

CULTIVO *IN VITRO* DE *AGAVE POTATORUM*, ESPECIE AMENAZADA ENDÉMICA DE MÉXICO *IN VITRO* CULTURE OF *AGAVE POTATORUM* A THREATENED SPECIES, ENDEMIC TO MEXICO

ANA GABRIELA TÉLLEZ TORRES, JOSÉ ÁNGEL JIMÉNEZ RODRÍGUEZ, OCTAVIO GONZÁLEZ CABALLERO,
 WENDY ROCÍO JUÁREZ PÉREZ, SAMUEL MARTÍNEZ MARTÍNEZ, VÍCTOR MANUEL CHÁVEZ AVILA*

Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, Jardín Botánico, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, CDMX, México.

*Corresponding author: victorm.chavez@ib.unam.mx

Resumen

Antecedentes: *Agave potatorum* es una especie endémica importante ecológica, cultural y económicamente. Poco se cultiva y sus poblaciones naturales están desapareciendo, por lo que una alternativa es la propagación por cultivo de tejidos vegetales.

Preguntas: ¿Es posible regenerar nuevos individuos partiendo de estructuras somáticas? ¿Qué explante regenera más plántulas? ¿Qué combinación de reguladores del crecimiento vegetal estimula una mayor formación de brotes?

Especie estudiada: *Agave potatorum*, semillas de Oaxaca, México.

Lugar de estudio y fechas: Jardín Botánico, Instituto de Biología, UNAM, Ciudad de México, México. Desde 2020.

Métodos: Semillas se desinfectaron y germinaron *in vitro* y *ex vitro*. Se cultivaron *in vitro* explantes de cotiledones, tallos y hojas en medio MS modificado, un mes con BAP (0-2 mg/L) combinado con 2,4-D (0-0.5 mg/L), posteriormente en MS sin reguladores del crecimiento vegetal. Las plantas obtenidas con tres o más raíces se sometieron a un proceso de aclimatización.

Resultados: A dos meses de iniciados los cultivos las semillas germinaron *in vitro* (56.04 %) y *ex vitro* (31.87 %). Después de 10 meses del período de inducción, se obtuvieron 228 brotes y plántulas, 206 procedían de los tratamientos BAP 1.5-2 mg/L con 2,4-D 0.5 mg/L, con 8.1-12.5 brotes/explante de tallo y hoja. Más del 70 % de las plantas sobrevivieron en invernadero luego de dos meses.

Conclusiones: Esta investigación puede contribuir a la conservación de la especie, enfrentar los efectos del cambio climático, la conservación de servicios ecosistémicos y potenciar la economía mediante un aprovechamiento sustentable de ésta y otras especies amenazadas.

Palabras clave: cambio climático, conservación, cultivo de tejidos vegetales, organogénesis.

Abstract

Background: *Agave potatorum* is an endemic species of ecological, cultural and economic importance. Despite its importance and its overexploited status, it is barely cultivated and its natural populations have been disappearing, so an alternative is propagation by plant tissue culture.

Questions: Is it possible to regenerate new individuals from somatic structures? From which explant do more plantlets regenerate? What combination of plant growth regulators stimulates more bud formation?

Species studied: *Agave potatorum*, seeds from Oaxaca, Mexico

Study site and dates: Botanical Garden, Institute of Biology, UNAM, Mexico City, Mexico. Since 2020

Methods: The explant culture of cotyledons, stems and leaves sections in modified MS medium was explored, one month with BAP (0-2 mg/L) combined with 2,4-D (0-0.5 mg/L). Subsequently in MS without plant growth regulators. The obtained plants with 3 or more roots underwent an acclimatization process.

Results: The seeds' germination was achieved and at two months, the *in vitro* (56.04 %) and *ex vitro* (31.87 %) germination were obtained. At 10 months after the induction period, the total number of shoots and plantlets of all treatments was 228, most of them (206) were with BAP 1.5-2 mg/L with 2,4-D 0.5 mg/L promoted the regeneration of 8.1-12.5 shoots/explant of stem and leaf. More than 70 % of the plants survived in greenhouse after two months of culture.

Conclusions: This investigation can contribute to the conservation of *Agave potatorum*, address climate change, conserve ecosystemic services, and strengthen the economy by using this and other endangered species sustainably.

Keywords: climate change, conservation, plant tissue culture, organogenesis.

Agave *potatorum* Zucc. (Asparagaceae), “maguey tobalá”, endémico de México, se distribuye solo en dos estados del país (Oaxaca y Puebla) en ambientes áridos y en bosque tropical caducifolio. Esta especie cumple con valiosos servicios ecológicos, ya que evita la erosión, ayuda a la recarga de mantos freáticos, es refugio para otros organismos y es fuente de agua y alimentos empleados por el ser humano. Sus flores se utilizan en la alimentación, al igual que el pedúnculo floral cuando éste ha comenzado su desarrollo; tiene aplicaciones medicinales, las hojas se usan para disminuir inflamaciones y para el tratamiento de lesiones internas tanto de humanos como de animales domésticos. Sin embargo, su uso principal es para la elaboración de mezcal, bebida con reconocimiento nacional e internacional. Esta actividad es prioritaria debido a la derrama económica en diferentes comunidades del país (García-Herrera *et al.* 2010, Narváez-Suárez *et al.* 2016, García-Mendoza *et al.* 2019, Martínez-Jiménez *et al.* 2019). Es por dicha actividad que la especie enfrenta una seria problemática que amenaza su sobrevivencia, ya que, para la elaboración de mezcal, se corta el pedúnculo floral inmaduro, impidiendo la formación y polinización de flores, lo que al mismo tiempo imposibilita el desarrollo de semillas, de las cuales *A. potatorum* depende para sobrevivir pues se considera que no se propaga vegetativamente. Esto es crucial puesto que *A. potatorum* alcanza su madurez a una edad de entre 8 a 12 años, y al ser monocárpica, los individuos tienen un solo evento reproductivo y posteriormente mueren. Pese a su importancia, poco o nada se cultiva y es saqueada de sus poblaciones silvestres, las cuales han disminuido (Ilsley-Granich & Torres-García 2004, Michel-Cuello 2010, Delgado-Lemus *et al.* 2014, Godínez-Hernández *et al.* 2016, García-Mendoza & Franco-Martínez 2018).

En el año 2021 se reportó que “el director de la Reserva de la Biósfera Tehuacán-Cuicatlán, Fernando Reyes Flores, advirtió del saqueo de *A. potatorum* asociado a la producción de mezcal y que su extracción ilegal ha aumentado hasta un 300 % en la zona” (Hernández 2021).

La extracción de *A. cupreata* y *A. potatorum* para la producción de bebidas ha provocado una disminución de las poblaciones silvestres, por lo que hay preocupación por la conservación de estas especies. Esta situación afecta seriamente a los ecosistemas, agravando los efectos del cambio climático, erosionando, debilitando el terreno y poniendo en serio riesgo a las comunidades por el desgajamiento de las colinas que habitan (Aguirre-Dugua & Eguiarte 2013).

Ante la urgente necesidad de producir plantas con la mayor diversidad genética posible con fines de reforestación y económicos, una alternativa es el cultivo de tejidos vegetales, rama de la biotecnología a través de la cual, una vez superada la fase experimental, se ha demostrado que es posible propagar *in vitro* numerosas plantas en menor tiempo que por métodos convencionales (Good-Avila *et al.* 2006, Robert *et al.* 2006, Davies & Gan 2012).

Para el género *Agave*, existen diferentes estudios que reportan la regeneración de brotes y plantas completas en medio MS (Murashige & Skoog 1962): Vía organogénesis: *A. sisalana*, a partir de hojas con 6-Bencilaminopurina (BAP) 26.6 µM (Hazra *et al.* 2002). A partir de tallos de *A. karwinskii* con BAP 1.0 mg/L; *A. cupreata*: BAP 1.5 mg/L; *A. potatorum* con kinetina (KIN) 3.0 mg/L (Domínguez-Rosales *et al.* 2008). Por embriogénesis somática a partir de tallos: *A. victoriae-reginae* con ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) 2.26 µM (Martínez-Palacios *et al.* 2003); y *A. fourcroydes*, con Dicamba 2.26 µM (Monja-Mio & Robert 2013); a partir de hojas *A. tequilana* con 2,4-D 3 mg/L complementado con BAP 0.3 mg/L (Rodríguez-Sahagún *et al.* 2011).

Respecto a la propagación *in vitro* de *A. potatorum*, Ramírez-Mosqueda *et al.* (2022) obtuvieron 9.87 brotes por explante con 3 mg/L de BAP en combinación con 3 mg/L de AIA (ácido indol-3-acético). Bautista-Castellanos (2019) regeneró 15.3 brotes por explante con 3 mg/L de BAP. Enríquez-del Valle *et al.* (2016) llevaron a cabo la regeneración *in vitro* de *A. potatorum* obteniendo de 6-12 brotes por explante con 1 mg/L de BAP. Mientras que Domínguez-Rosales *et al.* (2008) regeneraron 6.9 brotes por explante con 2 mg/L de KIN. En dichos estudios la regeneración fue vía organogénesis, emplearon tallos como fuente de explantes y usaron medio de cultivo MS. A pesar de las citadas investigaciones, subsiste la falta de plantas por lo que es urgente definir y aplicar sistemas eficientes de propagación a partir de semillas que permitirían la conservación de su variabilidad genética intrínseca. En el presente estudio se describe la propagación de *A. potatorum* a través de secciones obtenidas de plántulas germinadas *in vitro*.

Materiales y métodos

Semillas maduras de *A. potatorum* fueron colectadas en 2019 en el municipio de Santa María Sola de Vega, Oaxaca; fueron almacenadas en bolsas de papel estraza y refrigeradas (5 °C) por 6 meses hasta su uso.

Desinfección del material vegetal. Bajo condiciones asépticas en una campana de flujo laminar (CFL), se desinfectaron 182 semillas en agitación constante en una solución de detergente durante 10 min, para después sumergirlas en SoluVet® por 30 min, posteriormente se desinfectaron en etanol 70 % v/v por 1 min y se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio 30 % v/v, con dos gotas de Tween 20 en 100 mL, durante 30 min y se realizaron tres enjuagues con agua destilada esterilizada.

Germinación in vitro. Bajo condiciones asépticas, fueron sembradas 91 semillas (una semilla por tubo de ensayo, 25 × 150 mm) en medio de cultivo MS con 50 % de la concentración de sus componentes inorgánicos, suplementado con sacarosa 30 g/L y bacto-agar 8.5 g/L, pH 5.7 (MS50).

Todos los medios de cultivo, agua y cristalería necesarios fueron esterilizados en autoclave a 1.5 kg/cm², 15 min a 121 °C. Los cultivos *in vitro* fueron incubados a 25 ± 2°C en un fotoperiodo de 16 h luz fluorescente blanca fría, 50 μmol·m⁻¹·seg⁻².

Germinación ex vitro. Bajo condiciones de invernadero, se sembraron 91 semillas previamente desinfectadas, en un sustrato de tepojal, tierra negra y lombricomposta en proporciones 2:1:1, contenido en dos charolas de plástico. Se aplicaron riegos semanales.

Inducción morfogénica a partir de cotiledones, hojas y tallos. A partir de plántulas germinadas *in vitro*, 1-5 cm altura (parte aérea), se disectaron tres tipos de explantes (3-7 mm longitud): tallos, parte proximal de cotiledones y de las hojas, que fueron establecidos (uno por frasco de 120 mL) en MS50 adicionado de 100 mg/L de ácido cítrico, 100 mg/L de ácido ascórbico, y suplementado con los reguladores de crecimiento vegetal (RCV): BAP 0, 1, 1.5 y 2 mg/L con 2,4-D 0 y 0.5 mg/L (Tabla 1). El tiempo de inducción fue de 30 días, posteriormente, los cultivos fueron transferidos cada 30 días a medio MS50 sin RCV. Las condiciones de incubación fueron las mismas que para la etapa de germinación de semillas.

Tabla 1. Tratamientos para el cultivo *in vitro* de tallos, cotiledones y hojas de *Agave potatorum*.

Tratamiento	BAP (mg/L)	2,4-D (mg/L)
T1	1	0.5
T2	1.5	0.5
T3	2	0.5
T4	0	0.5
T5	1	0
T6 Control	0	0

Para cada tratamiento se realizaron diez repeticiones, a excepción de los tratamientos cuatro y cinco, los cuales consistieron en cinco repeticiones cada uno. Cada explante se consideró como una repetición y se colocó uno por frasco de cultivo.

Aclimatización. A 12 meses de iniciados los cultivos, se extrajeron de los frascos 45 plantas que presentaron más de tres raíces y cuya longitud fue de 1-3 cm. Para llevar a cabo la aclimatización los frascos permanecieron destapados

durante 24 horas. Posteriormente se sacaron las plantas, se lavaron las raíces con agua corriente con el fin de retirar el medio de cultivo y se secaron durante 24 horas sobre papel periódico. Luego de esto se sembraron en un sustrato de tepojal, tierra negra y lombricomposta en proporciones 2:1:1 respectivamente en macetas de 10 cm de diámetro (tres plantas por maceta), éstas se colocaron dentro de bolsas de plástico transparentes durante 2 semanas, las cuales posteriormente se retiraron. Los riegos se realizaron cada 3 días las primeras 2 semanas, después el riego se realizó de manera semanal. Durante este proceso las plantas permanecieron en condiciones de invernadero bajo luz natural.

Análisis estadístico. Por medio del software R (R Core Team 2022) usando RStudio se aplicó la prueba de Shapiro-Wilk para determinar si los datos de germinación y regeneración tenían una distribución normal. Posteriormente se realizó una prueba de Kruskal-Wallis para revelar si existían diferencias significativas entre los grupos evaluados. Después, se llevó a cabo una prueba de U de Mann con la finalidad de conocer dónde se encontraban dichas diferencias.

Resultados

Para las condiciones *in vitro* y *ex vitro*, las primeras semillas germinaron dentro de los primeros cuatro días. Se consideró que la germinación ocurrió cuando el cotiledón emergió de la testa. Dicho órgano se caracterizó por tener una apariencia blanca y opaca que pronto se elongó y adquirió color verde (Figura 1A). La radícula emergió después, ésta fue una estructura delgada y blanca.

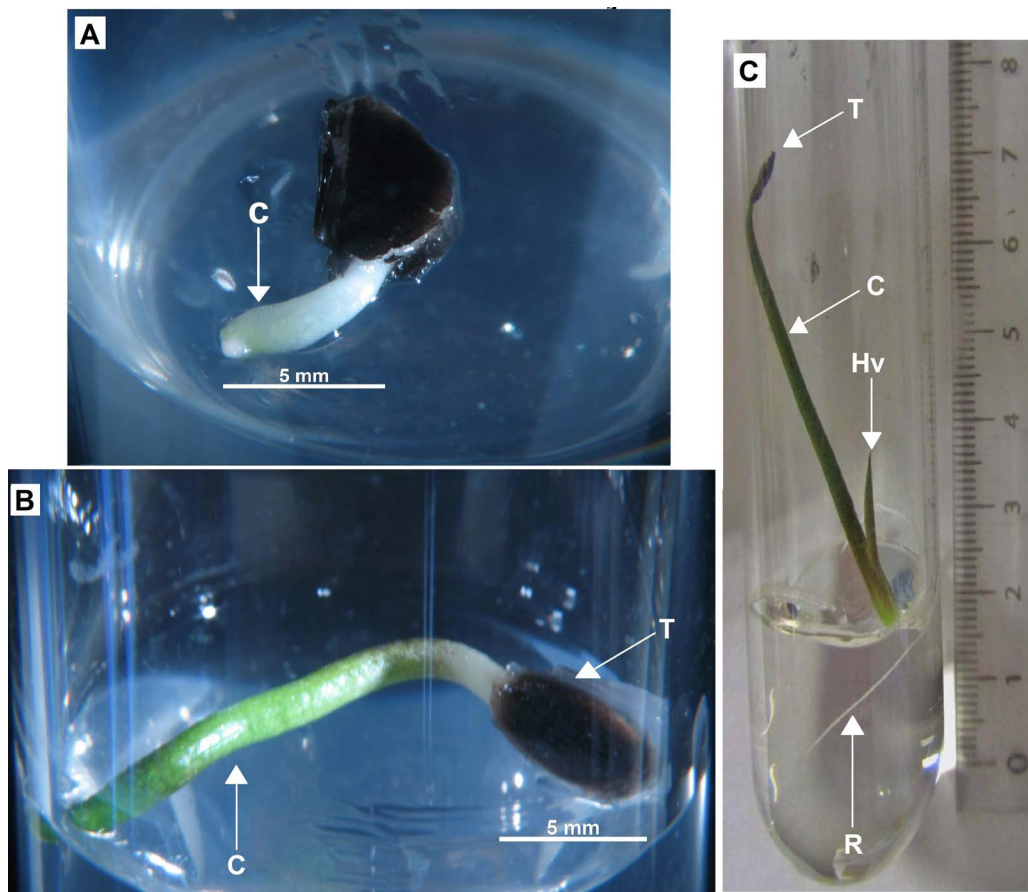


Figura 1. Semillas de *Agave potatorum* en diferentes etapas de germinación *in vitro* y desarrollo de la plántula a los 27 días de la siembra. A) cotiledón, fue la estructura que emergió primero y pronto se volvió verde; B) cotiledón elongado; C) plántula con cotiledón, raíz y la primera hoja verdadera. T: testa; C: cotiledón; R: raíz; Hv: hoja verdadera.

Germinación in vitro. Las 91 semillas se establecieron asépticamente *in vitro*, germinaron de manera asincrónica. Los registros a los 8, 27 y 54 días después de la siembra, indicaron respectivamente que habían germinado 23 (25.28 %); 45 (49.46 %) y en total 51 semillas (56.04 %) (Figura 1); 12 meses después no había germinado ninguna otra. En el día 27 después de la siembra, las plántulas más desarrolladas presentaron un cotiledón (1-5 cm), una hoja (0.5-4 cm) aún sin expandir su lámina y una raíz (1-3 cm) (Figura 1).

A 12 meses de la siembra, las plantas presentaron raíces de 4-5 cm de largo, de 2-4 hojas verdes, expandidas de una longitud de 4-5 cm, en los márgenes de las hojas se observaron espinas (Figura 2).

Germinación ex vitro. Los registros a los 8, 27 y 54 días después de la siembra, indicaron respectivamente que habían germinado 15 (16.49 %); 27 (29.68 %) y en total 29 (31.87 %) semillas (Figura 3). Posteriormente y hasta 12 meses después no germinó ninguna otra semilla. Las plántulas más desarrolladas presentaron un cotiledón de 3 cm (Figura 3A); y de 1 a 3 hojas expandidas de 1-4 cm de largo (Figura 3B); con una apariencia grisácea-azulada y con espinas en sus bordes (Figura 3C). Por otro lado, el análisis estadístico llevado a cabo indicó que existen diferencias significativas entre la germinación en condiciones *in vitro* y *ex vitro* (valor de $P = 0.0029$).

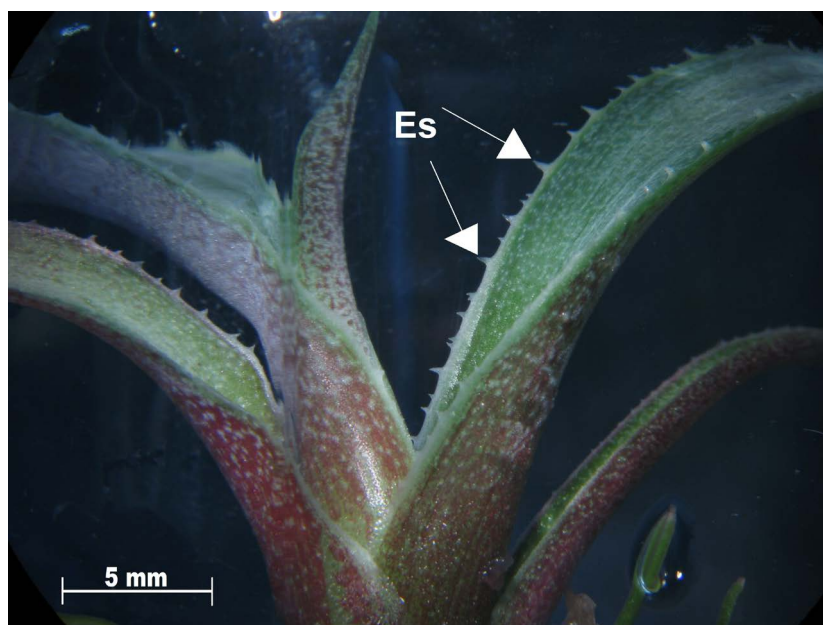


Figura 2. Planta de *Agave potatorum* cultivada *in vitro* a 12 meses de la siembra de semillas, fue notoria la presencia de espinas y con pequeñas “manchas” en las hojas, más abundantes o más concentradas en las hojas centrales. Es: espinas.

Inducción morfogénica a partir de cotiledones, hojas y tallos

Oxidación. - Dentro de las primeras dos semanas de iniciados los cultivos, se observó en los distintos tratamientos un ligero oscurecimiento en la zona de corte en algunos de los explantes. A los tres meses, los cotiledones presentaron el mayor número de explantes con signos de oxidación, 35 (70 %), seguidos por 27 explantes de hojas (54 %) y 25 tallos (50 %). Seis meses después de la siembra se mantuvo esa secuencia; los cotiledones, seguidos de las hojas y los tallos, presentaron 44, 32 y 28 explantes con oxidación, respectivamente.

El control fue el tratamiento donde se presentó el mayor número de explantes con oxidación (24 explantes); los tratamientos T4 (2,4-D 0.5 mg/L) y T5 (BAP 1 mg/L) presentaron las menores cantidades de explantes con algún grado de oxidación. En general para todos los tratamientos, el oscurecimiento fue pardo claro y se observó en ≤ 10 %

de la superficie de los explantes, no fue un problema que impidiera el crecimiento y desarrollo; en ningún caso la oxidación fue letal. De acuerdo al análisis estadístico, los diferentes tratamientos no tuvieron un efecto significativo en la respuesta de oxidación (valor de $P = 0.0529$).

Crecimiento de callo y organogénesis directa e indirecta.- El callo que se formó en los diferentes tratamientos y tipos de explantes se caracterizó por ser compacto, de una coloración de hialina a amarillenta y con regiones de color verde. El desarrollo de órganos a partir de callo inició con la presencia de pequeños nódulos (≤ 1 mm) de color blanco opaco. En la formación de raíces, esos nódulos se alargaron y formaron numerosos pelos radicales, esas raíces individuales crecieron entre callo, no se observó que estuvieran unidas a otra estructura organizada (Figura 4A). Para la formación de hojas, los nódulos adquirieron un color verde, se elongaron como una pequeña lámina foliar que se expandió evidenciando la identidad de una hoja; al paso del tiempo emergieron una segunda y tercera hojas y fue notorio que emergían de un brote inmerso entre el callo. Es posible que, en el callo, inicialmente se haya desarrollado una zona meristemática con el posterior desarrollo de un tallo y primordios de hojas (Figura 4B). A 10 meses después de la inducción se registraron 113 brotes regenerados vía organogénesis indirecta, la mayoría (81) se presentaron en el T3 de BAP/2,4-D 2.0/0.5 mg/L (Tabla 2). El explante con mayor número de brotes fue el de tallo (100 brotes) (Tabla 3).

El desarrollo de órganos vía directa inició con la formación en la superficie de los explantes de estructuras nodulares en forma de domo, que crecieron y gradualmente fueron diferenciándose en raíces o brotes de hojas. A 10 meses después de la inducción se registraron 115 brotes regenerados por medio de organogénesis directa, todos regenerados a partir de explantes de tallo (Tabla 3). En el T2 se registró el mayor número de brotes obtenidos por esta vía (BAP/2,4-D 1.5/0.5 mg/L) (Tabla 2).

En el Control, cinco de los explantes de tallo desarrollaron las hojas y raíces que inicialmente les habían sido disectadas, restableciéndose la condición inicial de las plántulas. Las únicas respuestas observadas ocurrieron en el cultivo de tallos. En los tratamientos T1, T2 y T3 a partir de tallos solamente en un explante de hoja ocurrió la formación de brotes. En los explantes de tallo, es probable que los brotes se hayan desarrollado por activación de yemas axilares y/o por la formación de yemas adventicias.

A 10 meses del periodo de inducción, en el tratamiento T3 fue donde se registró la mayor regeneración de brotes (125), seguido del T2 con 81 brotes (Tabla 2). En el tratamiento control sólo los explantes de tallo regeneraron hojas y raíces constituyéndose en plántulas individuales (Figura 4D); los menos regenerativos fueron los tratamientos T4 y T5 que incluían solo uno de los dos RCV (BAP o 2,4-D) en donde no hubo formación de órganos.



Figura 3. Plántulas de *Agave potatorum* en condiciones *ex vitro* a 12 meses de la siembra de semillas. A) el cotiledón permanece verde como un órgano fotosintético; B) hojas verdaderas sin la presencia del cotiledón, el cual se degradó; C) espinas en los bordes de una lámina foliar. C: cotiledón y Hv: hoja verdadera.

Tabla 2. Número de brotes por tratamiento. Resultados al término de 10 meses después del periodo de inducción.

BAP/2,4-D (mg/L)	Número de brotes	Vía indirecta	Vía directa
T1 (1.0/ 0.5)	17	1	16
T2 (1.5/ 0.5)	81	31	50
T3 (2.0/ 0.5)	125	81	44
T4 (0.0/ 0.5)	0	0	0
T5 (1.0/ 0.0)	0	0	0
T6 (0.0/0.0)	5	0	5
Total	228	113	115

Tabla 3. Número de brotes obtenidos por el tipo de explante. Resultados al término de 10 meses después del periodo de inducción.

Explante	Brotes	Vía indirecta	Vía directa
Hoja	13	13	0
Tallo	215	100	115
Cotiledón	0	0	0
TOTAL	228	113	115

Fue evidente que, de los tres tipos de explantes empleados en esta investigación, los de tallo fueron los que presentaron la mayor cantidad de estructuras organizadas (Tabla 3), en contraste, los explantes de cotiledones, solo siete formaron callo y eventualmente algunas raíces vía indirecta (Figura 4).

Al analizar el efecto de cada tratamiento en la formación de brotes dependiendo del tipo de explante, se encontró que los datos no tuvieron una distribución normal. La prueba de Kruskal-Wallis indicó que existen diferencias sig-

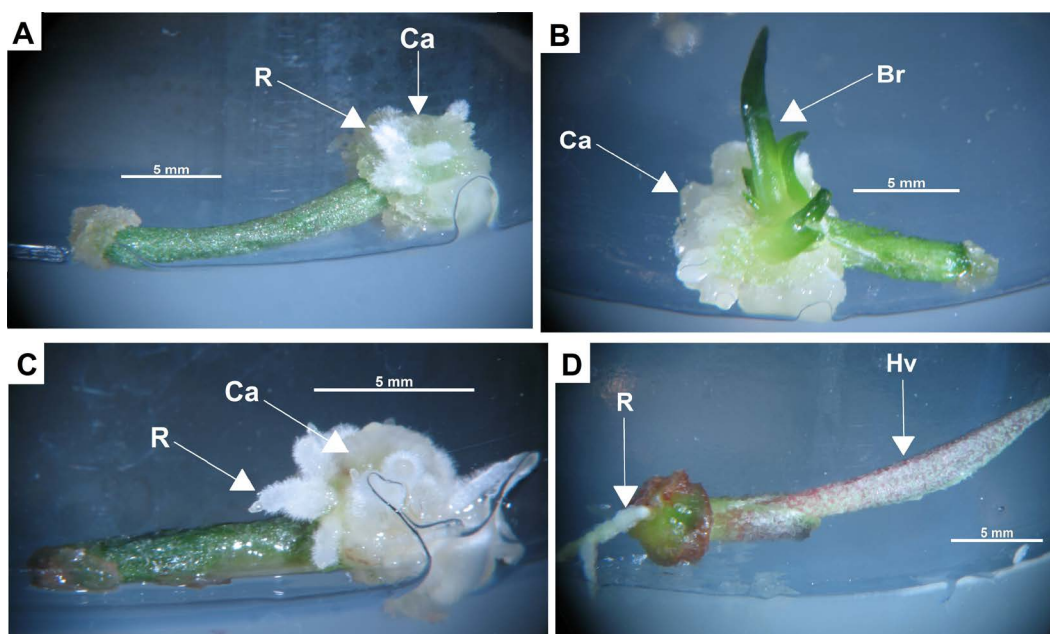


Figura 4. Respuestas a 30 días después de la inducción. Tratamiento 2 (BAP 1.5 mg/L con 2,4-D 0.5 mg/L): A) callo y raíces emergiendo de un explante de cotiledón; B) callo y brotes emergiendo de un explante de tallo. Tratamiento 3 (BAP 2 mg/L con 2,4-D 0.5 mg/L); C) explante de tallo con callo y raíces en uno de sus extremos. Tratamiento control: D) explante de tallo con raíces y una hoja. R: raíz; Ca: callo; Br: brote; Hv: hoja

nificativas entre los tratamientos, las cuales fueron evidenciadas a través de la prueba U de Mann que señaló que para la generación de brotes en los explantes de hoja, el tratamiento T1 fue significativamente diferente del resto de los tratamientos; al fue el que regeneró un mayor número de brotes. Para los explantes provenientes de tallo se obtuvo que el tratamiento T3 fue el único que tuvo diferencias significativas y que además presentó un número mayor de brotes regenerados; en cambio los tratamientos T4 y T5 tienen cierta similitud con los tratamientos T1 y T2 (Tabla 4).

Aclimatización. Después de 2 meses de establecimiento en condiciones de invernadero, se registró 71.11 % de supervivencia de las plantas regeneradas *in vitro*. Éstas se caracterizaron porque sus raíces proliferaron, se engrosaron; presentaron dos a cinco hojas con 2-6 cm de longitud y 1-2 cm de ancho (Figura 5). La apariencia de las hojas y en general de los individuos fue similar al de las plantas obtenidas a través de germinación de semillas en condiciones *ex vitro*.

Discusión

Germinación. En el presente estudio, a los 54 días de haber iniciado los cultivos, se obtuvo la germinación de 29 (31.87 %) semillas bajo condiciones *ex vitro* y 51 (56.04 %) *in vitro* en medio MS50. Para la presente investigación se redujo al 50 % la concentración de sales minerales en virtud de asegurar la disponibilidad de agua libre que favoreciera la imbibición de las semillas, ya que, según la definición de ósmosis, el flujo de agua ocurrirá desde la zona con la solución más diluida a la más concentrada (Fathi & Tari 2016, Jiao *et al.* 2015).

En medio MS al 100 % de su concentración se han reportado altos porcentajes de germinación *in vitro* en otras especies (Asparagaceae), como en *Yucca aloifolia*, la germinación comenzó el día 9 después de la siembra y en el día 152 todas las semillas habían germinado (Karpov 2004); para *A. victoriae-reginae*, 90 % de las semillas germinaron después de dos semanas de incubación (Martínez-Palacios *et al.* 2003), *A. guiengola*, 88.9 % de germinación 12 días después de la siembra (Vargas-Valencia 2017). El incremento en la concentración de solutos reduce el potencial hídrico y en consecuencia disminuye la disponibilidad de agua libre para el proceso de imbibición de la semilla (Fathi & Tari 2016).

Tabla 4. Brotes por explante y tratamiento*.

Tratamiento (mg/L)	Tallo	Hoja
T1 (1.0/ 0.5)	0.5 ± 0.670 ^a	1.2 ± 1.932 ^a
T2 (1.5/ 0.5)	8.0 ± 9.333 ^b	0.1 ± 0.316 ^b
T3 (2.0/ 0.5)	12.5 ± 21.417 ^c	0.1 ± 0.316 ^b
T4 (0.0/ 0.5)	0 ^{ab}	0 ^b
T5 (1.0/ 0.0)	0 ^{ab}	0 ^b
T6 (0.0/0.0)	0.5 ± 0.527 ^a	0 ^b

*Media ± SE con superíndice diferente son significativamente diferentes ($P \leq 0.05$).

Los resultados apuntan a que el mayor porcentaje de germinación ocurre entre la segunda y tercera semana de cultivo, asimismo, ha sido reconocido que la germinación asincrónica, es una adaptación al hábitat donde podrían mantenerse en el suelo semillas que eventualmente podrían germinar y con ello no se pondría en riesgo la sobrevivencia de todas las plántulas (Rabenda 1990, Mata-Rosas *et al.* 2001, Dávila-Figueroa *et al.* 2005).

Oxidación. No obstante, la adición de antioxidantes al medio de cultivo (ácido cítrico, ácido ascórbico), la oxidación en los tres tipos de explantes y en los seis tratamientos se presentó a los pocos días de iniciada la siembra y a los 3 meses de cultivo alcanzó porcentajes entre el 50 % (hojas, tallos) hasta 70 % (cotiledones) del número de explantes. Además,

puede señalarse que los RCV empleados en esta investigación no fueron los factores que iniciaron la oxidación (aunque posiblemente pudieron promoverla), éste fue un problema que se presentó incluso en el tratamiento control. Investigaciones previas sugieren que la oxidación es un problema común en el cultivo *in vitro* del género *Agave*.

Todos los explantes de tallo y yemas axilares en un estudio llevado a cabo con *A. salmiana* presentaron oxidación (Flores-Morales *et al.* 2021). La misma problemática se presentó con *A. victoriae-reginae*: 66 y 73 % de los explantes de bases y ápices foliares respectivamente presentaron oxidación, aun cuando fueron sembrados en medio MS con PVP (polivinilpirrolidona) (Rivera-Fuentes 2015). Por otro lado, se observó la oxidación del 100 % de embriones cigóticos de *A. atrovirens* en el grupo control, así como en los tratamientos con auxinas y citocininas. Los callos obtenidos de explantes de hojas presentaron una rápida oxidación, así como necrosis celular (Ayala-Guerrero 2012).

Formación de brotes. Bajo las condiciones de cultivo ensayadas (con BAP 1-2 / 2,4-D 0.5 mg/L) se promovió el desarrollo de órganos sólo de los explantes de hoja y de tallo, tanto a partir de callo como por vía directa. Los explantes de cotiledones, no fueron regenerativos. Por vía indirecta células del callo adquirieron y expresaron su capacidad morfogénica; y por vía directa la interpretación es que células competentes, presentes en los explantes, se desarrollaron en órganos en respuesta a los tratamientos con RCV; al mismo tiempo, debieron tener participación en esta respuesta el estado fisiológico de los explantes y la variabilidad genética de las semillas. El empleo de estructuras inmaduras procedentes de semillas germinadas ha sido una útil herramienta en la multiplicación de especies amenazadas no solo por su potencial regenerativo sino por la conservación de variabilidad genética (Dávila-Figueroa *et al.* 2005).

En el presente estudio, a partir de tallos y hojas, al término de 10 meses después del periodo de inducción se obtuvieron de 8.0 a 12.5 brotes por explante, dando un total de 228 brotes, los cuales, una vez individualizados, enraizaron de manera espontánea constituyéndose en plántulas completas en 20-30 días (Tablas 2, 3 y 4). A partir de secciones de hoja se obtuvieron 13 brotes, esta respuesta observada es el primer reporte para la especie; será recomendable consolidar y optimizar este tipo de cultivo al considerar las ventajas al incrementar el número y tipo de explantes regenerativos. Resultados similares han sido reportados para otras especies, ejemplo de ello es el estudio de Hazra *et al.* (2002) quienes lograron inducir organogénesis de *A. sisalana* empleando BAP. Mientras que Vargas-Valencia (2017) observó la formación de 842 brotes a partir de 15 explantes provenientes de hojas de *A. guiengola* sembradas en medio MS suplementado con ácido 1-naftalenacético (ANA) 0.5 mg/L con BAP 2.0 mg/L.

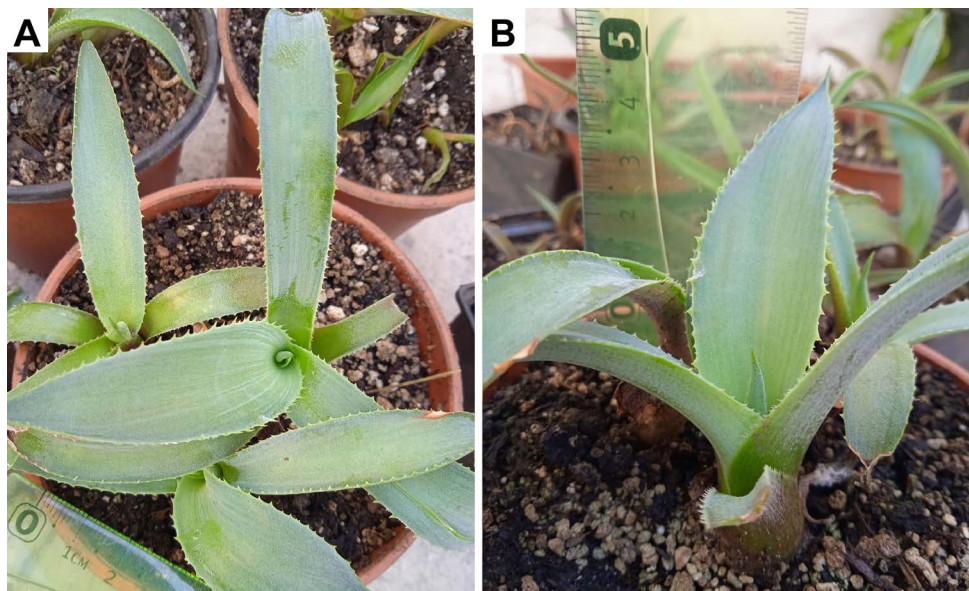


Figura 5. Plantas de *Agave potatorum* propagadas *in vitro* a dos meses de ser establecidas en suelo. A) hojas nuevas emergieron de la parte central de la roseta. B) las hojas presentaron una coloración grisácea-azulada y espinas en los bordes. Hn: Hojas nuevas; Es: espinas.

Respecto al uso de tallo como fuente de explantes, Enríquez-del Valle *et al.* (2016) reportaron para *A. potatorum*, 6 a 12 brotes/explante en el cultivo de Tallos en MS con BAP 1 mg/L y con un tiempo inducción de 50 días. Domínguez-Rosales *et al.* (2008) cultivaron tallos de distintas especies, con 90 días de inducción: *A. potatorum*: KIN 3.0 mg/L, obteniendo 5.7 brotes/explante; *A. obscura*: 11 brotes/explante; *A. cupreata*: BAP 1.5 mg/L, 10.5 brotes/explante; *A. difformis*: TDZ (Thidiazuron) 0.2 mg/L, 8.5 brotes/explante; *A. karwinskii*: BAP 1.0 mg/L, 6.1 brotes/explante. Por otro lado, Vargas-Valencia (2017) cultivó secciones de tallos de plántulas germinadas *in vitro* de *A. guiengola*, el mayor número de brotes se obtuvo en el tratamiento de BAP 1.5 mg/L con ANA 0.5 mg/L. En la presente investigación con menores concentraciones de RCV y un menor tiempo de inducción (30 días), se obtuvieron cantidades semejantes de plantas regeneradas.

Un número de estudios *in vitro* sobre agaves han sido realizados a partir de semillas (*e.g.*, *A. victoriae-reginae*, *A. guiengola*), esta acción deberá aplicarse a los agaves que con mayor urgencia requieren de ser propagados por su interés para conservación y/o producción comercial (*A. cupreata*, *A. karwinskii*, *A. lurida*, *A. marmorata*), para tratar de encontrar individuos que se adapten a las exigencias y que permitan hacer frente a los eventos del cambio climático, además que pudieran tener características comercialmente deseables. Sin embargo, estas medidas que ya deberían estar siendo aplicadas son limitadas porque la disponibilidad de semillas es muy baja para la cantidad de plantas que son requeridas. Los productores de magueyes y aquellos que se benefician de estas plantas deberán comprometerse seriamente a permitir que al menos un 20 % de sus plantas lleguen a producir semillas. El CTV es una útil alternativa no solo para lograr la propagación vegetativa de individuos seleccionados y para la multiplicación de la variabilidad genética presente en las semillas germinadas, sino también para el desarrollo y aceleración de nuevos métodos de fitomejoramiento.

Los planteamientos experimentales de la presente investigación demostraron que las condiciones de cultivo ensayadas hicieron posible el desarrollo de plantas completas vía directa, así como vía indirecta a través de la reprogramación genética de las células hacia una ruta morfogenética. Las combinaciones de BAP 1.5-2 mg/L con 2,4-D 0.5 mg/L indujeron los mayores números de regenerantes, con la formación de 8.0-12.5 brotes por explante dando un total de 228 brotes a 10 meses después del período de inducción. El tallo fue el órgano más eficiente para lograr la regeneración de *A. potatorum*.

El CTV ha sido reconocido como una útil herramienta biotecnológica para la propagación de una amplia variedad de especies comercialmente cultivadas así como de especies silvestres con fines de conservación, para su aprovechamiento sustentable y con fines de reforestación, lo cual es recomendable y urgente para el caso de *A. potatorum* y de las distintas especies de agaves, de las que se obtienen diversos productos, se comercializan pero que poco o nada se cultivan y sus poblaciones silvestres están desapareciendo. Es urgente poder establecer procedimientos de cultivo *in vitro* y conjuntarlos con los procesos de su cultivo convencional en virtud de que tienen la capacidad de subsistir en suelos pobres, ambientes de alta temperatura y escasa disponibilidad de agua ya que con plantas como éstas podríamos tener una oportunidad y tratar de hacer frente a los cada vez más devastadores efectos cambio climático.

Agradecimientos

A la gente del municipio de Santa María Sola de Vega, Oaxaca, por la donación de semillas de *Agave potatorum*. A Damian Origel Ruiz y Wooden Víctor Velasco Tapia por revisión del análisis estadístico. A Rocío Alvarado por traducción al inglés.

Literatura citada

- Aguirre-Dugua X, Eguiarte LE. 2013. Genetic diversity, conservation and sustainable use of Wilde *Agave cupreata* and *Agave potatorum* extracted for mezcal production in Mexico. *Journal of Arid Environments* **90**: 36-44. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2012.10.018>
- Ayala-Guerrero LM. 2012. *Inducción de embriogénesis somática en cultivo in vitro de Agave atrovirens Karw. Ex Salm-Dyck*. MSc Thesis. Instituto Politécnico Nacional.

- Bautista-Castellanos AI. 2019. *Propagación in vitro, aclimatización y desarrollo en vivero de Agave potatorum Zucc.* MSc Thesis. Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca.
- Davies PJ, Gan S. 2012. Towards an integrated view of monocarpic plant senescence. *Russian Journal of Plant Physiology* **59**: 467-478. DOI: <https://doi.org/10.1134/S102144371204005X>
- Dávila-Figueroa CA, de la Rosa-Carrillo ML, Pérez-Molphe-Balch E. 2005. *In vitro* propagation of eight species or subspecies of *Turbinicarpus* (Cactaceae). *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* **41**: 540-545. DOI: <https://doi.org/10.1079/IVP2005668>
- Delgado-Lemus A, Casas A, Téllez O. 2014. Distribution, abundance and traditional management of *Agave potatorum* in the Tehuacán Valley, Mexico: bases for sustainable use of non-timber forest products. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine* **10**: 1-12. DOI: <https://doi.org/10.1186/1746-4269-10-63>
- Domínguez-Rosales MS, Alpuche-Solís A, Vasco-Mendéz NL, Pérez-Molphe-Balch E. 2008. Effect of cytokinins on the *in vitro* propagation of Mexican Agaves. *Revista Fitotecnia Mexicana* **31**: 317-322.
- Enríquez-del Valle JR, Antonio-Luis KH, Rodríguez-Ortiz G, Campos-Ángeles GV. 2016. Efecto del medio de cultivo y la incubación en las características de plantas de agave micropropagadas. *Ciencia e Investigación Agraria* **43**: 263-272. DOI: <https://doi.org/10.4067/S0718-16202016000200009>
- Fathi A, Tari DB. 2016. Effect of drought stress and its mechanism in plants. *International Journal of Life Sciences* **10**: 1-6.
- Flores-Morales A, Chávez-Avila VM, Jiménez-Estrada M. 2021. Evaluación de una alternativa de propagación de maguey pulquero (*Agave salmiana*) variedad púa larga. *Revista Mexicana de Agroecosistemas* **8**: 46-58, 2021.
- García-Herrera EJ, Méndez-Gallegos SJ, Talavera-Magaña D. 2010. El género *Agave* spp. en México: principales usos de importancia socioeconómica y agroecológica. *Revista Salud Pública y Nutrición* **5**: 109-129.
- García-Mendoza AJ, Franco-Martínez IS. 2018. Actualización de la información de las especies y subspecies de magueyes de Oaxaca, con énfasis en las especies mezcaleras: Fichas técnicas de los agaves de Oaxaca. Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Biología. Informe final SNIB-CONABIO proyecto No. NE012. <http://www.conabio.gob.mx/institucion/proyectos/resultados/InfNE012.pdf> (accessed August 10, 2022).
- García-Mendoza AJ, Franco-Martínez IS, Sandoval-Gutiérrez D. 2019. Cuatro especies nuevas de *Agave* (Asparagaceae, Agavoideae) del sur de México. *Acta Botanica Mexicana* **126**: 1-18. DOI: <https://doi.org/10.21829/abm126.2019.1461>
- Godínez-Hernández CI, Aguirre-Rivera JR, Juárez-Flores BI, Ortiz-Pérez MD, Becerra-Jiménez J. 2016. Extracción y caracterización de fructanos de *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* **22**: 59-72.
- Good-Avila SV, Souza V, Gaut BS, Eguiarte LE. 2006. Timing and rate of speciation in *Agave* (Agavaceae). *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**: 9124-9129. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0603312103>
- Hazra SK, Das S, Das AK. 2002. Sisal plant regeneration via organogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **70**: 235-240. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1016517617039>
- Hernández E. 2021. Aumenta saqueo de agaves en la Reserva de la Biósfera Tehuacán-Cuicatlán. Municipios. <https://shre.ink/Qctr> (accessed August 10, 2022).
- Illsley-Granich C, Torres-García I. 2004. Biología de los magueyes mezcaleros silvestres de semilla. In: Illsley-Granich C, Torres-García I, Hernández-López JJ, Morales-Moreno P, Varela-Álvarez R, Ibáñez-Couoh I, Nava-Xinol H, eds. *Manual de Manejo Campesino de Magueyes Mezcaleros Silvestres*. México: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Grupo de Estudios Ambientales AC, pp. 15-24. ISBN: 978-607-95925-1-6.
- Jiao Y, Kang Y, Yang C, Li D. 2015. Osmosis and its applications. In: Li D, ed. *Encyclopedia of Microfluidics and Nanofluidics*. Springer Science & Business Media pp. 2622-2633. DOI: http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4614-5491-5_1741
- Karpov P. 2004. Clonal propagation of *Yucca aloifolia* L. *Acta Universitatis Latvinensis. Biology* **676**: 177-182. DOI: <https://doi.org/10.13140/2.1.1355.9365>

- Martínez-Jiménez R, Ruiz-Vega J, Caballero-Caballero M, Silva-Rivera ME, Montes-Bernabé JL. 2019. Agaves silvestres y cultivados empleados en la elaboración de mezcal en Sola de Vega, Oaxaca, México. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* **22**: 477-485.
- Martínez-Palacios A, Ortega-Larrocea MP, Chávez-Avila VM, Bye R. 2003. Somatic embryogenesis and organogenesis of *Agave victoriae-reginae*: Considerations for its conservation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **74**: 135-142. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1023933123131>
- Mata-Rosas M, Monroy-de la Rosa MA, Goldammer-Moebius K, Chávez-Avila VM. 2001. Micropropagation of *Turbincarpus laui* Glass et Foster, an endemic and endangered species. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* **37**: 400-404. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11627-001-0070-6>
- Michel-Cuello C. 2010. *Caracterización cuantitativa de los carbohidratos no estructurales del maguey mezcalero potosino (Agave salmiana)*. MSc Thesis, Universidad Autónoma de San Luis Potosí.
- Monja-Mio KM, Robert M. 2013. Direct somatic embryogenesis of *Agave fourcroydes* Lem. through thin cell layer culture. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* **49**: 541-549. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11627-013-9535-7>
- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* **15**: 473-497. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Narváez-Suárez AU, Martínez-Saldaña T, Jiménez-Velázquez MA. 2016. El cultivo de maguey pulquero: opción para el desarrollo de comunidades rurales del altiplano mexicano. *Revista de Geografía Agrícola* **56**: 33-44.
- Rabenda I. 1990. Breaking dormancy in cactus seed. *Cactus and Succulent Journal* **62**: 86-94.
- Ramírez-Mosqueda MA, Cárcamo-Corona RG, Aguilar-Jiménez D, Bello-Bello JJ. 2022. Micropropagation of *Agave (Agave potatorum* Zucc.) through direct organogenesis. *Agrociencia* **56**: 1-10. DOI: <https://doi.org/10.47163/agrociencia.v56i6.2823>
- Rivera-Fuentes BR. 2015. *Cultivo in vitro con fines de conservación de Agave victoriae-reginae T. Moore (Agavaceae)*. BSc Thesis. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Robert M, Herrera-Herrera JL, Castillo E, Ojeda G, Herrera-Alamillo MA. 2006. An efficient method for the micropropagation of *Agave* species. In: Loyola-Vargas VM, Vázquez-Flota F, eds. *Plant Cell Culture Protocols*. Estados Unidos: Humana Press Inc., pp. 165-178. ISBN: 1-59259-959-1.
- Rodríguez-Sahagún A, Acevedo-Hernández G, Rodríguez-Domínguez JM, Rodríguez-Garay B, Cervantes-Martínez J, Castellanos-Hernández OA. 2011. Effect of light quality and culture medium on somatic embryogenesis of *Agave tequilana* Weber var. Azul. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **104**: 271-275. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-010-9815-4>
- Vargas-Valencia AJ. 2017. *Micropropagación de Agave guiengola Gentry, especie endémica amenazada del estado de Oaxaca, México*. BSc Thesis. Universidad Nacional Autónoma de México.

Editor de sección: Martín Mata Rosas

Contribuciones de autor: AGTT participó en la planeación, desarrolló la investigación, escribió el manuscrito. Los otros autores participaron en la planeación, análisis de la investigación, revisión del manuscrito. JAJR. OGC. WJP. SMM. VMCH.