

Polibotánica

ISSN electrónico: 2395-9525

polibotanica@gmail.com

Instituto Politécnico Nacional

México

<http://www.polibotanica.mx>

MICROPROPAGACIÓN DE *Agave maximiliana* Baker POR PROLIFERACIÓN DE YEMAS AXILARES

MICROPROPAGATION OF *Agave maximiliana* Baker BY AXILLARY SHOOT PROLIFERATION

Santacruz-Ruvalcaba, F.; J. J. Castañeda-Nava; J. P. Villanueva-Gómez; M. L. García-Sahagún; L. Portillo y M. L. Contreras-Pacheco.

MICROPROPAGACIÓN DE *Agave maximiliana* Baker POR PROLIFERACIÓN DE YEMAS AXILARES.

MICROPROPAGATION OF *Agave maximiliana* Baker BY AXILLARY SHOOT PROLIFERATION.



MICROPROPAGACIÓN DE *Agave maximiliana* Baker POR PROLIFERACIÓN DE YEMAS AXILARES.

MICROPROPAGATION OF *Agave maximiliana* Baker BY AXILLARY SHOOT PROLIFERATION.

Santacruz-Ruvalcaba, F.;
 J. J. Castañeda-Nava;
 J. P. Villanueva-Gómez;
 M. L. García-Sahagún;
 L. Portillo
 y M. L. Contreras-Pacheco.

**MICROPROPAGACIÓN DE
Agave maximiliana Baker POR
 PROLIFERACIÓN DE
 YEMAS AXILARES.**

**MICROPROPAGATION OF
Agave maximiliana Baker BY
 AXILLARY SHOOT
 PROLIFERATION.**

POLIBOTÁNICA
 Instituto Politécnico Nacional

Núm. 54: 139-151. Julio 2022

DOI:
 10.18387/polibotanica.54.9

F. Santacruz-Ruvalcaba / srf22191@cucba.udg.mx

*Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias,
 Universidad de Guadalajara, Ramón Padilla Sánchez No. 2100,
 Predio Las Agujas C.P. 45110, Zapopan, Jalisco, México.*

J. J. Castañeda-Nava

*Unidad de Biotecnología Vegetal, Centro de Investigación y Asistencia en
 Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, Camino Arenero 1227,
 El Bajío, 45019 Zapopan, Jal., México.*

J. P. Villanueva-Gómez

M. L. García-Sahagún

L. Portillo

M. L. Contreras-Pacheco

*Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias,
 Universidad de Guadalajara, Ramón Padilla Sánchez No. 2100,
 Predio Las Agujas C.P. 45110, Zapopan, Jalisco, México.*

RESUMEN: México es el centro de mayor riqueza y domesticación de especies de *Agave*, 20 de las cuales se usan como fuente para elaborar bebidas fermentadas y destiladas, entre ellas *Agave maximiliana* Baker, que se recolecta en el campo justo antes de su etapa de reproducción sexual (12-14 años) para elaborar el mezcal raicilla, la sobreexplotación ha originado la constante disminución de sus poblaciones silvestres. El objetivo del presente estudio fue desarrollar un protocolo de micropropagación masiva *in vitro* de esta especie, mediante la proliferación de sus yemas axilares. Para la inducción de las yemas axilares se utilizó un diseño experimental de tres factores: 1) la auxina ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) en cuatro dosis: 0, 0.01, 0.02 y 0.03 mg L⁻¹; 2) la citocinina 6-benciladenina (BA) en dosis de 0, 4, 8 y 12 mg L⁻¹, y 3) dos genotipos G1 y G6. La dosis de 12 mg L⁻¹ de BA en combinación con 0.02 mg L⁻¹ de 2,4-D, produjo 26.93 nuevos brotes ($p = 0.000$) con calidad en su morfología típica, característica necesaria para su separación y posterior establecimiento *ex vitro*. Asimismo, para la mejor producción de raíces largas, ramificadas y no efímeras en dichos brotes, se evaluaron *in vitro*, bajo un arreglo bifactorial, tres genotipos (G1, G3 y G6) y cinco tratamientos de enraizamiento (diferentes concentraciones de sacarosa, carbón activado y/o ácido indol-3-butírico). El análisis de resultados muestra la necesidad de adicionar 9% de sacarosa ($p = 0.000$), cantidad mayor al 3 % utilizado comúnmente. Además, la mejor adaptación *ex vitro* está relacionada con el genotipo de la planta original y hubo diferencias significativas para el ancho ($p = 0.023$) y longitud de la hoja ($p = 0.009$).

Palabras clave: propagación *in vitro*, mezcal raicilla, reguladores de crecimiento, maguey, establecimiento *ex vitro*.

ABSTRACT: Mexico is the center of the largest riches and domestication of *Agave* species; 20 of these are used as a source for the production of fermented and distilled spirits, including *Agave maximiliana* Baker, which is harvested in the field just before its sexual reproductive stage (12 to 14 years) to make raicilla mescal, with the

consequent constant overexploitation of its wild populations. The objective of this study was to develop a protocol for *in vitro* mass micropropagation of this species through auxiliary shoot proliferation. Axillary shoots were induced using a three-factor experimental design, consisting of the following factors: 1) auxin 2,4-dichlorophenoxyacetic (2,4-D) in four different doses: 0, 0.01, 0.02, and 0.03 mg L⁻¹; 2) cytokinin, 6-benzyladenine (BA) in doses of 0, 4, 8, and 12 mg L⁻¹, and 3) two G1 and G6 genotypes. The dose of 12 mg L⁻¹ BA in combination with 0.02 mg L⁻¹ 2,4-D produced 26.93 new shoots ($p = 0.000$) with a high-quality typical morphology, an essential characteristic for their separation and subsequent *ex vitro* establishment. Likewise, in order to attain the best production of long, branched, nonephemeral roots from these shoots, three genotypes (G1, G3, and G6) and three rooting treatments (with different concentrations of sucrose, activated charcoal, and/or indole-3-butyric acid) were assessed *in vitro*. The analysis of the results shows a need to add 9% sucrose ($p=0.000$), i.e. 3% more than the usual amount. Furthermore, the best *ex vitro* adaptation was found to be related to the genotype of the original plant, and there were significant differences in the width ($p=0.023$) and length ($p=0.009$) of the leaves.

Key words: *in vitro* propagation, raicilla mescal, growth regulators, maguey, *ex vitro* establishment.

INTRODUCCIÓN

El género *Agave* es endémico de América, se distribuye desde el sur de EE.UU. hasta Colombia y Venezuela, incluyendo las islas del Caribe (García-Mendoza, 2007) y está constituido por 210 especies y cerca del 75 % las encontramos en México (García-Mendoza *et al.*, 2019). México no es sólo el centro de mayor riqueza de especies de *Agave*, sino también su centro de domesticación (Gentry, 1976). La historia de diversificación de la planta, bajo cultivo y selección humana inició hace por lo menos 9,000 años y desde entonces, los agaves se han utilizado como bebida, alimento, vestido, material para escritura y herramienta (Arellanes *et al.*, 1997; Bellon *et al.*, 2009; Trejo *et al.*, 2018; Pérez-Zavala *et al.*, 2020). En México hay registro de 53 especies del género *Agave* empleadas en la elaboración de bebidas fermentadas y destiladas-mezcales (Torres *et al.*, 2015), y 12 de ellas son las más importantes, por el manejo que se lleva a cabo: *A. tequilana* Weber, *A. angustifolia* Haw., *A. karwinski* Zucc., *A. marmorata* Roezl, *A. potatorum* Zucc., *A. americana* L. var. *oaxacensis* Gentry, *A. cupreata* Trel. y Berger, *A. rhodacantha* Trel., *A. salmiana* Otto ssp *crassispina* (Trel.) Gentry, *A. wocomahi* Gentry, *A. durangensis* Gentry y *A. maximiliana* Baker (García-Mendoza, 1998; Colunga-GarcíaMarín *et al.*, 2017).

Estas especies se propagan en su mayoría de forma asexual a partir de hijuelos (brotes de rizoma) y ocasionalmente por bulbillos (brotes en el escapo floral), lo que da como resultado la formación de clones con características deseables, pero esto también facilita la formación de plantas susceptibles a enfermedades (Valenzuela-Sánchez *et al.*, 2006). Su propagación a partir de semilla requiere de largos períodos para la generación de una nueva planta, además la madurez sexual en algunas especies, como en *A. tequilana*, se alcanza luego de 6 a 10 años (Robert *et al.*, 1992; García-Mendoza, 2007) y de 12 a 14 años en *A. maximiliana*.

A. maximiliana crece comúnmente en las laderas de las montañas rocosas de los estados de Sinaloa, Durango, Zacatecas, Nayarit, Jalisco y Colima, cuya altitud va de 930 a 2,000 m en bosques de pino y encino (Eggli, 2001). Se le conoce como maguey tecolote o lechuguilla, y se emplea principalmente en la elaboración de bebidas fermentadas y mezcales en la sierra de Jalmich (zona limítrofe entre Jalisco y Michoacán), así como para un mezcal conocido regionalmente como raicilla, producido en el occidente del estado de Jalisco, en las montañas de Talpa, Mascota y San Sebastián del Oeste (Colunga-GarcíaMarín *et al.*, 2007; Vázquez-García *et al.*, 2007; Cabrera-Toledo *et al.*, 2020). Asimismo, *A. inaequidens* Koch, *A. valenciana* Cházaro & A. Vázquez, *A. angustifolia* Haw. y *A. rodacantha* Trel., también se utilizan para la elaboración de esta bebida de acuerdo a la Denominación de Origen “Raicilla”

(Diario Oficial de la Federación, 2019). Debido a que las plantas adultas de *A. maximiliana* se eligen para elaborar la raicilla justo antes de producir semillas, y aunado a que la especie no produce hijuelos ni bulbillos, está sujeta a una constante sobreexplotación de sus poblaciones naturales. Por lo tanto, urge implementar sistemas de multiplicación masiva de esta especie para que faciliten su incipiente cultivo intensivo de una manera sostenible. El cultivo de tejidos vegetales ofrece herramientas biotecnológicas para producir miles o millones de plantas, a partir incluso de una sola planta madre.

Hay varias investigaciones acerca del cultivo de tejidos de diferentes especies de *Agave* (Robert *et al.*, 2006): *A. americana* (Chen *et al.*, 2014; Naziri *et al.*, 2018; Cruz-García *et al.*, 2019), *A. angustifolia* (Monja-Mio *et al.*, 2015; Arzate-Fernández *et al.*, 2016; Reyes-Díaz *et al.*, 2017; Ríos-Ramírez *et al.*, 2017; Sánchez *et al.*, 2020; Monja-Mio *et al.*, 2021), *A. cantala* Roxburgh y *A. fourcroydes* Lem. (Binh *et al.*, 1990; Monja-Mio & Robert, 2013), *A. inaequidens* (Aureoles-Rodríguez *et al.*, 2008), *A. marmorata* (Aguilar-Jimenez & Rodriguez, 2018; Arzate-Fernández *et al.*, 2020), *A. salmiana* (Puente-Garza *et al.*, 2015, 2017; Arzate-Fernández *et al.*, 2020) *A. sisalana* Perrine (Binh *et al.*, 1990; Hazra *et al.*, 2002; Carneiro *et al.*, 2014; Nikam *et al.*, 2019), *A. tequilana* (Santamaría *et al.*, 1995; Valenzuela-Sánchez *et al.*, 2006; Portillo *et al.*, 2007; Santacruz-Ruvalcaba & Portillo, 2009; Portillo *et al.*, 2012; Delgado-Aceves *et al.*, 2021), *A. victoria-reginae* Moore (Rodríguez-Garay *et al.*, 1996; Martínez-Palacios *et al.*, 2003; Ramírez-Malagón *et al.*, 2008) sin existir protocolos de propagación *in vitro* para *A. maximiliana* reportados a la fecha. Los procedimientos de micropropagación incluyen: la proliferación de yemas axilares, la organogénesis y la embriogénesis asexual (embriogénesis somática), los cuales son una herramienta potente en la obtención de plantas libres de patógenos, propagación masiva, rescate de embriones, clonación y mantenimiento de materiales selectos (Martínez-Palacios *et al.*, 2003; Domínguez *et al.*, 2008; Barreto *et al.*, 2010).

Ya que la producción de mezcales en México es históricamente trascendental, de manera principal en aquellas comunidades para las cuales es una importante fuente de ingresos (Chávez-Guerrero *et al.*, 2010; Trejo *et al.*, 2018; Cabrera-Toledo *et al.*, 2020), se justifica implementar un protocolo de micropropagación para *A. maximiliana*, pues será una alternativa para la generación de un gran número de plantas de una manera más rápida (respecto a su propagación por semillas) y para facilitar la producción de materiales vegetales deseados por características seleccionadas, como la robustez, la precocidad, la sanidad, etc. En consecuencia, el objetivo del presente estudio fue desarrollar un protocolo eficiente de micropropagación masiva *in vitro* de *A. maximiliana* mediante proliferación de yemas axilares.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Plantas de *Agave maximiliana* de aproximadamente 25 cm de altura (equivalentes a un año de edad) se recolectaron en el predio El Llano Colorado ubicado en el municipio de La Manzanilla de la Paz, Jalisco, México ($19^{\circ} 59' 59.9''$ N y $103^{\circ} 03' 00.9''$ O) (Fig. 1A). Las plantas se originaron a partir de la germinación de semillas de plantas silvestres de esta especie en la zona de recolección, por lo que cada planta se consideró como genotipo independiente (Fig. 1A). La experimentación se desarrolló en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Departamento de Producción Agrícola del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Guadalajara. El material vegetal se identificó y se conservó a temperatura ambiente durante 24 h antes de comenzar su manipulación para el cultivo *in vitro*.

Para obtener los explantes en el establecimiento *in vitro*, se eliminaron las hojas de plantas recolectadas de 15 a 20 cm de altura, hasta dejar sólo la que envolvía al meristemo apical, el material vegetal resultante fue lavado con detergente líquido Salvo®, en concentración de 1 mL L⁻¹, después de lo cual se realizaron dos enjuagues en agua corriente. El material fue desinfectado en inmersiones con etanol al 96% durante 1 min, y posteriormente en una solución

de hipoclorito de sodio comercial al 3% por 10 min, finalmente se hicieron tres enjuagues de 1 min cada uno con agua destilada estéril.



Fig. 1. Micropropagación de *Agave maximiliana*. A) hábitat de *A. maximiliana* de donde se tomaron las muestras, B) proliferación de yemas axilares con 12 mg L^{-1} de BA + 0.02 mg L^{-1} de 2,4-D, C) proliferación de yemas axilares con 8 mg L^{-1} de BA + 0.02 mg L^{-1} de 2,4-D, D) raíces cortas amarillentas con vellosidades estimuladas con 5 mg L^{-1} de ácido indol-3-butírico, E) raíces largas lisas con pocas vellosidades estimuladas con 90 g L^{-1} de sacarosa, F) tres genotipos de *A. maximiliana* (G1, G3 y G6) en el área de adaptación en invernadero. Barra = 1 cm.

Una vez desinfectados los explantes, para su establecimiento e inducción de yemas axilares en condiciones *in vitro*, se trasfirieron a frascos de vidrio de alimento infantil Gerber® con tapa plástica autoclavable no hermética, con 25 mL de medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) que contenía 0.025 mg L⁻¹ de ácido 2,4-diclorofenoxyacético (2,4-D), 10 mg L⁻¹ de 6-benciladenina (BA) y 30 g L⁻¹ de sacarosa. El pH del medio se ajustó a 5.8 ± 0.05 y se utilizaron 8 g L⁻¹ de agar (SIGMA No. Cat: A-1296) como agente gelificante. El medio de cultivo se esterilizó en autoclave a 121 °C y 1.27 kg cm⁻² durante 15 min. Los cultivos se incubaron a 27 ± 2 °C, con un fotoperíodo de 16 h luz y 8 h de oscuridad con una intensidad lumínica de 25 µmol m⁻² s⁻¹. El material vegetal necesario para realizar los experimentos se obtuvo después de 60 días de cultivo en el medio mencionado.

Estimulación de brotes a partir de yemas axilares

En un medio MS suplementado con 30 g de sacarosa y gelificado con 8 g L⁻¹ de agar, se evaluó el efecto de dos reguladores de crecimiento y la aptitud de dos genotipos de *A. maximiliana* (G1 y G6) para inducir la brotación a partir de yemas axilares. El diseño experimental tuvo tres factores: 1) auxina (2,4-D) 0, 0.01, 0.02 y 0.03 mg L⁻¹; 2) la citocinina (BA) 0, 4, 8 y 12 mg L⁻¹; 3) los genotipos G1 y G6. Las repeticiones empleadas fueron diez para el G1 y seis para G6. La unidad experimental fue un frasco de vidrio con un brote de alrededor de 4 cm de longitud con presencia de tres hojas; cada frasco contenía 25 mL del medio de cultivo. Las condiciones de incubación empleadas fueron las mismas ya citadas. La variable de respuesta fue el número de brotes obtenidos por planta a los 45 d de establecido el experimento.

Enraizamiento *in vitro*

Para la formación de raíces a partir de los brotes inducidos *in vitro*, se evaluaron tres genotipos: G1, G3 y G6 en combinación con cinco medios de cultivo: M1- medio MS + 30 g L⁻¹ de sacarosa; M2- medio MS + 30 g L⁻¹ de sacarosa + 2 g L⁻¹ de carbón activado; M3- medio MS + 90 g L⁻¹ de sacarosa; M4- medio MS + 90 g L⁻¹ de sacarosa + 2 g L⁻¹ de carbón activado; M5- medio MS + 30 g L⁻¹ de sacarosa + 5 mg L⁻¹ de la auxina ácido indol-3-butírico (AIB). La unidad experimental con su respectivo medio de cultivo, así como su incubación, fue similar al experimento previo. El diseño experimental tuvo un arreglo bifactorial con nueve repeticiones por tratamiento. Las variables de respuesta fueron el número de raíces formadas por planta, la longitud (medición con una regla) y ramificación de las mismas (número de raíces secundarias ramificadas a partir de la raíz principal), a los 50 d de establecido el experimento.

Adaptación de plantas en invernadero

Una vez enraizadas las plantas *in vitro* con una altura de 4 a 7 cm y teniendo entre cuatro y seis hojas, fueron extraídas de los frascos, se les eliminó por completo el residuo de agar con remojar en agua corriente a 30 °C de temperatura, para después ser sumergidas en una solución de 1 g L⁻¹ del fungicida Captan® (N-triclorometiltio-4-ciclohexeno-1,2-dicarboximida, 500 g kg⁻¹ de producto). La parte radicular de la planta fue impregnada con enraizador en polvo Radix® (10,000 ppm de ácido indol-3-butírico). Para entonces ser establecidas en macetas plásticas cuadradas de 2.5 in³ de capacidad, las cuales contenían como sustrato una mezcla de turba de musgo (70%) y arena (30%); esterilizado con calor húmedo en autoclave a 121 °C, 1.27 Kg cm⁻² durante 15 min.

El proceso de adaptación de las plantas en invernadero inició al colocar en la parte superior de las macetas, una bolsa de poliestireno sellada con cinta adhesiva para mantener una humedad relativa del 95%, similar a las condiciones de cultivo *in vitro* y así evitar su deshidratación. Cada semana se realizó un corte en las esquinas de las bolsas, para reducir gradualmente la humedad relativa a la que estaban sometidas las plantas, gradualmente se realizaron más perforaciones y después de un mes la bolsa que cubría la maceta fue retirada. La temperatura media en el invernadero fue de 32 °C y se empleó una malla sombra del 70% para reducir la intensidad lumínica.

Posteriormente, se realizó un experimento bajo un arreglo bifactorial para evaluar cinco fuentes de nutrición en las que se emplearon una solución del fertilizante 20-10-20, un lixiviado de composta de lombriz y una mezcla de Pectimorf® (oligogalacturónido de grado de polimerización entre 10-14. INCA, Cuba) (Cuadro 1), y tres genotipos (G1, G3 y G6), con cinco repeticiones. La unidad experimental constó de una planta por maceta.

Cuadro 1. Fuentes de nutrición empleadas para favorecer una mejor adaptación en invernadero de plantas de *Agave maximiliana* producidas *in vitro*.

Tratamiento

T1: Sin fuente de nutrición

T2: 10 mL por planta de solución del fertilizante 20-10-20 en una dosis de 5 g L⁻¹

T3: 50 mL por planta de lixiviado de composta de lombriz[†]

T4: 2.5 mL por planta de Pectimorf® a una concentración de 1 mg L⁻¹ más 10 mL por planta de solución del fertilizante 20-10-20 en una dosis de 5 g L⁻¹

T5: 2.5 mL por planta de Pectimorf® a una concentración de 5 mg L⁻¹ más 10 mL por planta de solución del fertilizante 20-10-20 en una dosis de 5 g L⁻¹

T6: 2.5 mL por planta de Pectimorf® a una concentración de 10 mg L⁻¹ más 10 mL por planta de solución del fertilizante 20-10-20 en una dosis de 5 g L⁻¹

[†]El lixiviado de composta de lombriz se realizó al sumergir un costal con 5 kg de composta de lombriz en 15 L de agua dentro de un recipiente con tapa durante 30 d, el costal se agitaba dentro del recipiente dos veces por semana.

Los tratamientos fueron aplicados cada 21 d y las plantas se regaron con 50 mL de agua tres veces por semana.

Las variables de respuesta fueron el número de hojas por planta, la longitud de la hoja central más larga (se seleccionó y se marcó al iniciar el experimento) y el ancho de esa misma hoja, para realizar estas mediciones se empleo un vernier y se realizaron a los 80 d después de establecido el experimento.

Análisis estadístico de los datos

Los datos de los experimentos se evaluaron mediante análisis de varianza con el programa Statgraphics® Plus 4.0 y las medias de los tratamientos se compararon con la prueba de comparación múltiple de medias de Tukey ($p \leq 0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Inducción de brotes a partir de yemas axilares

Hubo diferencias significativas entre las dosis de reguladores de crecimiento utilizadas, tanto para BA ($p = 0.000$) y 2,4-D ($p = 0.023$), y su interacción ($p = 0.031$). Basados en la significancia de estos últimos resultados, se procedió a realizar un análisis de los 16 tratamientos resultantes de las combinaciones de los dos reguladores de crecimiento; encontrando una alta significancia estadística entre los tratamientos ($p = 0.000$). Con esta información y la obtenida de la comparación múltiple de Tukey de los valores promedio (Cuadro 2), fue posible ubicar la dosis de 12 mg L⁻¹ de BA y de 0.02 mg L⁻¹ de 2,4-D, como la combinación con el más alto promedio para maximizar la estimulación de brotes (26.93 brotes)

(Fig. 1B) y, además se encontró en algunos tratamientos calidad tanto para la identificación debido al tamaño y la facilidad para la separación de los brotes, sin existir anormalidades (Fig. 1C). La interacción de los reguladores de crecimiento no fue significativa ($p = 0.286$) con los dos genotipos de *A. maximiliana*. La combinación de reguladores de crecimiento para el subgénero *Agave*, con dosis baja de auxina (entre 0.025 y 0.5 mg L⁻¹ de auxina) y alta de citocinina (entre 3 y 10 mg L⁻¹ de citocinina) se ha reportado como exitosa para la estimulación en la producción de brotes apartir de yemas axilares en *A. angustifolia* (Ríos-Ramírez *et al.*, 2017), *A. guiengola* (Chávez-Ortiz *et al.*, 2021) y para *A. fourcroydes* (Robert *et al.*, 1992; Zhang *et al.*, 2013); en el caso de *A. guiengola* se encontró una producción máxima de brotes de 43 (Chávez-Ortiz *et al.*, 2021).

Cuadro 2. Número de brotes formados al utilizar las diversas dosis y combinaciones de los reguladores de crecimiento BA y 2,4-D, evaluación a 45 d de iniciado el experimento para los genotipos G1 y G6.

		2, 4-D mg L ⁻¹				
		0 [†]	0.01	0.02	0.03	Media
BA mg L ⁻¹	0	1.5±1.93cd	1.42±2.40cd	0.57±0.93d	0.71±0.99d	1.06±9.74
	4	13.71±11.14bc	16.87±9.42ab	16.12±13.64ab	15.23±12.28ab	15.46±9.78
	8	14.18±9.44c	15.31±8.21ab	18.31±13.07ab	19.14±14.47ab	16.08±9.84
	12	12.42±9.54bcd	11.12±11.31bcd	26.93±7.41a	14.62±10.41b	16.41±9.84
	Media	10.53±9.79	11.21±9.84	15.15±9.84	12.12±9.72	

[†]Medias ± desviación estándar con la misma letra no son significativamente diferentes ($p = 0.05$) empleando Tukey.

Enraizamiento *in vitro*

La formación de raíces fue estadísticamente diferente ($p = 0.000$) entre los medios utilizados y no presentó interacción significativa con ninguno de los genotipos evaluados ($p = 0.216$). Mediante la comparación múltiple de medias se encontró que el medio que contenía 5 mg L⁻¹ de AIB indujo mayor número de raíces (Cuadro 3), lo que señala la importancia de utilizar auxina para inducir mayor número de raíces en esta especie (Garriga *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2014); este tratamiento produjo el mismo número de raíces en los tres genotipos ($p = 0.591$). Sin embargo, las raíces formadas en las plántulas sometidas a dicho medio no fueron de calidad, ya que son raíces efímeras, con las siguientes características: raíces cortas amarillentas poco ramificadas y con vellosidades que no sobreviven al proceso de adaptación *ex vitro* (Fig. 1D).

La longitud de las raíces mostró una alta diferencia significativa entre los medios ($p = 0.000$), y con la comparación múltiple de medias se identificó a los medios 3, 4 y 5 como los que mayor longitud de raíces generaron. Asimismo, los medios con mayor ramificación ($p = 0.000$) fueron 2, 3 y 4. En el caso del factor genotipo, solamente se tuvo significancia para la longitud de raíces ($p = 0.025$) mostrando los genotipos G3 y G6 el mayor crecimiento radicular (Cuadro 4) y no se encontró interacción con los medios ($p = 0.763$).

Estos resultados muestran que los medio 3 y 4, con mayor contenido de sacarosa (90 g L⁻¹), facilitan un mejor desarrollo de raíces en los genotipos empleados de *A. maximiliana*; no sólo en longitud, sino también en una mayor ramificación de las mismas con alta significancia ($p = 0.000$), el mismo comportamiento ya fue reportado (Kumar *et al.*, 1999; Ragonezi *et al.*, 2010), independientemente de la adición de carbón activado. Por lo tanto, el medio 3 se destaca al producir raíces largas, ramificadas y no efímeras (raíces largas ramificadas sin vellosidades, que siguen desarrollándose y generando nuevas raíces en la adaptación *ex vitro*) (Fig. 1E).

Cuadro 3. Número, ramificaciones y longitud en cm de raíces formadas en cinco medios de cultivo.

Medio	Número de raíces [†]	Ramificaciones	Longitud (cm)
M1 MS ^{††} + 30 g L ⁻¹ sacarosa	2.56±1.39b	10.30±9.13b	16.41±7.63b
M2 MS + 30 g L ⁻¹ sacarosa + 2 g L ⁻¹ carbón activado	2.96±1.48b	12.89±8.98ab	15.48±5.89b
M3 MS + 90 g L ⁻¹ sacarosa	4.41±2.67b	17.85±7.69a	28.67±15.48a
M4 MS + 90 g L ⁻¹ sacarosa + 2 g L ⁻¹ carbón activado	3.89±1.98b	16.67±13.25ab	24.96±13.34ab
M5 MS + 30 g L ⁻¹ sacarosa + 5 mg L ⁻¹ AIB	12.78±8.06a	0.67±1.64c	23.06±18.30ab

[†] Medias ± desviación estándar con la misma letra no son significativamente diferentes ($p = 0.05$) empleando Tukey.

^{††} MS Medio de cultivo basal (Murashige & Skoog, 1962).

Cuadro 4. Longitud de la raíz de acuerdo al genotipo.

Genotipo	Longitud de la raíz (cm) [†]
G1	17.43±12.72b
G3	23.47±12.75ab
G6	24.24±15.00a

[†] Medias ± desviación estándar con la misma letra no son significativamente diferentes ($p = 0.05$) empleando Tukey.

Adaptación de plantas en invernadero

No se encontraron diferencias significativas para el número de hojas, tanto para los tratamientos ($p = 0.148$) y genotipos ($p = 0.530$), como para su interacción ($p = 0.703$). La variable de respuesta ancho de la hoja mostró ser independiente de la adaptación con las fuentes de nutrición evaluados ($p = 0.920$), y que más bien se debe a la genética de cada material vegetal (genotipo), ya que este factor resultó significativo ($p = 0.023$). Ambos factores no mostraron interacción ($p = 0.990$).

Al analizar los datos de longitud de la hoja central más larga de cada planta, se observó que las fuentes de nutrición no indicaron diferencias significativas ($p = 0.668$), pero el factor genotipo registró diferencia estadística alta ($p = 0.009$). En el cuadro 5 se señala el diferencial existente para el tamaño de hojas (longitud y ancho) que muestran los genotipos evaluados, donde resaltan los genotipos G1 y G3 (Fig. 1F). Nuevamente no se encontró interacción significativa ($p = 0.950$). Estos resultados permiten señalar que en la especie es posible ubicar materiales vegetales con características particulares; previamente en diversas especies de *Agave* ya se había observado este tipo de respuestas en el desarrollo al micropropagarlas (Domínguez *et al.*, 2008). Durante el proceso de aclimatación se encontró un 100 % de supervivencia.

Cuadro 5. Longitud de la hoja central más larga y ancho de la hoja de acuerdo al genotipo.

Genotipo	Longitud de la hoja (cm) [†]	Ancho de la hoja (cm)
G1	5.73±1.66ab	0.89±0.44b
G3	6.97±2.08b	0.67±0.57ab
G6	5.37±2.08a	0.52±0.42a

[†] Medias ± desviación estándar con la misma letra no son significativamente diferentes ($p = 0.05$) empleando Tukey.

CONCLUSIONES

La micropropagación de *Agave maximiliana* es factible de llevarse a cabo desde la estimulación de los brotes por yemas axilares hasta la adaptación *ex vitro*. Para la etapa de estimulación, la presencia de la auxina ácido 2,4-diclorofenoxyacético en proporción baja (0.02-0.03 mgL⁻¹) respecto a la citocinina 6-benciladenina (4-12 mgL⁻¹), favoreció el incremento en la generación de brotes. Así mismo, para la estimulación significativa de raíces largas, ramificadas y no efímeras en dichos brotes, es necesaria la adición de sacarosa en cantidades mayores (9%) con respecto al 3%, comúnmente utilizada en los protocolos de propagación *in vitro*. La adaptación de plantas en invernadero depende del genotipo, siendo el G1 y G6 los de mayor desarrollo, tanto en la longitud como en el ancho de las hojas, pero no así en el número de éstas.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Humberto Izquierdo Oviedo del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA) de La Habana, Cuba, por facilitar el producto Pectimorf®.

LITERATURA CITADA

- Aguilar-Jimenez, M., & Rodriguez, J. L. (2018). Micropropagacion y aclimatación de maguey Potzometyl (*Agave marmorata* Roezl) en la mixteca poblana. *Rev. Colomb. Biotecnol.*, 20, 124-131. doi:<https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v20n2.77084>
- Arellanes, M. A., Pacheco, J. R., Rodríguez, M., Saldaña, L., & Valles, C. (1997). *Mezcal. Elixir de larga vida*. Ciudad de México: CVS Publicaciones, S. A. de C. V.
- Arzate-Fernández, A. M., Martínez-Velasco, I., Alvarez-Aragón, C., Martinez-Martinez, S. Y., & Norman-Mondragon, T. H. (2020). Morphogenetic response of two agave species regenerated in vitro. *Trop. Subtrop.*, 23, 47.
- 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). Regeneration of agave (*Agave angustifolia* Haw.) from encapsulated somatic embryos. *Fitotec. Mex.*, 39, 359-366. doi:<https://doi.org/10.1007/s11738-012-1117-5>
- Aureoles-Rodríguez, F., Rodríguez-de la O, J. L., Legaria-Solano, J. P., Sahagún-Castellanos, J., & Peña Ortega, M. G. (2008). Propagación *in vitro* del “maguey bruto” (*Agave inaequidens* Koch), una especie amenazada de interés económico. *Rev. Chapingo Serie Hort.*, 14, 263-269.
- Barreto, R., Nieto-Sotelo, J., & Cassab, G. I. (2010). Influence of plant growth regulators and water stress on ramet induction, rosette engrossment, and fructan accumulation in *Agave tequilana* Weber var. azul. *Plant Cell Tiss. Org.*(103), 93-101. doi:<https://doi.org/10.1007/s11240-010-9758-9>
- Bellon, R. M., Barrientos-Priego, A. F., Colunga-García, M. P., Perales, H., Reyes, J. A., Rosales, S. R., & Zizumbo-Villarreal, D. (2009). Diversidad y conservación de recursos genéticos en plantas cultivadas. En *Capital Natural de México* (págs. 355-382). México, México: CONABIO.
- Binh, L. T., Muoi, L. T., Oanh, H. T., Thang, T. D., & Phong, D. T. (1990). Rapid propagation of agave by *in vitro* tissue culture. *Plant Cell Tiss.*, 23, 67-70.
- Cabrera-Toledo, D., Vargas-Ponce, O., Ascencio-Ramírez, S., Valdez-Sandoval, L. M., Pérez-Alquicira, J., Morales-Saavedra, J., & Huerta-Galván, O. F. (2020). Morphological and genetic variation in monocultures, forestry systems and wild populations of *Agave maximiliana* of Western México: Implications for its conservation. *Front. Plant Sci.*, 11, 817. doi:<https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00817>
- Carneiro, F., Queiroz, S. R., Passos, A., Nascimento, M., & Santos, K. (2014). Embriogênese somática em *Agave sisalana* Perrine: indução, caracterização anatômica e regene-

- ração. *Pesqui. Agropecu.*, 44, 294-303. doi:<https://doi.org/10.1590/S1983-40632014000300005>
- Chávez-Guerrero, L., Flores, J., & Kharissov, B. I. (2010). Recycling of ash from mezcal industry: A renewable source of lime. *Chemosphere*, 81, 633-638. doi:<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.08.042>
- Chávez-Ortiz, L. I., Morales-Domínguez, J. F., Rodríguez-Sahagún, A., & Pérez-Molphey-Balch, E. (2021). *In vitro* propagation of *Agave guiengola* Gentry using semisolid medium and temporary immersion bioreactors. *Phyton*, 90, 1003-1013. doi:<https://doi.org/10.32604/phyton.2021.012862>
- Chen, Y., Chen, X., Hu, F., Yang, H., Yue, L., Trigiano, R. N., & Cheng, Z. M. (2014). Micropropagation of *Agave americana*. *Hortscience*, 49, 320-327.
- Colunga-GarcíaMarín, P., Torres-García, I., Casas, A., Figueiredo-Urbina, C. J., Rangel-Landa, S., Delgado-Lemus, A., . . . Carrillo-Galván, G. (2017). Los agaves y las prácticas mesoamericanas de aprovechamiento, manejo y domesticación. *Domesticación en el Continente Americano*, 2, 273-308.
- Colunga-GarcíaMarín, P., Zizumbo-Villarreal, D., & Martínez-Torres, J. (2007). Tradiciones en el aprovechamiento de los agaves mexicanos: una aportación a la protección legal y conservación de su diversidad biológica y cultural. En P. Colunga-GarcíaMarín, D. Zizumbo-Villarreal, J. Martínez-Torres, & P. A.-V. Colunga-GarcíaMarín (Ed.), *En lo ancestral hay futuro: del tequila, los mezcales y otros agaves* (págs. 229-248). Yucatán: Centro de Investigación Científica de Yucatán.
- Cruz-García, H., Campos-Ángeles, G. V., Enríquez-del Valle, J. R., Rodríguez-Ortiz, G., & Velasco-Velasco, V. A. (2019). Desarrollo de plantas micropropagadas de *Agave americana* var. Oaxacensis durante su aclimatación en invernadero. *Rev. Mex. Cienc. Agríc.*, 10, 1491-1503. doi:<https://doi.org/10.29312/remexca.v10i7.1625>
- Delgado-Aceves, L., González-Arnao, M. T., Santacruz-Ruvalcaba, F., Folgado, F., & Portillo, L. (2021). Indirect somatic embryogenesis and cryopreservation of *Agave tequilana* Weber cultivar "Chato". *Plants*(10), 249.
- Domínguez, R. M., González, L. J., Rosales, G. C., Quiñonez, V. C., Delgadillo, D. S., Mireles, J. O., & Pérez, M. B. (2008). 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*, 41, 53-62.
- Eggli, U. (2001). *Illustrated handbook of succulent plants: Monocotyledons*. New York: Springer.
- Federación, D. O. (1 de junio de 2019). *Declaración General de Protección de la Denominación de Origen "Raicilla"*. Recuperado el 1 de junio de 2020, de Diario Oficial de la Federación: https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5564454&fecha=28/06/2019&print=true
- García-Mendoza, A. (1998). *Con sabor a maguey. Guía de la colección nacional de agávaceas y Nolináceas del Jardín Botánico del Instituto de Biología de la UNAM*. Ciudad de México: Sistema de Información Geográfica S. A. de C. V. UNAM.
- García-Mendoza, A. J. (2007). Los agaves de México. *Ciencias*, 87, 14-23.
- García-Mendoza, A. J., Franco-Martínez, I. S., & Sandoval-Gutiérrez, D. (2019). Cuatro especies nuevas de *Agave* (Asparagaceae, Agavoideae) del sur de México. *Acta Bot. Mex.*, 126, e1461. doi:<https://doi.org/10.21829/abm126.2019.1461>
- Garriga, C. M., González, O. G., Alemán, G. S., Abreu, C. E., Quiroz, B. K., Caligari, P. D., & García-González, R. (2010). Management of auxin-cytokinin interactions to improve micropropagation protocol of henequén (*Agave fourcroydes* Lem.). *Chil. J. Agr. Res.*, 70, 16-28.
- Gentry, H. S. (1976). La simbiosis hombre-agave. *Cact. Suc. Mex.*, 21(1), 16-28.
- Hazra, S. K., Das, S., & Das, A. K. (2002). Sisal plant regeneration via organogenesis. *Plant Cell Tiss. Org.*, 70, 235-240. doi:<https://doi.org/10.1023/A:1016517617039>
- Kumar, A., Sood, A., Palni, L. M., & Gupta, A. K. (1999). *In vitro* propagation of *Gladiolus hybridus* Hort.: Synergistic effect of heat shock and sucrose on morphogenesis. *Plant Cell Tiss. Org.*, 57, 105-122. doi:<https://doi.org/10.1023/A:1006373314814>

- Martínez-Palacios, A., Ortega-Larrocea, M. P., Chávez, V. M., & Bye, R. (2003). Somatic embryogenesis and organogenesis of *Agave victoriae-reginae*: Considerations for its conservation. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 74, 135-152. doi:<https://doi.org/10.1023/A:1023933123131>
- Monja-Mio, K. M., & Robert, M. L. (2013). Direct somatic embryogenesis of *Agave fourcroydes* Lem. through thin cell layer culture. *In Vitro Cell Dev. Pl.* 49, 541-549. doi:<https://doi.org/10.1007/s11627-013-9535-7>
- Monja-Mio, K. M., Barredo-Pool, F., Herrera-Herrera, G., EsquedaValle, M., & Robert, M. L. (2015). Development of the stomatal complex and leaf surface of *Agave angustifolia* Haw. 'Bacanora' plantlets during the *in vitro* to *ex vitro* transition process. *Sci. Hortic.* 189, 32-40. doi:<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.03.032>
- Monja-Mio, K. M., Olvera-Casanova, D., Herrera-Alamillo, M. A., Sánchez-Teyer, F. L., & Robert, M. L. (2021). Comparison of conventional and temporary immersion systems on micropropagation (multiplication phase) of *Agave angustifolia* Haw "Bacanora". *3 Biotech*, 11, 77. doi:<https://doi.org/10.1007/s13205-020-02604-8>
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plantarum*, 15, 473-497.
- Naziri, M., Sadat, S., & Soltani, M. (2018). The effect of different hormone combinations on direct and indirect somatic embryogenesis in *Agave americana*. *Iran. J Plant Physiol.* 9, 2739-2747. doi:<https://doi.org/10.22034/IJPP.2019.664579>
- Nikam, T. D., Mulye, K. V., Chambhare, M. R., Nikule, H. A., & Ahire, M. L. (2019). Reduction in hyperhydricity and improvement in *in vitro* propagation of commercial hard fibre and medicinal glycoside yielding *Agave sisalana* Perr. ex Engelm by NaCl and polyethylene glycol. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 138, 67-78. doi:<https://doi.org/10.1007/s11240-019-01603-9>
- Pérez-Zavala, M., Pérez-Zavala, M. L., Hernández-Arzaba, J. C., Bideshi, D. K., & Barboza-Corona, J. F. (2020). *Agave*: a natural renewable resource with multiple applications. *J. Sci. Food Agric.*, 100, 5324-5333. doi:<https://doi.org/10.1002/jsfa.10586>
- Portillo, L., Santacruz-Ruvalcaba, F., & Olmedilla, A. (2012). Cellular and molecular changes associated with somatic embryogenesis induction in *Agave tequilana*. *Protoplasma*, 249, 1101-1107. doi:<https://doi.org/10.1007/s00709-11-0354-6>
- Portillo, L., Santacruz-Ruvalcaba, F., Gutiérrez-Mora, A., & Rodríguez-Garay, B. (2007). Somatic embryogenesis in *Agave tequilana* Weber. *In Vitro Cell. Dev.-Pl.* 43, 569-575. doi:<https://doi.org/10.1007/s11627-007-9046-5>
- Puente-Garza, C. A., Gutiérrez-Mora, A., & García-Lara, S. (2015). Micropropagation of *Agave salmiana*: Means to production of antioxidant and bioactive principles. *Fron. Plant Sci*, 6, 1026. doi:<https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01026>
- Puente-Garza, C., García-Lara, S., & Gutiérrez-Uribe, J. A. (2017). Enhancement of saponins and flavonols by micropropagation of *Agave salmiana*. *Ind. Crops. Prod.* 105, 225-230. doi:<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.05.014>
- Ragonezi, C., Klimaszewska, K., Castro, M. R., Lima, M., de Oliveira, P., & Zavattieri, M. A. (2010). Adventitious rooting of conifers: Influence of physical and chemical factors. *Trees*, 24, 975-992. doi:<https://doi.org/10.1007/s00468-010-0488-8>
- Ramírez-Malagón, R., Borodanenko, A., Pérez-Moreno, L., Salas-Araiza, M. D., Nuñez-Paleni, H. G., & Ochoa-Alejo, N. (2008). *In vitro* propagation of three *Agave* species used for liquor distillation and three for landscape. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 94, 201-207. doi:<https://doi.org/10.1007/s11240-008-9405-x>
- Reyes-Díaz, J. I., Arzate-Fernández, A. M., Piña-Escutia, J. L., & Vázquez-García, L. M. (2017). Media culture factors affecting somatic embryogenesis in *Agave angustifolia* Haw. *Ind. Crop. Prod.* 108, 81-85. doi:<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.06.021>
- Ríos-Ramírez, S. C., Enríquez-del Valle, J. R., Rodríguez-Ortiz, G., & Ruíz-Luna, J. (2017). Benzylaminopurine and indol-3-acetic acid concentrations in *in vitro* proliferation of *Agave angustifolia* adventitious shoots. *Cin. Inv. Agr.* 44, 285-294. doi:<https://doi.org/10.7764/rcia.v44i3.1810>

Recibido:
27/enero/2022

Aceptado:
13/julio/2022

- Robert, M. L., Herrera-Herrera, J. L., Castillo, E., Ojeda, G., & Herrera-Alamillo, M. A. (2006). An efficient method for the micropropagation of *Agave* species. *Plant Cell Culture Protocols*, 318, 165-178. doi:<https://doi.org/10.1385/1-59259-959-1:165>
- Robert, M. L., Herrera-Herrera, J. L., Chan, J. L., & Contreras, F. (1992). Micropropagation of *Agave* spp. En B. Y. S., *Biotechnology in Agriculture and Forestry* (High-Tech and Micropagation III II 9 ed., págs. 306-332). Berlin: Springer-Verlag.
- Rodríguez-Garay, B., Gutiérrez-Mora, A., & Acosta-Dueñas, B. (1996). Somatic embryogenesis of *Agave victoria-reginae* Moore. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 46, 85-87. doi:<https://doi.org/10.1007/BF00039700>
- Sánchez, A., Coronel-Lara, Z., Gutiérrez, A., Vargas, G., Coronado, M. L., & Esqueda, M. (2020). Acclimatization and transplantation of *Agave angustifolia* Haw. vitroplants in wild conditions. *Rev. Mex. Cien. Agric.*, 11, 7. doi:<https://doi.org/10.29312/remexca.v11i7.2403>
- Santacruz-Ruvalcaba, F., & Portillo, L. (2009). Thin cell suspension layer as a new methodology for somatic embryogenesis in *Agave tequilana* Weber cultivar azul. *Ind. Crop. Prod.*, 29, 609-614. doi:<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2008.12.001>
- Santamaría, J. M., Herrera-Herrera, J. L., & Robert, M. L. (1995). Stomatal physiology of a micropropagated CAM plant; *Agave tequilana* (Weber). *Plant Growth Regul.*, 16, 211-214. doi:<https://doi.org/10.1007/BF00024776>
- Torres, I., Casas, A., Vega, E., Martínez-Ramos, M., & Delgado-Lemus, A. (2015). Population dynamics and sustainable management of mescal agaves in central México: *Agave potatorum* in the Tehuacán-Cuicatlán Valley. *Econ. Bot.*, 69, 26-41. doi:<https://doi.org/10.1007/s12231-014-9295-2>
- Trejo, L., Limones, V., Peña, G., Scheinvar, E., Vargas-Ponce, O., Zizumbo-Villarreal, D., & Colunga-GarcíaMarín, P. (2018). Genetic variation and relationships among agaves to the production of Tequila and Mezcal in Jalisco. *Ind. Crops. Prod.*, 140-149. doi:<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.08.072>
- Valenzuela-Sánchez, K. K., Juárez-Hernández, R. E., Cruz-Hernández, A., Olalde-Portugal, V., Valverde, M. E., & Paredes-López, O. (2006). Plant regeneration of *Agave tequilana* by indirect organogenesis. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 42, 336-340.
- Vázquez-García, J. A., Cházaro, M. J., Hernández, G., Vargas-Rodríguez, Y. L., & Zamora, M. P. (2007). Taxonomía del género *Agave* en el occidente de México: Una panorámica preliminar. In J. M.-R. Vázquez-García, *Agaves del Occidente de México* (pp. 38-82). Guadalajara: Universidad de Guadalajara.
- Zhang, Y.-M., Li, L. X., Chen, Z., Li, J.-F., Lu, J.-Y., & Zhou, W.-Z. (2013). Shoot organogenesis and plant regeneration in *Agave* hybrid, No. 11648. *Sci Hortic-Amsterdam*, 161, 30-34. doi:<https://doi.org/10.1016/j.scientia.2013.06.047>