



REGENERACIÓN *in vitro* DE *Agave wocomahi* GENTRY (ASPARAGACEAE)

In vitro REGENERATION OF *Agave wocomahi* GENTRY (ASPARAGACEAE)

Alberto I. Reyes-Silva¹, Héctor Gordon Nuñez-Palenius², Gilberto Ocampo³ y Eugenio Pérez-Molphe-Balch^{1*}

¹Universidad Autónoma de Aguascalientes (UAA), Centro de Ciencias Básicas, Departamento de Química, Aguascalientes, Aguascalientes, México.

²Universidad de Guanajuato, Campus Irapuato-Salamanca, División de Ciencias de la Vida, Departamento de Agronomía, Irapuato, Guanajuato, México. ³UAA, Centro de Ciencias Básicas, Departamento de Biología, Aguascalientes, Aguascalientes, México.

*Autor de correspondencia (eperezmb@gmail.com)

RESUMEN

Agave wocomahi es una especie con potencial de ser aprovechada para diversos fines; sin embargo, la baja eficiencia de sus sistemas naturales de propagación hace que no haya ejemplares disponibles, y la colecta de plantas silvestres pondría bajo amenaza a las poblaciones naturales. Se desarrollaron protocolos para el cultivo y propagación *in vitro* de esta especie. Se indujo la brotación de meristemos laterales cultivando segmentos de tallo en medio basal con 1 mg L⁻¹ de 6-bencilaminopurina (BA); posteriormente, se determinaron las respuestas morfogénicas de explantes de tallo, hoja y raíz. Se establecieron tratamientos con ácido naftalenacético (ANA), ácido indolacético (AIA), ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico (PIC) y ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) en concentraciones de 1.5 y 4.0 mg L⁻¹, solas o en combinación con 1.5 y 3.0 mg L⁻¹ de BA. Se observó la formación de cinco tipos de tejido calloso (TC), de los cuales, el tejido nodular se generó mayormente en explantes de tallo y hoja, y el TC con raíces en explantes de raíz. Los tratamientos con PIC solo, o combinado con BA, generaron una mayor inducción de callo (99.16 %) en explantes de tallo, prevaleciendo el TC nodular. Se generaron brotes adventicios mediante organogénesis directa e indirecta en los tratamientos con AIA; además, se observaron indicios de embriogénesis somática indirecta en callo generado con 1.5 mg L⁻¹ de AIA con 1.5 y 3.0 mg L⁻¹ de BA, con BA solo y en combinación con 2,4-D. El desarrollo de los presuntos embriones hasta plántulas fue favorecido al retirarse los reguladores de crecimiento vegetal y adicionarse 1 g L⁻¹ de carbón activado al medio. Las plantas generadas se adaptaron a las condiciones *ex vitro* con una supervivencia superior al 90 %. Estos protocolos de multiplicación *in vitro* podrían convertirse en una herramienta para el aprovechamiento sostenible de la especie.

Palabras clave: *Agave wocomahi*, embriogénesis somática, organogénesis, tejido calloso.

SUMMARY

Agave wocomahi is a species with the potential to be exploited for various purposes; however, the low efficiency of their natural propagation systems means that there are no specimens available, and the harvesting of wild plants would threaten natural populations. Protocols for *in vitro* culture and propagation of this species were developed. Budding of lateral meristems was induced by culturing stem segments in basal medium with 1 mg L⁻¹ of 6-benzyl amino purine (BA); subsequently, the stem, leaf, and root morphogenic responses explants were determined. Treatments were established with naphthaleneacetic acid (NAA), indoleacetic acid (IAA),

4-amino-3,5,6-trichloropicolinic acid (PIC) and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), in concentrations of 1.5 and 4.0 mg L⁻¹, alone or combined with 1.5 and 3.0 mg L⁻¹ of BA. The formation of five types of callous tissue (TC) was observed, of which the nodular tissue was generated mainly in stem and leaf explants and the TC with roots in root explants. Treatments with PIC, alone or combined with BA, caused higher callus induction (99.16 %) in stem explants, with nodular TC prevailing. Adventitious shoots were generated by direct and indirect organogenesis in the IAA treatments; furthermore, indirect somatic embryogenesis was observed in callus generated with 1.5 mg L⁻¹ IAA with 1.5 and 3.0 mg L⁻¹ BA, with BA alone and in combination with 2,4-D. The development of the presumed embryos into seedlings was favored by removing the plant growth regulators and adding 1 g L⁻¹ of activated charcoal to the medium. The plants generated adapted to *ex vitro* conditions with a survival greater than 90 %. These *in vitro* multiplication protocols could become a tool for the sustainable use of the species.

Index words: *Agave wocomahi*, callus tissue, organogenesis, somatic embryogenesis.

INTRODUCCIÓN

El *Agave wocomahi* se distribuye en la parte norte de la Sierra Madre Occidental en México y ha sido aprovechado por los grupos humanos nativos como Guarijíos y Rarámuris (Gentry, 1972). Las cualidades que le han dado un valor etnobotánico son la presencia de cantidades bajas de sapogeninas y su alto contenido de azúcares, por lo que es utilizado en la elaboración de alimentos y bebidas (Klopper *et al.*, 2010). También se usa en la medicina tradicional, en la elaboración de herramientas y en la obtención de fibras (Gentry, 1972). Si bien estos usos son locales, las características de la especie sugieren que puede ser aprovechada de manera más intensiva; sin embargo, se ha observado una disminución preocupante en algunas de sus poblaciones (González *et al.*, 2009); ésto puede agravarse con la destrucción de su hábitat, sobreexplotación y con el hecho de que su reproducción depende exclusivamente de la producción de semillas, ya que *A. wocomahi* no produce hijuelos (Gentry, 1972).

Las técnicas de cultivo y propagación *in vitro* han ampliado las posibilidades de aprovechamiento de las especies de *Agave*, al garantizar un suministro constante de plantas sin depender de la disponibilidad de hijuelos o semillas (Domínguez *et al.*, 2008a); sin embargo, aún es necesario desarrollar estos procesos para especies de *Agave* poco estudiadas, y hoy ajenas a la explotación intensiva, como es el caso de *A. wocomahi*. La regeneración permite la obtención de plantas completas y viables a partir de los tejidos cultivados *in vitro*. La organogénesis y la embriogénesis somática son dos vías que llevan a la regeneración de plantas en estos sistemas; con la primera es posible regenerar brotes sobre los tejidos cultivados, los que al ser posteriormente enraizados se convierten en plántulas, mientras que la segunda genera embriones a partir de células somáticas, mismos que al germinar se convierten en plantas completas con los polos apical y radical ya formados; tanto la organogénesis como la embriogénesis somática pueden ocurrir directamente sobre el explante inoculado *in vitro*, o bien, a partir de tejido calloso previamente generado; en el primer caso se les llama directas, y en el segundo indirectas (Nuñez-Palenius *et al.*, 2006).

En cuanto al tejido calloso (TC), éste puede generarse a partir de explantes cultivados en presencia de auxinas, en algunos casos combinadas con citocininas; este tejido, además de mantener un crecimiento indiferenciado, presenta características distintivas como consistencia, textura, color, tasa de crecimiento y potencial morfogénico; éstas varían dependiendo de la especie de planta, tipo de explante, así como del tratamiento con reguladores del crecimiento con que se generó. El TC es una herramienta valiosa para diferentes aplicaciones biotecnológicas como la producción de metabolitos de alto valor y la regeneración de plantas completas por las vías antes mencionadas (Huang *et al.*, 2012; Ikeuchi *et al.*, 2013).

En el género *Agave* hay antecedentes de cultivo y regeneración *in vitro* con fines de propagación masiva en varias especies, sobre todo en aquellas cultivadas para la producción de bebidas alcohólicas o fibras. Se ha reportado tanto la producción de brotes directamente sobre los explantes inoculados (Domínguez *et al.*, 2008b; Ramírez-Malagón *et al.*, 2008), como la regeneración indirecta por embriogénesis somática a partir de tejido calloso, esto último en *A. victoria-reginae* (Martínez-Palacios *et al.*, 2003), *A. fourcroydes* (Monja-Mio y Robert, 2013), *A. angustifolia* (Arzate-Fernández *et al.*, 2016), *A. marmorata* (Álvarez-Aragón *et al.*, 2020) y *A. tequilana* (Delgado-Aceves *et al.*, 2021). En este estudio se reporta el cultivo y la regeneración *in vitro* de *A. wocomahi*, especie para la cual no existían antecedentes al respecto.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material genético

Semillas de *A. wocomahi* Gentry, procedentes de la localidad de Basaseachi, Chihuahua, México, fueron desinfectadas y germinadas *in vitro*; para ésto, se lavaron tres veces por 10 min con agua destilada adicionada con 1 % de jabón antiséptico (Dermocleen®); posteriormente, se trataron por 45 s con etanol 70 %, se enjuagaron con agua destilada y se desinfectaron por 25 min con una solución comercial a base de hipoclorito de sodio (Cloralex®) 15 %; finalmente, se enjuagaron con agua destilada estéril e inocularon en un medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962), a pH 5.7, con 30 g L⁻¹ de sucrosa y 8 g L⁻¹ de agar (Sigma-Aldrich®). Este medio basal fue utilizado en todos los experimentos. Las plántulas generadas a partir de las semillas se multiplicaron por brotación de meristemos laterales con el fin de obtener el material vegetal para los experimentos posteriores, debido a que el número de plántulas obtenidas directamente a partir de semillas no fue suficiente. Para esto, se eliminaron las raíces y la parte apical de las hojas. Los segmentos resultantes, conteniendo el tallo y la base de las hojas, se inocularon en medio basal adicionado con 1 mg L⁻¹ de 6-bencilaminopurina (BA) de acuerdo con lo establecido por Domínguez *et al.* (2008b) para otras especies de *Agave*. A los 60-70 d de incubación, los brotes generados se transfirieron a medio basal, sin BA, con el fin de que incrementaran su talla y generaran raíces. Las condiciones de incubación, tanto para la germinación, como para la multiplicación preliminar, fueron 25 ± 2 °C con fotoperiodo de 16 h de luz (54 µmol m⁻² s⁻¹) y 8 h de oscuridad. Las plántulas generadas de esta manera se utilizaron como fuente de explantes para los experimentos que se describen a continuación.

Tratamientos

Con el fin de conocer las respuestas morfogénicas con la presencia de auxinas y citocininas, se usaron como explantes segmentos de 1.0 cm² de hoja, 1.0 cm de raíz y tallos de 1.0 cm cortados longitudinalmente. Los explantes fueron colocados en frascos de vidrio con 30 mL de medio de cultivo basal, adicionado con auxinas y/o citocininas. Se inocularon cinco explantes por frasco y se utilizaron 2 frascos de cada tipo de explante por tratamiento. El experimento completo se realizó por duplicado. Los tratamientos probados fueron 1.5 y 4.0 mg L⁻¹ de ácido indolacético (AIA), ácido naftalenacético (ANA), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) o ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico (picloram o PIC), solos o en combinación con 1.5 y 3.0 mg L⁻¹ de BA. El diseño experimental utilizado fue completamente al azar.

Variables evaluadas

Los cultivos fueron incubados a 25 ± 2 °C en la oscuridad. Transcurridos 60 días de incubación, se determinaron la inducción de callo %IC = (Número de callos / Total de explantes) \times 100, el tipo de tejido calloso generado en cada caso y las respuestas morfogénicas observadas. En aquellos tratamientos que generaron brotes, se determinó el número de éstos por explante. Los brotes generados se transfirieron a medio basal sin reguladores del crecimiento y se incubaron bajo el fotoperiodo antes mencionado para su enraizamiento y crecimiento.

Por otro lado, con el fin de promover el desarrollo de los presuntos embriones somáticos generados, fragmentos de 0.5 cm de diámetro del tejido calloso obtenido fueron colocados en medio basal sin reguladores de crecimiento, solos, o suplementados con 1 g L⁻¹ de carbón activado. Cada fragmento de TC fue considerado como una unidad experimental. Se probó tejido calloso de todos los tratamientos que lo generaron, bajo un diseño experimental completamente al azar. Los cultivos se incubaron a 25 ± 2 °C con un fotoperiodo de 16 h de luz (54 μ mol m⁻² s⁻¹) y 8 h de oscuridad por al menos 60 días; a partir de este tiempo, y hasta el día 120, se registraron las respuestas morfogénicas en los dos medios mencionados y se cuantificó el número de presuntos embriones somáticos desarrollados, considerando sólo aquellos cuya morfología presentara los dos polos característicos de estas estructuras (un ápice y un polo radical bien definido). Los embriones somáticos generados fueron colectados y subcultivados en medio basal (5 presuntos embriones por frasco de cultivo). Se mantuvieron bajo las mismas condiciones de incubación con el fin de alcanzar su maduración y germinación hasta su conversión en plantas.

Durante el proceso de inducción del tejido calloso y del desarrollo de presuntos embriones somáticos (ES) se realizaron colectas para su observación en microscopio electrónico de barrido (MEB) y en un estereoscopio electrónico (Modelo EZ4, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania). Para la microscopía electrónica, los tejidos fueron fijados en amortiguador de fosfatos (0.2 M) con 1.5 % de glutaraldehído durante 24 h, y posteriormente, sometidos a deshidratación gradual durante 10 min en etanol al 70, 80, 90 y 96 %, y durante 30 min en etanol 96 % por dos ocasiones. Las muestras fueron colocadas en una cámara de secado de punto crítico (SMADRI, Tousimis Research Corporation, Rockville, Maryland, EUA) a 63.2 kg cm² y se cambió a 12.1 kg cm² durante 4 min; posteriormente, se colocaron en un cilindro de aluminio y se cubrieron en oro mediante el uso de una mesa de vacío (Denton Vacuum LLC, Moorestown, New Jersey, EUA) con la aplicación de flujo de corriente a un tiempo de 130 s.

Las muestras fueron fotografiadas con un microscopio electrónico de barrido (JSM-5900lv®, Jeol, Tokio, Japón) a 12 kV de aceleración.

Las plantas generadas *in vitro*, con al menos 2 cm de longitud, fueron sacadas del recipiente de cultivo, se eliminaron los restos de medio de las raíces y se transfirieron a charolas de poliestireno (50 cavidades), provistas de un domo transparente y conteniendo sustrato previamente humedecido (turba, perlita y tierra negra en proporciones 1:2:1 v/v/v), se colocaron bajo condiciones de invernadero a una temperatura de entre 25 y 35 °C, con una humedad relativa inicial de 70 %.

El riego se realizó semanalmente los primeros 30 días y subsecuentemente cada dos semanas, hasta que se cumplió un periodo de adaptación de 120 días. En este momento se determinó el porcentaje de supervivencia y las plantas se transfirieron a macetas. Este procedimiento se siguió tanto con las plantas procedentes de brotes enraizados, como con las originadas por presunta embriogénesis somática.

Análisis de la información

Con los resultados de inducción de TC se realizó un análisis de medias mediante proporciones (ANOM); para el número de brotes por explante y supervivencia los datos obtenidos se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) y a una prueba de Tukey ($P \leq 0.05$). En ambos casos se utilizó el programa estadístico Minitab 17 Statistical Software.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las semillas desinfectadas e inoculadas *in vitro* mostraron un 76% de germinación. Las plántulas generadas fueron multiplicadas en medio con 1 mg L⁻¹ de BA con el fin de estimular la brotación de los meristemas laterales. En esta etapa se observó, en promedio, la generación de 11.7 ± 4.8 brotes por explante. Este valor está por encima del intervalo de entre 4.7 y 6.9 brotes por explante reportado por Domínguez *et al.* (2008b) para otras cinco especies de *Agave* tratadas con la misma concentración de BA.

En cuanto a los experimentos con auxinas y citocininas, la respuesta morfogénica observada con mayor frecuencia fue la generación de tejido calloso (Cuadro 1). Con respecto a los tipos de explante evaluados, el tallo fue el que mostró la mayor inducción de callo (IC), con 73.2 %, mientras que la raíz presentó la menor con 52.1 %. En cuanto a las auxinas, el PIC y el ANA fueron los que generaron mayor IC, seguidos del 2,4-D y AIA. Se observó generación de callo tanto en tratamientos con las auxinas

solas, como combinadas con BA. En otras especies, como *A. angustifolia*, se ha reportado que la generación de callo requiere de la combinación de una auxina con bajas concentraciones de una citocinina, en concreto BA (Arzate-Fernández y Mejía-Franco, 2011).

Con respecto al tipo de tejido calloso generado, considerando el total de los diferentes tratamientos y tipos de explante, se obtuvo una IC global de 66 %. El TC de tipo nodular (Figura 1A) fue el más observado, con 44.7 %, seguido del TC con raíz (Figura 1B), compacto (Figura 1C), friable (Figura 1D) y con presencia de brotes (Figura 1E). La anterior clasificación del TC fue propuesta por Ikeuchi *et al.*, (2013), y sólo se añadió el TC tipo "nodular" con el objeto de describir a un callo con presencia de formas semiesféricas, de consistencia blanda, que ya ha sido reportado en estudios previos con especies de agave (Álvarez-Aragón *et al.*, 2020). Con respecto a las auxinas probadas, con el uso del ANA se obtuvo un TC abundante de color predominantemente blanco, con generación de raíces en prácticamente todos los explantes. Este resultado sugiere que en el género *Agave* existe una fuerte influencia de ANA en el desarrollo de este tipo de TC, ya que también ha sido reportado en *A. fourcroydes* (Monja-Mio y Robert, 2013) y en *A. sisalana* (Nikam, 1997). Los tratamientos con PIC generaron abundante tejido calloso, en su mayoría de aspecto nodular, respuesta similar a la observada en los tratamientos con 2,4-D en explantes de tallo, hoja y raíz. En este caso el TC mostró un color amarillo, lo que difiere parcialmente con lo obtenido por Arzate-Fernández y Mejía-Franco (2011), quienes obtuvieron TC "duro" en color blanco-amarillo perlado y otros "suaves y friables" en color blanco cremoso en *A. angustifolia*, al utilizar distintas concentraciones de 2,4-D; posiblemente, estas diferencias se deben a los distintos genotipos, así como en los explantes utilizados, ya que estos autores utilizaron embriones cigóticos como explantes. A pesar de que el AIA es la auxina más estudiada en plantas, ésta ha sido escasamente utilizada en la inducción de TC en especies de *Agave*, sólo Nikam (1997) ha reportado la obtención de TC y posterior organogénesis con AIA en *A. sisalana*.

En el presente estudio, el uso de la auxina natural AIA mostró una IC de 40 % en explantes de hoja, 30 % en tallo y 10 % en raíz, valores menores que los obtenidos con las auxinas sintéticas. El TC generado con AIA fue también más heterogéneo en cuanto a morfología y color con respecto al obtenido con las otras auxinas. En la mayoría de los tratamientos con AIA se obtuvo un TC de consistencia friable. Sobre este tejido se observaron respuestas morfogénicas como la generación de estructuras similares a brotes adventicios (Figura 2A) y a embriones somáticos en diferentes etapas de desarrollo (Figura 2B). Estos presuntos embriones se separan

fácilmente del tejido calloso que generaron (Figura 2C); lo anterior resulta de interés, ya que pone de manifiesto que una misma auxina genera diferentes respuestas, tanto organogénicas como embriogénicas en explantes de tallo, hoja y raíz de *A. wocomahi*. Lo anterior sugiere la existencia de distintos mecanismos morfogénicos presentes no sólo en especies distintas pertenecientes a un mismo género, sino incluso a distintos tejidos de una misma planta, lo que coincide con Cancino-García *et al.* (2020), quienes mencionaron que deben existir diferentes mecanismos de inducción de TC entre especies de agaves, lo cual puede estar relacionado también con variaciones en los niveles endógenos de auxinas y citocininas. Los tratamientos que sólo incluían BA mostraron una baja IC, 32 % en tallo y 8 % en hoja, no habiendo respuesta en explantes de raíz. Se observó la generación de TC tanto friable como compacto. El tejido friable fue capaz de generar estructuras similares a embriones somáticos (Figura 2D).

Además de las respuestas descritas, en varios de los tratamientos se observó producción de brotes a través de organogénesis, tanto directa como indirecta, predominantemente en explantes de tallo y hoja; ésto ocurrió en tratamientos con BA sola o combinada con AIA y ANA (Cuadro 2). En general, la eficiencia de esta vía de regeneración fue baja (máximo 2.1 brotes por explante), pero el hecho de que se presente en esta especie es de interés, ya que en el género predominan los reportes de regeneración a partir de yemas laterales o por embriogénesis somática (Domínguez *et al.*, 2008a).

En los experimentos con auxinas y citocininas se observaron estructuras similares a embriones somáticos en diferentes etapas de desarrollo, ésto en callo generado a partir de explantes de tallo y hoja tratados con BA, sola o combinada con 2,4-D y AIA. Al transferir estas estructuras a medio basal carente de reguladores del crecimiento, sólo o adicionado con carbón activado, se observó su desarrollo hasta convertirse en plantas completas, con un polo apical y uno radical bien definidos (Cuadro 3 y Figura 2E). El 2,4-D, que indujo esta respuesta en *A. wocomahi* (Figura 2F) es la auxina más utilizada para inducir TC embriogénico en el género *Agave* (Cancino-García *et al.*, 2020), aun cuando García *et al.*, (2019) recomiendan el uso de PIC como inductor de callo embriogénico en sustitución del 2,4-D, con la finalidad de evitar los problemas que se presentan con esta auxina, principalmente anomalías en los embriones somáticos. Cabe señalar que el efecto del PIC ha sido poco estudiado en agaves, sólo Monja-Mio y Robert (2013) han reportado su uso para la generación de embriogénesis directa en *A. fourcroydes*; sin embargo, en *A. wocomahi* los tratamientos con PIC no generaron tejido calloso con potencial embriogénico, lo que sí se observó

Cuadro 1. Inducción de tejido calloso utilizando AIA, ANA, 2,4-D o PIC, solos o en combinación con BA, en explantes de tallo, hoja y raíz de *Agave wocomahi*.

| 2, 4-D | Tratamiento (mg L ⁻¹) | | | | Tallo | | Hoja | | Raíz | |
|--------------------------|-----------------------------------|-----|-----|-----|-------|------|-------|------|-------|------|
| | PIC | AIA | ANA | BA | IC% | Tipo | IC% | Tipo | IC% | Tipo |
| - | - | - | - | - | 0 | NA | 0 | NA | 0 | NA |
| - | - | - | - | 1.5 | 22 | CC | 8 | CF | 0 b | NA |
| - | - | - | - | 3.0 | 32 | CF | 8 | CC | 0 b | NA |
| 1.5 | - | - | - | - | 75 | CC | 85 | CN | 70 | CC |
| 1.5 | - | - | - | 1.5 | 100 a | CN | 90 | CN | 55 | CN |
| 1.5 | - | - | - | 3.0 | 90 | CN | 85 | CN | 55 | CN |
| 4.0 | - | - | - | - | 95 | CN | 80 | CC | 45 | CC |
| 4.0 | - | - | - | 1.5 | 95 | CC | 80 | CN | 50 | CN |
| 4.0 | - | - | - | 3.0 | 100 a | CN | 95 | CN | 55 | CC |
| - | 1.5 | - | - | - | 100 a | CN | 95 | CN | 95 a | CN |
| - | 1.5 | - | - | 1.5 | 100 a | CN | 100 a | CN | 90 a | CF |
| - | 1.5 | - | - | 3.0 | 95 | CN | 90 | CC | 70 | CN |
| - | 4.0 | - | - | - | 100 a | CN | 90 | CN | 100 a | CC |
| - | 4.0 | - | - | 1.5 | 100 a | CN | 95 | CN | 90 a | CC |
| - | 4.0 | - | - | 3.0 | 100 a | CN | 85 | CN | 80 | CC |
| - | - | 1.5 | - | - | 30 b | CF | 40 b | CF | 0 b | NA |
| - | - | 1.5 | - | 1.5 | 20 b | CF | 35 b | CF | 10 b | CC |
| - | - | 1.5 | - | 3.0 | 10 b | CC | 10 b | CF | 5 b | CC |
| - | - | 4.0 | - | - | 30 b | CF | 20 b | CF | 0 b | NA |
| - | - | 4.0 | - | 1.5 | 25 b | CF | 50 | CC | 0 b | NA |
| - | - | 4.0 | - | 3.0 | 5 b | CC | 55 | CC | 0 b | NA |
| - | - | - | 1.5 | - | 100 a | CR | 100 a | CR | 80 | CR |
| - | - | - | 1.5 | 1.5 | 100 a | CR | 95 | CR | 95 a | CR |
| - | - | - | 1.5 | 3.0 | 95 | CN | 100 a | CR | 90 a | CR |
| - | - | - | 4.0 | - | 100 a | CR | 100 a | CR | 80 | CR |
| - | - | - | 4.0 | 1.5 | 85 | CR | 95 | CR | 85 | CR |
| - | - | - | 4.0 | 3.0 | 100 a | CR | 100 a | CR | 55 | CR |
| %IC por tipo de explante | | | | | 73.2 | | 72.5 | | 52.1 | |

Análisis de medias ANOM ($P \leq 0.05$), $n = 20$; a: indica diferencia estadística con respecto a la proporción general considerando el límite de decisión superior, b: indica diferencia estadística con respecto a la proporción general considerando el límite de decisión inferior. IC: inducción de callo, CN: callo nodular, CC: callo compacto, CR: callo raíz, CF: callo friable, NA: no aplica, BA: benciladenina, PIC: ácido 4-amino-3,5,6-tricloro-2-piridincarboxílico, AIA: ácido indolacético, ANA: ácido naftalenacético, 2,4-D: ácido 2,4-diclorofenoxiacético.

fue la inducción de estructuras similares a embriones somáticos a partir de un TC suave-friable inducido con 3.0 mg L⁻¹ de BA procedente de explantes de tallo. En este caso también se obtuvieron plantas completas al eliminar los reguladores de crecimiento del medio (Figura 2G). El efecto positivo de la BA en la generación de embriones somáticos se ha reportado previamente en *A. marmorata* (Álvarez-Aragón *et al.*, 2020) y *A. sisalana* (Nikam *et al.*, 2003). Finalmente, la combinación de 1.5 mg L⁻¹ de AIA con 1.5 y

3.0 mg L⁻¹ de BA generó el mayor número de estructuras similares a embriones somáticos. Su desarrollo hasta plantas completas también fue favorecido al retirarse los reguladores de crecimiento y adicionarse carbón activado al medio basal (Cuadro 3).

La mayor eficiencia observada en esta vía de regeneración fue cuando fragmentos de callo generado en explantes de tallo sometidos a 1.5 mg L⁻¹ de AIA con

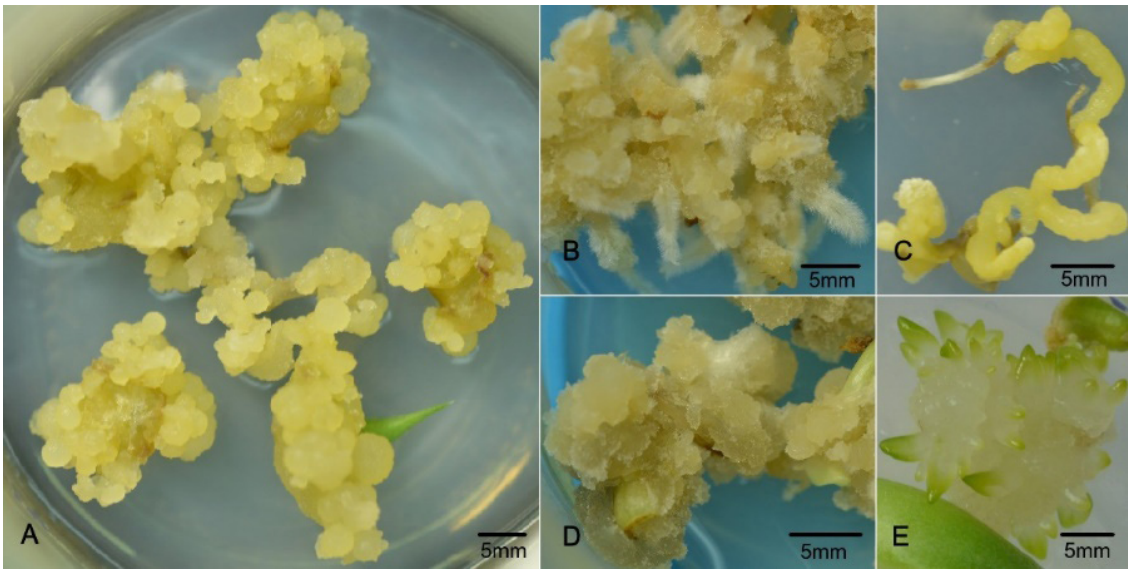


Figura 1. Tipos de tejido calloso en *Agave wocomahi*. A) nodular en explante de hoja, B) con raíz en explante de tallo, C) compacto en explante de raíz, D) friable en explante de tallo, E) con brotes en explante de tallo.

Cuadro 2. Efecto del tipo y concentración de reguladores de crecimiento vegetal en la generación de brotes por organogénesis en *Agave wocomahi*.

| Tratamiento (mg L ⁻¹) [†] | | | Brotes por explante | | |
|--|-----|-----|---------------------|----------|----------|
| AIA | ANA | BA | Tallo | Hoja | Raíz |
| — | — | — | 0.25 cdef | 0.0 f | 0.05 ef |
| — | — | 1.5 | 2.10 a | 0.0 f | 0.00 f |
| — | — | 3.0 | 1.40 ab | 0.3 cdef | 0.00 f |
| 1.5 | — | — | 0.60 bcdef | 0.0 f | 0.00 f |
| 1.5 | — | 1.5 | 1.05 bcd | 0.0 f | 0.10 def |
| 1.5 | — | 3.0 | 1.00 bcde | 0.0 f | 0.00 f |
| 4.0 | — | — | 0.35 cdef | 0.0 f | 0.00 f |
| 4.0 | — | 1.5 | 1.15 abc | 0.1 def | 0.00 f |
| 4.0 | — | 3.0 | 0.95 bcdef | 0.0 f | 0.00 f |
| — | 1.5 | — | 0.20 cdef | 0.0 f | 0.00 f |
| — | 1.5 | 1.5 | 0.15 def | 0.0 f | 0.00 f |
| — | 1.5 | 3.0 | 0.60 bcdef | 0.0 f | 0.00 f |
| — | 4.0 | — | 0.10 def | 0.0 f | 0.00 f |
| — | 4.0 | 1.5 | 0.05 ef | 0.0 f | 0.00 f |
| — | 4.0 | 3.0 | 0.25 cdef | 0.0 f | 0.00 f |

Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (Tukey, $P \leq 0.05$). n = 20. [†]Se probaron los mismos tratamientos que se describen en el Cuadro 1, pero sólo se incluyen aquellos que generaron brotes. BA: benciladenina, AIA: ácido indolacético, ANA: ácido naftalenacético.

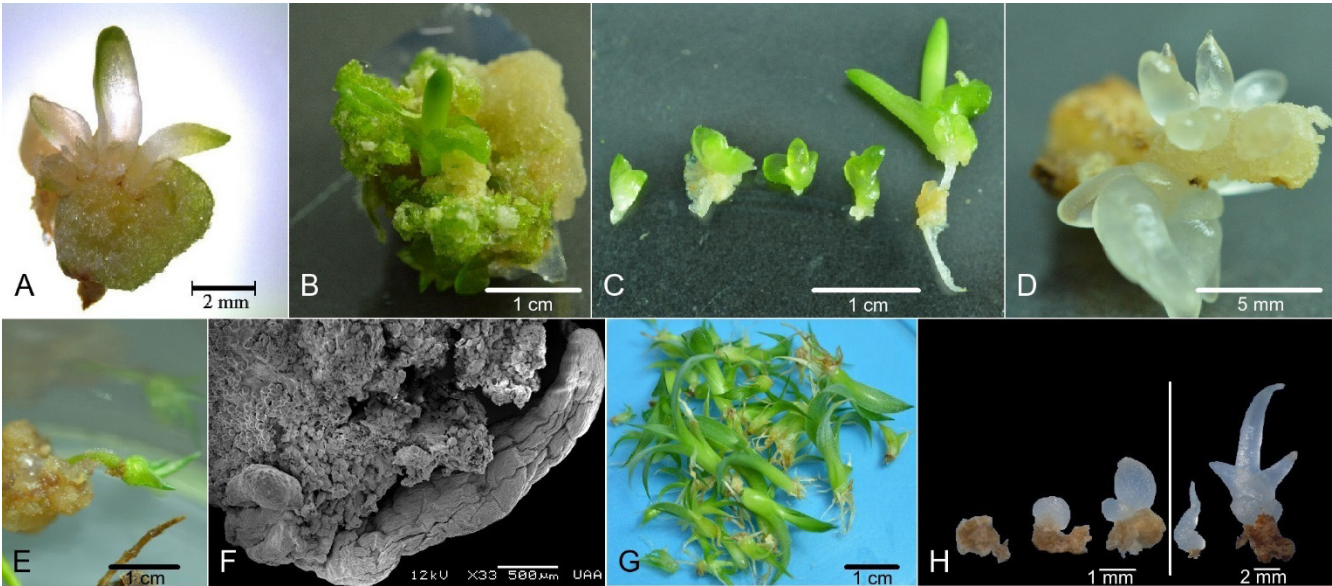


Figura 2. Respuestas morfogénicas en *Agave wocomahi*. A) organogénesis indirecta (brotes) inducida con 1.5 mg L⁻¹ de AIA en tallo, B) presuntos embriones somáticos visualizados entre el tejido calloso, C) embriones ya separados del tejido calloso, obtenidos con 1.5 mg L⁻¹ de AIA con 1.5 mg L⁻¹ de BA en tallo, D) estructuras similares a embriones somáticos obtenidos con 3.0 mg L⁻¹ de BA en tallo incubado en la oscuridad, E) presunta embriogénesis somática indirecta inducida con 1.5 mg L⁻¹ de AIA con 1.5 mg L⁻¹ de BA en hoja, F) imagen de microscopía electrónica de barrido en tejido calloso con presencia de un posible embrión somático inducido con 4.0 mg L⁻¹ de 2,4-D con 1.5 mg L⁻¹ de BA en hoja, G) plantas generadas a partir de presuntos embriones somáticos obtenidos en tallo inducido con 3.0 mg L⁻¹ de BA, H) estructuras similares a las etapas de la embriogénesis somática (de izquierda a derecha): calo embriogénico, embrión globular, embrión coleoptilar, embrión escutelar y embrión maduro, obtenidas a partir de tejido incubado en condiciones de oscuridad.

Cuadro 3. Desarrollo de presuntos embriones somáticos a partir de tejido calloso en *Agave wocomahi*.

| Tratamiento de inducción de TC (mg L ⁻¹) [†] | Explante evaluado | N | Medio de cultivo para desarrollo de ES | Media de ES desarrollados por explante |
|---|-------------------|----|--|--|
| 3.0 (BA) | TC-Tallo | 10 | MS | 5.0 ± 4.47 |
| 1.5 (2,4-D) / 1.5 (BA) | TC-Tallo | 5 | MS+CA | 1.2 ± 0.74 |
| 4.0 (2,4-D) / 1.5 (BA) | TC-Hoja | 10 | MS+CA | 0.8 ± 0.39 |
| 1.5 (AIA) / 1.5 (BA) | TC-Tallo | 15 | MS | 5.5 ± 1.02 |
| | TC-Hoja | 5 | MS+CA | 5.3 ± 1.24 |
| | TC-Hoja | 5 | MS | 0.8 ± 0.58 |
| 1.5 (AIA) / 3.0 (BA) | TC-Tallo | 5 | MS | 4.8 ± 1.83 |
| | TC-Hoja | 5 | MS+CA | 16.4 ± 1.89 |
| | TC-Hoja | 5 | MS+CA | 4.0 ± 1.87 |
| 4.0 (AIA) / 3.0 (BA) | TC-Hoja | 5 | MS | 0.6 ± 0.60 |

Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (Tukey, P ≤ 0.05), N: número de explantes de TC evaluados, ± EE (error estándar) de la media. [†]Se probaron los mismos tratamientos que se describen en el Cuadro 1, pero sólo se incluyen aquellos que generaron presuntos embriones somáticos. TC: tejido calloso, ES: presuntos embriones somáticos, BA: benciladenina, AIA: ácido indolacético, 2,4-D: ácido 2,4-diclorofenoxiacético, MS: medio de cultivo Murashige y Skoog, CA: carbón activado.

3.0 mg L⁻¹ de BA fueron transferidos a medio basal con carbón activado. En este caso se obtuvo un promedio de 16.4 ± 1.89 plantas por fragmento de callo. Reyes-Díaz *et al.* (2017) reportaron la obtención de hasta 34 embriones somáticos por explante en *A. angustifolia*; también, en esta misma especie, Arzate-Fernández y Mejía-Franco (2011) mencionaron la generación de un total de 216 embriones somáticos mediante el uso de 3.0 mg L⁻¹ de 2,4-D en combinación de 1.0 mg L⁻¹ de BA; sin embargo, estos últimos autores no precisan el número promedio de plantas obtenidas por porción de tejido calloso, por lo que sus valores no son comparables de forma directa con la eficiencia reportada para *A. wocomahi*. Finalmente, la aparición de estructuras similares a embriones en diferentes etapas de desarrollo (Figura 2H), fácilmente disgregables del tejido calloso (Figuras 2B y 2C), y con capacidad de desarrollarse en plantas completas con sus polos apical y radical bien diferenciados (Figura 2G) parecen indicar que ocurrió embriogénesis somática; de tratarse de brotes generados por organogénesis, carecerían del polo radical y tendrían que haber sido enraizados antes de transferirlos a sustrato; sin embargo, para demostrar sin lugar a duda que lo que se observó fue embriogénesis somática se requeriría de estudios histológicos completos a lo largo de todas las etapas de desarrollo antes mencionadas.

Las plantas generadas a partir de presuntos embriones somáticos alcanzaron una supervivencia de 97.3 % *ex vitro*. La totalidad de estas plantas mostraron un desarrollo normal, similar al de las plantas generadas a partir de meristemos basales, cuya tasa de supervivencia fue de 100 % (Figura 3). Estos resultados reflejan que dicha tasa no limita la posibilidad de supervivencia *ex vitro* y desarrollo inicial normal de las plantas generadas, lo cual coincide con lo observado en otras especies de agave (Arzate-Fernández *et al.*, 2016).

CONCLUSIONES

Se reporta por vez primera la regeneración *in vitro* de *Agave wocomahi*. Esto se logró a través de la brotación de meristemos laterales en explantes de tallo a través de organogénesis y por medio de estructuras similares a embriones somáticos generadas en tejido calloso, que se convirtieron en plantas completas al transferirlas a un medio sin reguladores de crecimiento. Las plantas generadas *in vitro* procedentes de brotes enraizados y las presuntamente originadas por embriogénesis somática fueron capaces de adaptarse a las condiciones externas y desarrollarse en suelo de manera normal. Estos protocolos permitirían la generación de plantas en número suficiente para que esta especie pueda ser aprovechada sin poner en riesgo a sus poblaciones silvestres.

BIBLIOGRAFÍA

- Álvarez-Aragón C., A. M. Arzate-Fernández, S. Y. Martínez-Martínez e I. Martínez-Velasco (2020) Regeneración de plantas de *Agave marmorata* Roezl vía embriogénesis somática. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 23:36.
- Arzate-Fernández A. M. y R. Mejía-Franco (2011) Capacidad embriogénica de callos inducidos en ejes embrionarios cigóticos de *Agave angustifolia* Haw. *Revista Fitotecnia Mexicana* 34:101-106, <https://doi.org/10.35196/rfm.2011.2.101>
- Arzate-Fernández A. M., J. L. Piña-Escutia, T. H. Norman-Mondragón, J. I. Reyes-Díaz, K. L. Guevara-Suárez y L. M. Vázquez-García (2016) Regeneración de agave mezcalero (*Agave angustifolia* HAW.) a partir de embriones somáticos encapsulados. *Revista Fitotecnia Mexicana* 39:359-366, <https://doi.org/10.35196/rfm.2016.4.359-366>
- Cancino-García V. J., J. H. Ramírez-Prado and C. De-la-Peña (2020) Auxin perception in *Agave* is dependent on the species' Auxin Response Factors. *Scientific Reports* 10:3860, <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60865-y>
- Delgado-Aceves L., M. T. González-Arno, F. Santacruz-Ruvalcaba, R. Folgado and L. Portillo (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., M. L. González J., C. Rosales G., C. Quiñones V., S. Delgadillo D. L., S. J. Mireles O. y E. Pérez-Molphe B. (2008a) El



Figura 3. Plantas de *Agave wocomahi* adaptadas a condiciones *ex vitro*. A) plantas procedentes de brotes enraizados, B) plantas regeneradas por embriogénesis somática.

- 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., A. G. Alpuche S., N. L. Vasco M. y E. Pérez-Molphe B. (2008b) Efecto de citocininas en la propagación *in vitro* de agaves mexicanos. *Revista Fitotecnica Mexicana* 31:317-322, <https://doi.org/10.35196/rfm.2008.4.317>
- García C., A. A. F. de Almeida, M. Costa, D. Britto, R. Valle, S. Royaert and J. P. Marelli (2019) Abnormalities in somatic embryogenesis caused by 2,4-D: an overview. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 137:193-212, <https://doi.org/10.1007/s11240-019-01569-8>
- Gentry H. S. (1972) The Agave Family in Sonora. Agriculture Handbook No. 399. Agricultural Research Service, USDA. Washington, D.C. 195 p.
- González E. M., R. Galván V., I. L. López E., L. Reséndiz R. y M. S. González E. (2009) Agaves: Magueyes, lechuguillas y noas del estado de Durango y sus alrededores. CIIDIR IPN Unidad Durango-CONABIO. Durango, México. 163 p.
- Huang W. L., C. H. Lee and Y. R. Chen (2012) Levels of endogenous abscisic acid and indole-3-acetic acid influence shoot organogenesis in callus cultures of rice subjected to osmotic stress. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 108:257-263, <https://doi.org/10.1007/s11240-011-0038-0>
- Ikeuchi M., K. Sugimoto and A. Iwase (2013) Plant callus: mechanisms of induction and repression. *The Plant Cell* 25:3159-3173, <https://doi.org/10.1105/tpc.113.116053>
- Klopper R. R., G. F. Smith, E. Figueiredo and N. Crouch (2010) Notes on *Agave palmeri* Engelm. (Agavaceae) and its allies in the Ditepalae. *Bradleya* 2010:53-66, <https://doi.org/10.25223/brad.n28.2010.a8>
- Martínez-Palacios A., M. P. Ortega-Larrocea, V. M. Chávez and R. Bye (2003) Somatic embryogenesis and organogenesis of *Agave victoriae-reginae*: considerations for its conservation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 74:135-142, <https://doi.org/10.1023/A:1023933123131>
- 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>
- Murashige T. and F. Skoog (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473-497, <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Nikam T. D. (1997) High frequency shoot regeneration in *Agave sisalana*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 51:225-228, <https://doi.org/10.1023/A:1005976304198>
- Nikam T. D., G. M. Bansude and K. C. Aneesh Kumar (2003) Somatic embryogenesis in sisal (*Agave sisalana* Perr. ex. Engelm). *Plant Cell Reports* 22:188-194, <https://doi.org/10.1007/s00299-003-0675-9>
- Núñez-Palenius H. G., D. J. Cantliffe, H. H. Klee, N. Ochoa-Alejo, R. Ramírez-Malagón and E. Pérez-Molphe (2006) Methods in plant tissue culture: In: Food Biotechnology. 2nd edition. K. Shetty, G. Paliyath, A. Pometto and R. E. Levin (ed.). CRC Taylor & Francis Group. New York, USA. pp:553-601.
- Ramírez-Malagón R., A. Borodanenko, L. Pérez-Moreno, M. D. Salas-Araiza, H. G. Núñez-Palenius and N. Ochoa-Alejo (2008) *In vitro* propagation of three *Agave* species used for liquor distillation and three for landscape. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 94:201-207, <https://doi.org/10.1007/s11240-008-9405-x>
- Reyes-Díaz J. I., A. M. Arzate-Fernández, J. L. Piña-Escutia and L. M. Vázquez-García (2017) Media culture factors affecting somatic embryogenesis in *Agave angustifolia* Haw. *Industrial Crops and Products* 108:81-85, <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.06.021>