¹ agar-agar; T5= 2 mg L⁻¹ de BAP y Phytigel 2 g L⁻¹; T6= 4 mg L⁻¹ de BAP y Phytigel 2 g L⁻¹; T7= 2 mg L⁻¹ de 2i-P y Phytigel 2 g L⁻¹ y, T8= 4 mg L⁻¹ de 2i-P y Phytigel 2 g L⁻¹. En todas las variantes de medio de cultivo su pH se ajustó a 5.8 con HCl o NaOH 1 N, antes de agregar los agentes gelificantes. Después de establecer los brotes en el medio de cultivo, se colocó la tapa de polipropileno y se selló con polietileno adherente, para colocar los frascos en el área de incubación en donde

estuvieron expuestos durante 60 días a iluminación LED a $35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperiodos de 16 h y 8 h de oscuridad; temperatura en el rango de 15 a 29 °C.

4.2.2 Variables evaluadas y análisis estadístico

La unidad experimental consistió de un brote y se tuvieron 15 repeticiones por tratamiento. Transcurridas ocho semanas de incubación en todas las unidades experimentales se contabilizaron el número de brotes nuevos y en cinco unidades experimentales por tratamiento se contabilizaron: número de hojas, número de raíces primarias, diámetro de brote mayor (mm), longitud de brote mayor (cm) con un calibrador vernier digital, volumen total (cm^3) por desplazamiento de agua en una probeta de 25 mL, área foliar que se digitalizó su imagen y ésta se procesó en el software ImageJ (Microsoft Java 1.1.4, <https://imagej.net/ij/features.html>) peso fresco aéreo (g), peso fresco de raíces (g), peso fresco total (g), peso seco aéreo (g), peso seco de raíces (g), peso seco total (g) . Para secar las muestras, éstas se pusieron en bolsas de papel y se colocaron en un horno Felisa FE-293 AD a una temperatura de 45 °C por cuatro días. Posteriormente las muestras se pesaron en balanza analítica marca velab, con precisión de 0.1 mg.

El experimento se estableció bajo un diseño completamente al azar con arreglo factorial $2 \times 2 \times 2$, en el factor A, tipo de citocinina en dos niveles, 6-bencilaminopurina (BAP), 2-isopenteniladenina (2i-P); el factor B, concentración de citocinina en dos niveles, (2 o 4 mg L^{-1}); el factor C, tipo de gelificante en dos niveles, (agar-agar, Phytigel), generando ocho tratamientos. Los resultados de

cada variable fueron comparados mediante un análisis de varianza y la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$) para comparación de medias. Los datos de brotes finales se transformaron con $\pi \cos(x)$, mientras que los datos de número de hojas, peso fresco aéreo, peso fresco total, peso seco aéreo, peso seco de raíz, peso seco total, se transformaron con $\pi \log(x)$; los datos de volumen con $\pi \sqrt{x}$; el diámetro de brote mayor, longitud de brote mayor se transformaron con $\pi \tan(x)$, Para la rutina de análisis estadístico se usó el programa computacional Statistical Analysis System (SAS Institute, 2019).

4.3 Resultados y discusión

Durante el transcurso de 60 días del experimento en la etapa de multiplicación de propágulos, ocurrió la proliferación de brotes y raíces, donde se observaron efectos diferentes entre los tratamientos. Los análisis de varianza (Cuadro 1) indicaron que los niveles del tipo de citocinina tuvieron diferencias significativas ($P \leq 0.01$) en el número de brotes, número de hojas, número de raíces primarias, y peso seco total. La interacción tipo de citocinina-concentración de citocinina-gelificante presentó efecto significativo en el número de hojas.

Las concentraciones de citocinina tuvieron diferencias de efecto en la variable peso fresco de raíz. Los tejidos vegetales establecidos en medio de cultivo con diferente tipo de gelificante, no mostraron diferencias en la formación de brotes nuevos. La BAP fue efectiva para inducir el desarrollo de nuevos brotes e inhibió la formación de raíces; mientras que los tallos en medio de cultivo con 2i-P

formaron más raíces (Cuadro 2). De tal manera que los tallos establecidos en medio de cultivo con BAP y agar, 2i-P y agar, BAP y Phytigel, 2i-P y Phytigel, formaron en promedio 2.45, 1.2, 2.35 y 1.3 nuevos brotes, así como 0.0, 5.9, 0.75 y 4.5 raíces adventicias, respectivamente.

Los dos gelificantes no tuvieron efecto diferente en las variables evaluadas. Ríos-Ramírez *et al.* (2017) en cultivos *in vitro* de *A. angustifolia*, reportó que la proliferación de brotes aumentó en respuesta al incremento de concentración de BAP, hasta 4 mg L⁻¹. en el medio de cultivo.

En cultivos *in vitro* de células y tejidos de agaves se ha demostrado que la ruta de morfogénesis, ya sean brotes adventicios o embriones somáticos está influenciada por la composición del medio de cultivo, particularmente por el tipo y concentración de reguladores de crecimiento. En explantos de *A. angustifolia*, que se establecieron en medio de cultivo con 3.0 mg L⁻¹ de 2,4-D y 1.0 mg L⁻¹ de BAP, se indujo la inducción de callo embriogénico, de color blanco-cremoso con una consistencia suave y friable (Arzate-Fernández y Mejía-Franco, 2011). Domínguez-Rosales *et al.* (2008), en *A. cupreata*, *A. difformis*, *A. karwinskii*, *A. obscura*, *A. potatorum*, evaluaron el efecto de la citocinina (2-isopenteniladenina a 2 mg L⁻¹) y obtuvieron 10, 7.9, 4.6, 4.1 y 5.7 brotes nuevos, mientras que en medio de cultivo con 2 mg L⁻¹ de BAP ocurrió la formación de 8.5, 3.1, 1.9, 1.1 y 2.0 brotes nuevos, respectivamente. Por lo que los resultados confirman que cada especie responde de manera diferente a los reguladores del crecimiento suministrados. Y cuando interesa que en los brotes ocurra la formación de raíces,

en *A. potatorum* (Enríquez-del Valle *et al.*, 2016) y en *A. americana* variedad oaxacansis (Miguel-Luna *et al.*, 2013) se demostró que esta respuesta se estimula al agregar una auxina en el medio de cultivo.

Se tienen escasas referencias sobre el efecto de las interacciones de sustancias agregadas al medio de cultivo, sobre la formación de brotes. Miguel-Luna *et al.* (2014) reportaron que en el cultivo *in vitro* de *A. americana* var. oaxacensis en la etapa de multiplicación de propágulos, la concentración de sacarosa influyó en la respuesta de los explantos vegetales al estímulo de citocinina. Por lo que 6 mg L⁻¹ de BA y 40 g L⁻¹ de sacarosa en el medio de cultivo fue una condición apropiada para la formación de mayor cantidad de brotes adventicios. Lo anterior podría deberse a que, si bien la citocinina desempeña un papel importante para inducir la formación de nuevos brotes, el proceso de organogénesis consume energía proporcionado por los carbohidratos.

Los brotes de *A. angustifolia* que se establecieron en medio de cultivo con 2 o 4 mg L⁻¹ de 2i-P, formaron menos brotes, 1.1 a 1.3; pero si raíces, lo que podría indicar que al usar 2iP en esta especie podría ser necesario agregar al medio de cultivo cantidades mayores de esta citocinina. Cuando Aguilar-Jiménez y Rodríguez-De la O. (2018) propagaron *Agave potatorum* Zucc. en la etapa de multiplicación de propágulos el material vegetal se estableció en medio de cultivo con 10 mg L⁻¹ de 2i-P y 0.3 mg L⁻¹ de AIB (ácido indolbutírico), y formaron en promedio 11 nuevos brotes, pero no presentaron raíces. En esta etapa interesa

que la citocinina induzca la formación de brotes en cantidad mayor, aun cuando no ocurra la formación de raíces.

Respecto al tipo de gelificante los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que el uso de 6 g L⁻¹ de agar-agar no tuvo efecto diferente al uso de 2 g L⁻¹ de Phytigel, por lo que el uso de uno u otro podría seguir criterios de costos. Veitía et al. (2012) mencionan que la estructura física del gel debe permitir la absorción de sustancias disueltas en el medio, tales como sales inorgánicas, carbohidratos, reguladores de crecimiento, vitaminas y agua. En cultivos *in vitro* para la multiplicación de callos y en la regeneración de brotes de *Phaseolus vulgaris* L se demostró que el tipo de agente gelificante y el cultivar influyeron en el tamaño de callo y cantidad de nuevos brotes.

Las cantidades que se agregaron de agar-agar (6 g L⁻¹) y Phytigel (2 g L⁻¹) fueron las mínimas necesarias para que la consistencia del gel evitase que el material vegetal se sumergiera en el medio de cultivo. Pero el crecimiento observado indica que el gel permitió que el material vegetal tuviese disponibles las sustancias disueltas en el medio de cultivo. De acuerdo con López-Escamilla et al., (2016) la fuerza del gel que oscila de 225 y 400 g cm², debe permitir la disponibilidad de agua y sustancias disueltas a los propágulos. Lebedev et al. (2018) reportaron que brotes de frambuesa (*Rubus idaeus*) cultivados *in vitro* mostraron la mejor supervivencia, crecimiento y formación de raíces con un medio de cultivo que tenía 0,1 mg L⁻¹ de BA + 0,5 mg L⁻¹ de cinetina, agar 5 g L⁻¹, Phytigel 0,2 mg L⁻¹.

Cuadro 5. Análisis de varianza de la formación de brotes de *A. angustifolia* cultivados en *in vitro* micropropagadas, establecidas en etapa II.

FV	GL	BF ^{π1}	NH ^{π2}	NRP	DBM ^{π3} (mm)	LBM ^{π4} (cm)	VOL ^{π5}	AF
Trat	7	0.58*	0.42**	11.32**	0.002 ^{ns}	0.003 ^{ns}	1.49 ^{ns}	52.41 ^{ns}
Cit (A)	1	2.14**	1.75**	19.69**	0.0003 ^{ns}	0.002 ^{ns}	1.30 ^{ns}	65.92 ^{ns}
Conc (B)	1	0.57 ^{ns}	0.05 ^{ns}	15.00**	0.0001 ^{ns}	0.003 ^{ns}	0.43 ^{ns}	1.55 ^{ns}
Gel (C)	1	0.10 ^{ns}	0.008 ^{ns}	9.80**	0.008 ^{ns}	0.005 ^{ns}	0.008 ^{ns}	70.68 ^{ns}
(A)×(B)	1	0.16 ^{ns}	0.07 ^{ns}	0 ^{ns}	0.0002 ^{ns}	0.009 ^{ns}	0.007 ^{ns}	6.20 ^{ns}
(A)×(C)	1	0.0003 ^{ns}	0.02 ^{ns}	0.80 ^{ns}	0.001 ^{ns}	0.00009 ^{ns}	2.22 ^{ns}	60.00 ^{ns}
(B)×(C)	1	0.30 ^{ns}	0.25 ^{ns}	0 ^{ns}	0.0009 ^{ns}	0.00007 ^{ns}	0.13 ^{ns}	3.61 ^{ns}
(A)×(B)×(C)	1	0.80 ^{ns}	0.80**	0 ^{ns}	0.003 ^{ns}	0.006 ^{ns}	6.32 ^{ns}	158.92 ^{ns}
Error *	112	0.27						
	32		0.09	1.96	0.002	0.002	3.35	92.30
Total *	119							
	39							

FV	GL	PFA ^{π6} (g)	PFR(g)	PFT ^{π7} (g)	PSA ^{π8} (g)	PSR ^{π9} (g)	PST ^{π10} (g)
Trat	7	0.22 ^{ns}	0.58 ^{ns}	0.30 ^{ns}	0.19 ^{ns}	0.35 ^{ns}	0.43 ^{ns}
Cit (A)	1	0.12 ^{ns}	0.02 ^{ns}	0.93 ^{ns}	0.07 ^{ns}	0 ^{ns}	1.58*
Conc (B)	1	0.02 ^{ns}	2.07**	0.01 ^{ns}	0.06 ^{ns}	0.34 ^{ns}	0.14 ^{ns}
Gel (C)	1	0.01 ^{ns}	0.07 ^{ns}	0.05 ^{ns}	0.05 ^{ns}	0.69 ^{ns}	0.12 ^{ns}
(A)×(B)	1	0.001 ^{ns}	0 ^{ns}	0.0002 ^{ns}	0.07 ^{ns}	0 ^{ns}	0.15 ^{ns}
(A)×(C)	1	0.29 ^{ns}	0.15 ^{ns}	0.18 ^{ns}	0.35 ^{ns}	0 ^{ns}	0.51 ^{ns}
(B)×(C)	1	0.05 ^{ns}	0 ^{ns}	0.11 ^{ns}	0.01 ^{ns}	0.01 ^{ns}	0.09 ^{ns}
(A)×(B)× (C)	1	1.07 ^{ns}	0 ^{ns}	0.85 ^{ns}	0.70 ^{ns}	0 ^{ns}	0.42 ^{ns}
Error	32	0.46	0.31	0.42	0.32	0.58	0.33
Total	39						

FV: fuente de variación, GL: grados de libertad, BF; brote final para prueba de medias no se usaron transformación, NH: número de hojas, NRP: número de raíces primarias, VOL: volumen, DBM: diámetro de brote mayor, LBM: longitud de brote mayor, AF: área foliar PFA: peso fresco aéreo, PFR: peso fresco de raíz, PFT: peso fresco total, PSA: peso seco aéreo, PSR peso seco de raíz, PST: peso seco total. Significancia con $P \leq 0.05$, **Significancia con $P \leq 0.01$, ns: no significativo. Los valores * representan diferente número de repeticiones (n=5 y n=15).

Cuadro 6. Características de las vitroplantas de *Agave agustifolia*, transcurridos 60 días de la etapa de proliferación de brotes.

Trat	BF	NH	NRP	DBM (mm)	LBM (cm)	VOL (cm ³)	AF
1	3.3±2.9 ^a	20.0±6.8 ^a	0±0 ^d	4.9±0.8 ^a	7.3±2.5 ^a	28.4±13.2 ^a	23.4±9.8 ^a
2	1.6±0.9 ^{abc}	10.8±3.0 ^{abc}	0±0 ^d	4.7±2.1 ^a	6.0±1.8 ^a	29.2±33.9 ^a	17.7±15.1 ^a
3	1.1±0.4 ^c	9.4±2.2 ^{bc}	5.4±1.9 ^{ab}	4.7±0.8 ^a	6-0±2.5 ^a	27.6±7.5 ^a	18.6±4.2 ^a
4	1.3±0.5 ^{bc}	10.6±1.3 ^{abc}	6.4±1.1 ^a	5.4±2.7 ^a	9.0±2.6 ^a	46.4±42.1 ^a	22.3±10.4 ^a
5	1.8±1.5 ^{abc}	14.4±9.5 ^{abc}	1.5±0.7 ^c	6.3±3.8 ^a	5.2±1.2 ^a	28.8±23.6 ^a	18.7±13.0 ^a
6	2.9±2.5 ^{ab}	17.2±4.5 ^{ab}	0±0 ^d	6.5±1.9 ^a	5.6±1.6 ^a	35.6±13.0 ^a	22.1±7.9 ^a
7	1.3±0.5 ^{bc}	9.6±1.1 ^{bc}	3.6±1.1 ^{bc}	5.4±1.2 ^a	5.5±0.8 ^a	34.0±16.1 ^a	16.8±5.7 ^a
8	1.3±0.5 ^{bc}	9.0±3.1 ^c	5.4±1.3 ^{ab}	4.9±0.7 ^a	6.2±1.2 ^a	26.0±10.3 ^a	13.8±5.3 ^a
Trat	PFA (g)	PFR (g)	PFT (g)	PSA (g)	PSR (g)	PST (g)	
1	2.6±1.1 ^a	0±0 ^a	2.6±1.1 ^a	0.2±0.0 ^a	0±0 ^a	0.2±0.0 ^a	
2	2.8±3.1 ^a	0±0 ^a	2.8±3.1 ^a	0.2±0.1 ^a	0±0 ^a	0.2±0.1 ^a	
3	1.9±0.7 ^a	0.9±0.5 ^a	2.9±0.8 ^a	0.2±0.0 ^a	0.1±0.3 ^a	0.4±0.3 ^a	
4	3.4±3.4 ^a	1.0±0.5 ^a	4.4±4.0 ^a	0.2±0.2 ^a	0.06±0.02 ^a	0.3±0.2 ^a	
5	2.6±2.2 ^a	0.02±0 ^a	2.6±2.2 ^a	0.1±0.1 ^a	0±0 ^a	0.1±0.1 ^a	
6	3.2±1.1 ^a	0±0 ^a	3.2±1.1 ^a	0.2±0.0 ^a	0±0 ^a	0.2±0.0 ^a	
7	2.2±1.0 ^a	1.2±0.7 ^a	3.5±1.6 ^a	0.2±0.1 ^a	0.06±0.02 ^a	0.2±0.1 ^a	
8	1.8±0.9 ^a	0.9±0.3 ^a	2.8±0.8 ^a	0.1±0.0 ^a	0.04±0.01 ^a	0.2±0.0 ^a	

Trat: tratamiento, BF: brote final, NH: número de hojas, VOL: volumen, DBM: diámetro de brote mayor, LBM: longitud de brote mayor, AF: área foliar PFA: peso fresco aéreo, PFT: peso fresco total, PSA: peso seco aéreo, PST: peso seco total. Medias con letras iguales en cada columna y cada variable no son estadísticamente diferentes (Tukey, $P \leq 0.05$).



Figura 2. Características de cultivos de *Agave angustifolia*, que estuvieron en medio de cultivo con diferente citocinina: A) Desarrollo de varios brotes y sin raíces, en medios de cultivo BAP; B) Un brote que no formó nuevos brotes, pero desarrolló varias raíces en medio de cultivo 2i-P.

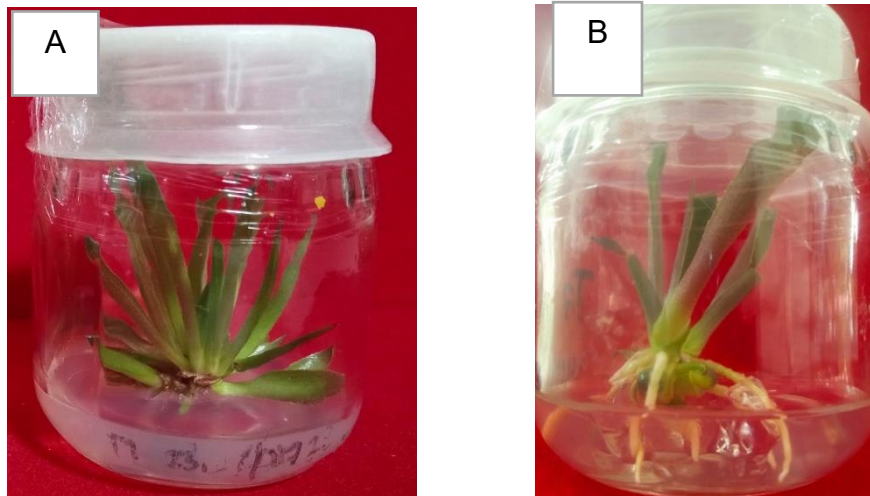


Figura 3. Características del medio de cultivo del tipo de gelificante con tipo de citocinina A) desarrollo de brotes en agar-agar, B) brotes con desarrollo de raíces en pytagel de *Agave angustifolia*.

4.4 Conclusiones

Tallos (explantos) de *Agave angustifolia* Haw. que se establecieron durante 60 días en los diversos medios de cultivo, que variaron en tipo y concentración de

citocinina, y tipo de gelificante, mostraron diferencias en la cantidad de nuevos brotes y de raíces, debido a los componentes de medio de cultivo, siendo que los tallos (explantos) establecidos en el medio de cultivo con 2 mg L⁻¹ de BAP formaron mayor cantidad de brotes nuevos, mientras que los tallos que se establecieron en medio de cultivo con la citocinina 2-isopenteniladenina (2i-P) formaron menor cantidad de nuevos brotes, pero si abundantes raíces. El tipo de gelificante no tuvo efecto en la formación de nuevos brotes, por lo que su uso podría seguir criterios de costos.

4.5 Referencias

- Abreu, E., González, G., Ortiz, R., Rodríguez, P., Domech, R., & Garriga, M. (2007). Evaluación de vitroplantas de henequén (*Agave fourcroydes* Lem) durante la fase de aclimatización. *Cultivos Tropicales*, 28 (1), 5-11.
- Aguilar, D., Rodríguez, J. & Herrera, H. (2018) Obtención de brotes *in vitro* en *Agave potatorum* Zucc. *Universo de la Tecnológica*. 2 (29), 5-7.
- Aguilar-Jiménez, D. & Rodríguez-De la O, J. L. (2018). Micropropagación y aclimatación de Maguey Pitzometl (*Agave marmorata* Roehl) en la Mixteca Poblana. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 20 (2), 124-131. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v20n2.77084>
- Arzate-Fernández, A.-M., y Mejía-Franco, R. (2011) Capacidad embriogénica de callos inducidos en ejes embrionarios cigóticos de *Agave angustifolia* Haw. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 34 (2): 101–106.
- Arzate-Fernández, A M., Piña-Escutia, J L., Norman-Mondragón, T H., Reyes-Díaz, J I., Guevara-Suárez, K L., & Vázquez-García, L M. (2016). Regeneración de agave mezcalero (*Agave angustifolia* HAW.) a partir de embriones somáticos encapsulados. *Revista fitotecnia mexicana*, 39 (4), 359-366.

http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S018773802016000400359&lng=es&tlng=es.

- Ángeles-Espino, A., Sánchez-Mendoza, L., Dimas-Estrada, H. E., Ramírez-Alvarado, D., & Gómez-Leyva, J. (2018). Two auxins evaluation in the embryogenic callus induction *in vitro* plantlets of *Agave Tequiliana* Weber cultivar blue. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 21(2), 225–234.
- Ángeles-Espino A, Dimas-Estrada H.E, Ramírez-Alvarado D, Cruz-Rubio J. M, Palmeros-Suárez P. A, Gómez-Leyva J. F. (2020). Caracterización molecular de mutantes de *Agave tequilana* inducidas con radiación gamma Co60 y su efecto en la acumulación de fructooligosacáridos. *Acta Universitaria* 30, e2696. doi. <http://doi.org/10.15174.au.2020.2696>
- Bautista-Castellanos A. I., Enríquez-del Valle J. R, Velasco-Velasco V. A. y Rodríguez-Ortiz G. (2020). Enraizado y aclimatación de *Agave potatorum*. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios* 7 (3): e2618. Castañeda-Nava, J. J., Rodríguez-Domínguez, J. M., Camacho-Ruiz, R. M., Gallardo-Valdez, J., Villegas-García, E., & Gutiérrez-Mora, A. (2019). Morphological comparison among populations of *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck (*Asparagaceae*), a species used for mezcal production in Mexico. *Flora*, 255, 18-23. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2019.03.019>
- COMERCAM (Consejo Mexicano Regulador de la Calidad del Mezcal). 2022. Informe estadístico. https://comercam-dom.org.mx/wp-content/uploads/2022/06/INFORME-2022-_II_-SINTESIS.pdf
- Chávez-Ortiz, L. I., Morales-Domínguez, J. F., Rodríguez-Sahagún, A., & Pérez-Molphe-Balch, E. (2021). *In vitro* propagation of *Agave guiengola* Gentry using semisolid médium and temporary immer-sion bioreactors. *Phyton*, 90, 1003-1013. doi:<https://doi.org/10.32604/phyton.2021.01286>
- Cruz-García H., Enríquez-del Valle J.R, Velasco-Velasco V.A, Ruiz-Luna J, Campos Ángeles G.V, Aquino García D.E. (2013). Nutrimientos y carbohidratos en plantas de *Agave angustifolia* Haw. y *Agave karwinskii* Zucc. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 4(spe6), 1161-1173.
- Domínguez Rosales, MS, González Jiménez, MD, Rosales Gómez, C., Quiñones Valles, C., Delgadillo Díaz de León, S., Mireles Ordaz, SJ, & Pérez Molphe Balch, E. (2008). El cultivo *in vitro* como herramienta para el aprovechamiento, mejoramiento y conservación de especies del género agave. *Investigación y Ciencia*, 16 (41), 53-62.

- Domínguez-Rosales, M. S., Alpuche-Solís, Á. G., Vasco-Méndez, N. L., & Pérez-Molphe-Balch, E. (2008). Efecto de citocininas en la propagación *in vitro* de agaves mexicanos. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 31 (4), 317-317.
- Enríquez-del-Valle J. R., Carrillo-Castañeda G, Rodríguez-de-laO J. L. (2005) Sales inorgánicas y ácido indolbutírico en el enraizado in vitro de brotes de *Agave angustifolia*. *Rev. Fitotec. Mex.* 28 (2): 175 – 178.
- Enríquez-del Valle, J.R. (2008). La Propagación y crecimiento de agaves. Fundación Produce Oaxaca A.C.- Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca.
- Enríquez V. J. R., Rodríguez-Ortiz G., Ruiz L J., Pacheco R A. J. y L. Vásquez V. (2018) Crecimiento y condición nutrimental de plantas micropropagadas de *Agave angustifolia* abonadas y fertirrigadas en vivero. *Revista Mexicana de Agroecosistemas* 5 (2) 106-115.
- Esparza-Ibarra, E. L., Violante-González, S. J.; Monks, J. C., Iñiguez, C.; Araujo-Andrade y Rossel-Kipping, E. D. (2015) Los agaves mezcaleros del Altiplano Potosino y Zacatecano. *Estudios en Biodiversidad.* 20 227-245.
- Garriga C. M., González O. G., Alemán G S., Abreu C. E., Quiroz B. K., Caligari P. D. S. and García-González R. (2010) Manejo de las interacciones auxina-citoquinina para mejorar el protocolo de micropropagación del henequén (*Agave fourcroydes* Lem.). *Revista chilena de investigaciones agrícolas* 70 (4) :545-551, <https://doi.org/10.4067/S0718-58392010000400003>
- Garnica-García R., Enríquez-del-Valle J. R., Rodríguez-Ortiz G., Pérez-León I., Trejo-Calzada R. and Morales I. (2020). Crecimiento Vegetal y Brotes de Rizoma de *Agave Angustifolia* en Diferentes Sustratos, con Fertirrigación y Bencilaminopurina. *Revista de Alimentación y Agricultura de los Emiratos*, 32, (10), 702-710, <https://doi.org/10.9755/ejfa.2020.v32.i10.2141>
- Groenewald, E. G., Wessels, D. C. J., Koeleman. (1977). A. Callus formation and subsequent plant regeneration from seed tissue of an *Agave* species (*Agavaceae*). *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* 81 (4) 369-373. [https://doi.org/10.1016/S0044-328X\(77\)80105-0](https://doi.org/10.1016/S0044-328X(77)80105-0).

- López-Romero, J.C., Ayala-Zavala, J.F., González-Aguilar, G.A., Peña-Ramos, E.A., & González-Ríos, H. (2018). Biological activities of agave by-products and their possible applications in food and pharmaceuticals. *Journal of the science of food and agriculture*, 98 (7). 2461–2474. <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.8738>.
- López-Escamilla, A. L., López-Herrera, M., & Loaiza-Alanís, C. (2016). Efecto de diferentes agentes gelificantes en la germinación y desarrollo *in vitro* de plántulas de *Echinocactus platyacanthus* link et otto (*cactaceae*). *Polibotánica*, (42), 153-166. <https://doi.org/10.18387/polibotanica.42.8>
- Lebedev, V., M. Arkaev., M. Dremova., I. Pozdniakov and K. Shestibratov. 2018. Effects of growth regulators and gelling agents on *ex vitro* rooting of raspberry. *Plants*, 8 (1), 3. doi:10.3390/plants8010003.
- Malavert, C., & Gonzales, G. (2018). Efecto de la Sustitución de un Hidrolizado Enzimático de Levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) como Medio de Cultivo para la Propagación *In vitro* de Henequén (*Agave fourcroydes* Lem.). *Ceiba*, 55 (1), 38-44. <https://doi.org/10.5377/ceiba.v55i1.3559>
- Miguel-Luna M.E., Enríquez-del Valle, J. R., Velasco-Velasco, V. A., Villegas-Aparicio, Y., Carrillo-Rodríguez, J. C., Rodríguez-Ortiz, G. (2013). Composición del medio de cultivo y la incubación para enraizar brotes de Agave. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 6, 1151-1159.
- Miguel-Luna M. E., Enríquez-del Valle, J. R; Velasco-Velasco, V. A; Villegas-Aparicio, Y; Carrillo-Rodríguez, J. C. (2014). Concentración de benciladenina, tipo y dosis de carbohidratos en el medio de cultivo para proliferación de brotes de Agave Americana. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias*, 46 (1), 97-107
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15 (3), 473-497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Nobel, P.S. (1994). Remarkable agaves and cacti. Oxford University Press.
- Olvera-Vargas, L. A., Pardo-Núñez, J., Aguilar-Rivera, N., Contreras-Medina, D. I. (2022). Detección de *Agave angustifolia* y *Agave cupreata* con técnicas geomáticas en Guerrero, México. *Ciencia Y Tecnología Agropecuaria*, 23 (2),

- Pérez Hernández, E., Chávez Parga, M., & González Hernández, J. C. (2016). Revisión del agave y el mezcal. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 18(1), 148-164. DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v18n1.49552.
- Puente-Garza C.A, Gutiérrez-Mora A. and García-Lara S (2015) Micropropagation of *Agave salmiana*: Means to Production of Antioxidant and Bioactive Principles. *Front. Plant Sci.* 6 (1026). doi: 10.3389/fpls.2015.01026
- Ríos-Ramírez, S. C., Enríquez-del Valle, J. R., Rodríguez-Ortiz, G., & Ruíz-Luna, J. (2017). Concentraciones de bencilaminopurina y ácido indol-3-acético en la proliferación *in vitro* de brotes adventicios de *Agave angustifolia*. *Ciencia e investigación agraria*, 44 (3), 285-294. <https://dx.doi.org/10.7764/rcia.v44i3.1810>
- Institute SAS. (2019). Base SAS 9.4 procedures guide:statistical procedures
- SIAP. (2023). Base de datos del Servicio de Información Agroalimentario y Pesquero (SIAP). México. <https://www.gob.mx/siap/documentos/siacon-ng-161430>.
- Vázquez-Martínez, O., Núñez-Palenius, H. G., Pérez-Molphe Balch, E. M., Valencia-Posadas, M., Pérez-Moreno, L., Ruiz-Aguilar, G. M., & Gómez-Lim, M. (2022). *In vitro*-propagation of *Agave tequilana* Weber cv. azul in a temporary immersion system. *Phyton International Journal of Experimental Botany* 91 (1), DOI: 10.32604/phyton.2022.017281
- Veitía N., Collado, R., García, L.R., Bermúdez-Caraballosa, I., Torres, D., & Romero C. (2012). Influencia del agente gelificante en la regeneración de plantas de *Phaseolus vulgaris* L. a partir de callos organogénicos. *Biotecnología Vegetal* 12 (3): 143 – 148.

CAPITULO V

CONCLUSIONES GENERALES

La aplicación de antimicrobianos en etapa 0, ayudó para que del 4 a 9 % de tejidos somáticos obtenidos de plantas en vivero, se establecieran cultivos asépticos en etapa I y la edad del tejido influyó en la morfogénesis en esta etapa I. Los tejidos asépticos de la etapa II el 90 % se mantuvieron asépticos cuando se transfirieron a medio de cultivo nuevo. De los tejidos contaminados (10%) de la etapa II, en el 52% de éstos fue posible excluir bacterias, al establecerlos en medio de cultivo con la dosis adecuada de antimicrobianos, permitiendo cultivos asépticos y con proliferación de brotes.

El uso de citocininas en el medio de cultivo durante la etapa II de multiplicación de propágulos ayudó a superar condiciones en proliferación de brotes y raíces, donde se observaron efectos diferentes entre las citocininas BAP y 2i-P. Los tallos que se establecieron en medio de cultivo con 2 mg L⁻¹ de BAP y agar-agar formaron cantidad mayor de brotes nuevos, número de hojas y pocas raíces. Los tallos que se establecieron en medio de cultivo con 4 mg L⁻¹ de 2i-P formaron menor cantidad de brotes nuevos, pero formaron en promedio 6.4 raíces primarias.

CAPITULO VI

RECOMENDACIONES

- Realizar una selección de planta madre con características deseables de la que se quiera obtener planta en cultivo *in vitro* con cuidados en etapa 0.
- Realizar aplicaciones preventivas de insecticidas, fungicidas y bacterias de amplio espectro para evitar posibles fuentes de contaminación.
- Evitar sustratos que no tengan buen drenaje de agua, así mismo buena porosidad y la aplicación de preventivos en drench.
- Contar con buenas instalaciones, protocolos sanitarios en invernadero y laboratorio.
- Tener precaución con las temperaturas altas dentro del laboratorio.
- Realizar mediciones de pH en las soluciones Steiner para que la planta aproveche los nutrientes necesarios.

CAPÍTULO VII

REFERENCIAS

- Aguilar-Jiménez D, Rodríguez-de la O J.L. (2018) Micropropagación y aclimatación de Maguey Pitzometl (*Agave marmorata* Roezl) en la Mixteca Poblana. *Revista Colombiana Biotecnología* XX (2) 124-131. DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v20n2.77084
- Aguilera-Arango, G. A., Puentes-Díaz, C.L., & Rodríguez-Henao, E. (2021). Métodos de desinfección para el establecimiento *in vitro* de dos variedades de yuca para uso agroindustrial. *Revista de Investigación e Innovación Agropecuaria y de Recursos Naturales*, 8(3), 21-30.
- Alfonso-León, C. (2014). El maguey y sus partes. *Arqueología Mexicana*, 57 56.
- Alvarado-Capó, Y., Portal-González N., Acosta-Suárez M., Cruz-Martín M., Pérez B. (2006) Empleo de Sulfato de gentamicina para el control de *Pantoea agglomerans*, contaminante de la multiplicación *in vitro* de *Solanum tuberosum* L cv. Desirée. *Biotecnología Vegetal*. 6 (4) 207 – 21
- Álvarez-Aragón C., Arzate-Fernández A. M, Martínez-Martínez S. Y. e Martínez-Velasco I. (2020) Regeneración de plantas de *Agave marmorata* Roezl vía embriogénesis somática. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 23:36.
- Amaro, M. R., y Muñoz, M. T. (2018). Cultivo *in vitro*: alternativa al cultivo tradicional de plantas medicinales. Universidad Complutense, Facultad de Farmacia, Madrid.

- Arzate-Fernández, A., M. Piña-Escutia, J.L. Norman-Mondragón, T.H. Reyes-Díaz, J.I. Guevara-Suárez, K.L. y L.M. Vázquez-García. (2016). Regeneración de agave mezcalero (*Agave angustifolia* Haw.) a partir de embriones somáticos encapsulados. *Revista Fitotecnia Mexicana* 39(4): 359-366.
- Arzate-Fernández A.M., Martínez-Velasco I., Alvarez-Aragón C., Martínez-Martínez S.Y. and Norman-Mondragón T.H. (2020) Respuesta morfogénica de dos especies de agave regeneradas *in vitro*. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 23 1-17.
- Bello-Bello J.J., Spinoso-Castillo J. L. 2023. Utilización de nanopartículas de plata en la micropropagación de plantas. Mundo nano. Revista interdisciplinaria en nanociencias y nanotecnología, 16(30), e00063. Epub 14 de agosto de 2023. <https://doi.org/10.22201/ceiich.24485691e.2023.30.69692>
- Blanco-Valdés, Y. 2019. Importancia de la calidad de la luz entre las plantas arvenses-cultivo. *Cultivos Tropicales*. 40(4):e09.
- Borges-García, M., Estrada-Abeal, E., Pérez-Rodríguez, I., y Meneses-Rodríguez, S. (2009) Uso de distintos tratamientos de desinfección en el cultivo *in vitro* de *Dioscorea alata* L. clon caraqueño. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 11.(2) 127-135.
- Casanova-Alvino, FE; Domínguez-Torrejón, G; Tapia- Figueroa, ML. (2019) Determinación de medios de cultivo para el establecimiento *in vitro* de bambú (*Guadua weberbaueri*) *Anales Científicos* 80(1): 150-159.
- Castañeda-Nava, J. J., Rodríguez-Domínguez, J. M., Camacho-Ruiz, R. M., Gallardo-Valdez, J., Villegas-García, E., & Gutiérrez-Mora, A. 2019. Morphological comparison among populations of *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck (Asparagaceae), a species used for mezcal production in Mexico. *Flora*, 255, 18-23. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2019.03.019>
- Chávez-Ortiz, LI, Morales-Domínguez, JF, Rodríguez-Sahagún, A., Pérez-Molphe-Balch, E. (2021). Propagación *in vitro* de *Agave guiengola* Gentry utilizando medio semisólido y biorreactores de inmersión temporal. *Phyton-Revista Internacional de Botánica Experimental*, 90 (3), 1003-1013. <https://doi.org/10.32604/phyton.2021.012862>
- Cruz, M., García, Y., Sánchez, C., Alvarado, Y., Acosta, M., Roque, B., Leiva, M., & Freire, M. (2007) Identificación y control de *Bacillus* sp., contaminante

del establecimiento *in vitro* de *Guadua angustifolia* kunth. *Biotecnología Vegetal*. 7, 9-13.

Delgado-Aceves L., González-Arno M. T., Santacruz-Ruvalcaba, F., Folgado R. and Portillo L. (2021). Indirect somatic embryogenesis and cryopreservation of *Agave tequilana* Weber cultivar 'Chato'. *Plants* 10:249, <https://doi.org/10.3390/plants10020249>

Domínguez R. M. S., González J. M. L., Rosales G. C., Quiñones V. C., Delgadillo D. L. S. Mireles O S. J. y Pérez-Molphe B E. (2008^a). El cultivo *in vitro* como herramienta para el aprovechamiento, mejoramiento y conservación de especies del género *Agave*. *Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes* 16:53-62

Domínguez R. M. S. Alpuche S. Á. G., Vasco. N. L., Pérez M. B. E. (2008^b) Efecto de citocininas en la propagación *in vitro* de agaves mexicanos. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 31 (4) 317-322

Enríquez-del valle, J.R., Carrillo-Castañeda, G., Rodríguez de la O. L. (2005) Sales inorgánicas y ácido indolbutírico en el enraizado *in vitro* de brotes de *Agave angustifolia*. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 28. 175-178

Enríquez-del Valle J. R., Chávez-Cruz I.L., Rodríguez-Ortiz G. & Campos-Angeles G. V. (2023) Vitroplantas de *Agave angustifolia* Haw. obtenidas en ambientes de incubación contrastantes, aclimatadas en diferentes sustratos. *Rev. Fitotec. Mex.* 46 (3)

Esparza-Ibarra, E. L.; Violante-González, S. J.; Monks, J. C.; Iñiguez, C.; Araujo-Andrade y Rossel-Kipping, E. D. (2015) Los agaves mezcaleros del Altiplano Potosino y Zacatecano. *Estudios en Biodiversidad*. University of Nebraska-Lincoln. 227-245

Esqueda, M. y Vargas, G. (2007) Biotecnología aplicada en el aprovechamiento sostenible de agave. *Reconversión*. 9:10-13.

Esquivel A, Bonilla V. (2016) Establecimiento *in vitro* de (*Vaccinium consanguineum*), un arándano nativo de Costa Rica [Tesis]. Instituto Tecnológico de Costa Rica. 79 p. https://www.researchgate.net/publication/309474958_Establecimiento_in_vitro_de_Vaccinium_consanguineum_un_arandano_nativo_de_Costa_Rica.

- Flores-Morales, A., Chávez-Avila V. M., Jiménez-Estrada, M. (2021) Evaluación de una alternativa de propagación de maguey pulquero (*Agave salmiana*) variedad púa larga. *Revista Mexicana de Agroecosistemas*. 8 (1) 46-58.
- Garriga-Caraballo, M., González-Oramas, G., Alemán García, S., Abreu-Cruz, E., Quiroz Bravo, K., Caligari, P. D.S. & García-González, R. (2010) Manejo de las interacciones auxina-citoquinina para mejorar protocolo de micropropagación del henequen (*Agave fourcroydes* Lem.). *Chilean Journal of Agricultural Research* 70(4). 545-551
- Gollagi SG, Lokesha R, Dharmpal S, Sathish BR. (2019) Effects of growth regulators on growth, yield and quality of fruits crops: A review. *J Pharmacog phytochem*;8(4):979-81.
- Groenewald, E. G., Wessels, D. C. J., Koeleman, A. (1977) Callus formation and subsequent plant regeneration from seed tissue of an Agave species (Agavaceae). *Z Pflanzphysiol* 21 (4) 369-373.
- Kulus M (2014) Micropropagation of selected Agave species. En: Czubenko M (ed). *PhD Interdisciplinary Journal*, pp. 75-84. Politechnika Gdańska, Gdańsk; doi: 10.13140/2.1.1482.6565
- López-Romero, J.C., J.F. Ayala-Zavala, G.A. González-Aguilar, E.A. Peña-Ramos and H. González-Ríos (2018) Biological activities of agave by-products and their possible applications in food and pharmaceuticals. *J. Sci Food Agric* 98: 2461-2474. <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.8738>
- López, R. 2012. Efecto predesinfectante del oxiclورو de cobre sobre hongos contaminantes en segmentos nodales de *Guadua angustifolia* kunth, para su establecimiento *in vitro*. *Revista de Investigaciones – Universidad del Quindío*. 23,120-126.
- Martínez-Martínez S. Y., Arzate-Fernández, A. M., Alvarez-Aragón, C., Martínez-Velasco I., and Norman-Mondragón T. H. (2021) Regeneration of *Agave marmorata* roelz plants in temporary immersion systems, via organogenesis and somatic embryogenesis. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 24 (84) 1-13
- Miguel-Luna, M. E., Enríquez-del Valle, J. R., Velasco-Velasco, V. A., Villegas-Aparicio, Y., & Carrillo-Rodríguez, J. C. (2014). Concentración de benciladenina, tipo y dosis de carbohidratos en el medio de cultivo para proliferación de brotes de *Agave americana*. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias*, 46(1), 97-107.

- Mongelós-Franco Y., Mussi-Cataldi, C, Duarte-Ovejero, N. y Díaz-Lezcano M. (2020) Protocolo de desinfección para establecimiento *in vitro* de meristema apical de banano *Musa* spp. *Revista del Centro de Estudio y Desarrollo de la Amazonia*, 10 (2) 47–50.
- Monja-Mio K. M. and M. L. Robert. 2013. Direct somatic embryogenesis of *Agave fourcroydes* Lem. through thin cell layer culture. *In Vitro Cellular and Developmental Biology– Plant* 49:541-549, <https://doi.org/10.1007/s11627-013-9535-7>
- 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). *Verano de la Investigación Científica*. 2 (1). 1429-1433.
- Oblitas, W. 2019. “Micropropagación in vitro de *Guadua angustifolia* kunth en Jaén, Cajamarca”. [Tesis para título, Universidad Nacional de Cajamarca].
- Pérez-Álvarez, S., Leyva-López N. E., Magallanes-Tapia M. A., Arce Leal A. P. y Méndez Guerrero, A. (2016). Hongos contaminantes en el establecimiento *In Vitro* de ápices de papa. *Cultivos Tropicales*. 37 (4) 84-88. DOI: 10.13140/RG.2.2.26063.69284
- Portillo, L., Santacruz-Ruvalcaba, F. (2007), Factibilidad de uso de un nuevo sistema de inmersión temporal (orbitabion®) para embriogénesis somática de *Agave tequilana* weber cultivar azul *In Vitro Cell. Dev. Biol.Plant*. 43. 569–575. DOI:10.1007/s11627-007-9046-5.
- Puente-Garza, C. A., Gutiérrez-Mora, A., García-Lara, S. (2015). Micropropagación de *Agave salmiana*: Medios para producción de principios antioxidantes y bioactivos. *Fronteras en la ciencia vegetal* 6 1–9. DOI 10.3389/ fpls.2015.01026.
- Ramírez-Malagón, R., A. Borodanenko, L. Pérez-Moreno, M. D. Salas-Araiza, H. G. Nulez-Planius y N. Ochoa-Alejo. 2008. *In vitro* propagation of three *Agave* species used for liquor distillation and three for landscape. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 94:201-207.
- Reyes-Silva A. I., Gordon Nuñez-Palenius H., Ocampo G. y Pérez-Molphe-Balch E. 2022. REGENERACIÓN in vitro DE *Agave wocomahi* GENTRY (ASPARAGACEAE). *Rev. Fitotec. Mex.* 45 (4): 493 – 501p. DOI: <https://doi.org/10.35196/rfm.2022.4.493>

- Ríos-Ramírez, S. C., Enríquez-del Valle, J. R., Rodríguez-Ortiz, G., & Ruíz-Luna, J. (2017). Concentraciones de bencilaminopurina y ácido indol-3-acético en la proliferación *in vitro* de brotes adventicios de *Agave angustifolia*. *Ciencia e investigación agraria*, 44 (3), 285-294
- Rodríguez-Beraud M. M, Latsague-Vidal, M. I, Chacón-Fuentes M. A, Astorga-Brevis P. K (2014) Inducción *in vitro* de callogénesis y organogénesis indirecta a partir de explantes de cotiledón, hipocótilo y hoja en *Ugni molinae*. *BOSQUE* 35(1): 111-118
- Rueda-Sánchez, A., J. de D. Benavides-Solorio, J.T. Saenz-Reyez, H.J., Muñoz-Flores, J.A. Prieto-Ruiz y G. Orozco-Gutiérrez. 2013. Calidad de planta producida en los viveros forestales de Nayarit. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*. 5(22):58–73.
- Sabale SN, Patil DM, Gokhale NB, Sawardekar SV, Sawant SS (2015) Elimination of bacterial contamination by using antibiotics in micropropagation of banana (*Musa spp.*) cv. Grand naine *Journal of Cell and Tissue Research* 15(2): 5111-5115
- Sánchez, A., Coronel-Lara Z., Gutiérrez A., Vargas G., Coronado M. L., Esqueda M., 2020. Aclimatación y trasplante de vitroplantas de *Agave angustifolia* Haw. en condiciones silvestres. *Revista Mexicana Ciencias Agrícolas*. 11 (7). 1593-1605.
- Santacruz-Ruvalcaba, F., Castañeda-Nava, J. J., Villanueva-González, J. P., García-Sahagún, M. L., Portillo, L., & Contreras-Pacheco, M. L. (2022). Micropropagación de *Agave maximiliana* Baker por proliferación de yemas axilares. *Polibotánica*, (54), 139-151. <https://doi.org/10.18387/polibotanica.54.9>
- Urías-García C., Pérez-Álvarez S., Escobedo-Bonilla C. M., González-Vega M. E., Flores-Córdoba M. A., Guerrero-Morales S., Palacios-Monarez A. (2023) Micropropagación de *Vachellia spp.* como una alternativa para la reforestación de zonas desérticas en México. *Cultivos Tropicales*. 44, 2. Cu-ID: <https://cu-id.com/2050/v44n2e10>.
- Vázquez-Martínez, O., Núñez-Palenius H.G., Pérez-Molphe Balch, E. M., Valencia-Posadas M., Pérez-Moreno, L., Ruiz-Aguilar, G. M. L y Gómez-Li M. (2022) *In Vitro*-Propagation of *Agave tequilana* Weber cv. azul in a Temporary Immersion System. *Phyton-International Journal of Experimental Botany*. 91 (1). 83-96.