

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE AGRONOMÍA
DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA



Potencial biotecnológico del *Agave montana* Villarreal (Asparagaceae) en el cultivo *in vitro*

Por:

MARCELA VARGAS CRUZ

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN AGROBIOLOGÍA

Saltillo, Coahuila, México.

Diciembre, 2022.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE AGRONOMÍA
DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA

Potencial biotecnológico del *Agave montana* Villarreal (Asparagaceae) en el cultivo *in vitro*

Por:

MARCELA VARGAS CRUZ

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN AGROBIOLOGÍA

Aprobada el Comité de Asesoría



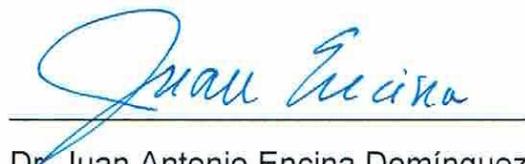
Dra. Aida Isabel Leal Robles

Asesor Principal



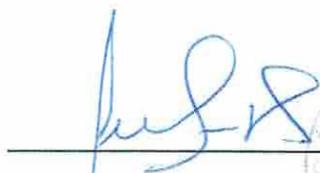
Dr. Alonso Méndez López

Coasesor



Dr. Juan Antonio Encina Domínguez

Coasesor



Dr. Jerónimo Landeros Flores

Coordinador Interino de la División de Agronomía



Saltillo, Coahuila, México.

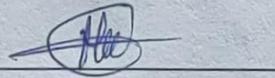
Diciembre, 2022.

Derechos de Autor y Declaración de no plagio

Todo material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor de los Estados Unidos Mexicanos, y pertenece al autor principal quien es el responsable directo y jura bajo protesta de decir verdad que no se incurrió en plagio o conducta académica incorrecta en los siguientes aspectos:

Reproducción de fragmentos o textos sin citar la fuente o autor original (corta y pega); reproducir un texto propio publicado anteriormente sin hacer referencia al documento original (auto plagio); comprar, robar o pedir prestados los datos o la tesis para presentarla como propia; omitir referencias bibliográficas o citar textualmente sin usar comillas; utilizar ideas o razonamientos de un autor sin citarlo; utilizar material digital como imágenes, videos, ilustraciones, gráficas, mapas o datos sin citar al autor original y/o fuente. Así mismo tengo conocimiento de que cualquier uso distinto de estos materiales como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Por lo anterior nos responsabilizamos de las consecuencias de cualquier tipo de plagio en caso de existir y declaramos que este trabajo no ha sido previamente presentado en ninguna otra institución educativa, organización, medio público o privado.



Marcela Vargas Cruz

AGRADECIMIENTOS

Le agradezco a Dios por haberme acompañado y guiado a lo largo de mi carrera.

A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro por abrirme las puertas y brindarme las herramientas necesarias para formarme como profesionalista.

A mi asesor de tesis, Dr. Aida Isabel Leal Robles por su apoyo y enseñanzas que me brindo durante el desarrollo de la investigación.

A mis maestros les doy las gracias por todas las enseñanzas impartidas, por los infaltables consejos y por los conocimientos que han contribuido para enriquecer mi conocimiento.

A las grandiosas personas con las que conviví en el internado Femenil Hidalgo, Belem, Feliciana, Aranza, Mariana, Susana, Alison y Diana; que formaron parte de esta travesía, apoyándome en momentos difíciles dándome ánimos por eso y más gracias.

A mis amigos Lulú, Paty y en especial a Lázaro, por bríndame su amistad, su apoyo incondicional en cada uno de los momentos.

DEDICATORIA

A mis padres Paulino y Eida por apoyarme en todo momento, por los valores que me han inculcado, y por haberme dado la oportunidad de tener una excelente educación en el transcurso de mi vida. Sobre todo, gracias a mi padre por ser mi ejemplo de constancia y dedicación y a mi madre por ser mi fortaleza e inspiración diaria.

A mis hermanos Eduardo y Liseth por ser parte importante de mi vida y representar la unidad familiar y por llenar mi vida de alegrías y amor cuando más lo he necesitado.

ÍNDICE DE CONTENIDO

Contenido	3
AGRADECIMIENTOS	4
DEDICATORIA	5
ÍNDICE DE CONTENIDO	6
ÍNDICE DE CUADROS	8
ÍNDICE DE FIGURAS	9
RESUMEN	11
1. INTRODUCCIÓN	12
2. OBJETIVOS	14
3. HIPÓTESIS	14
4. REVISIÓN DE LITERATURA	15
4.1. Generalidades	15
4.1.1. Descripción de la familia Asparagaceae	15
4.1.2. Descripción de la subfamilia Agavoideae	15
4.1.3. Distribución de las Agaváceas	16
4.2. Genero <i>Agave</i>	17
4.2.1. Descripción del género <i>Agave</i>	17
4.3. Fisiología y ecología del género <i>Agave</i>	20
4.3.1. Fisiología de los agaves	20
4.3.2. Importancia ecológica de los agaves	21
4.4. Usos de los agaves	23
4.5. <i>Agave montana</i>	26
4.5.1. Descripción de <i>Agave montana</i>	26
4.5.2. Distribución de <i>Agave montana</i>	28
4.5.3. Importancia económica de <i>Agave montana</i>	29
4.6. Técnicas de Biotecnología vegetal aplicada a las plantas del género <i>Agave</i>	30
4.6.1. Cultivo <i>in vitro</i>	30
4.6.2. Medios de cultivo	35
4.6.3. Micropropagación	39
4.6.4. Tipos de cultivo	43
4.6.5. Otras aplicaciones de la biotecnología en los agaves	45
5. MATERIALES Y MÉTODOS	47

5.1. Material biológico (semillas)	47
5.2. Caracterización física de las semillas	47
5.3. Prueba de viabilidad de semillas	47
5.4. Cultivo <i>in vitro</i>	48
5.4.1. Desinfección de las semillas:	48
5.4.2. Elaboración de Medio MS para germinación:	49
5.4.3. Esterilización del medio MS y material de soporte:	50
5.4.4. Siembra y germinación <i>in vitro</i>	50
5.5. Micropropagación	51
5.5.1. Soluciones de Reguladores de crecimiento	51
5.5.2. Elaboración de medio para micropropagación (MS adicionado con ANA + BAP)	51
5.5.3. Esterilización de medios y material de soporte.	52
5.5.4. Siembra de explantes para la obtención de callos.	52
5.6. Enraizamiento	53
5.6.1. Elaboración de medios para enraizamiento (MS + ANA)	53
5.6.2. Esterilización de medios y material de soporte.	53
5.6.3. Enraizamiento de plántulas obtenidas a partir de callos.	54
5.7. Aclimatación	54
5.7.1. Preparación de sustrato y trasplante	54
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	56
6.1. Caracterización física de las semillas	56
6.2. Prueba de viabilidad de semillas	56
6.3. Velocidad y porcentaje de germinación	58
6.4. Micropropagación	62
7. CONCLUSIONES	67
8. LITERATURA CITADA	68
Anexos	80

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1: Usos que se les da a varias especies de agaves, productos y parte de la planta empleada (Fuente: García, Méndez, y Talavera, 2001. El género <i>Agave</i> spp. en México)	23
Cuadro 2: Antecedentes sobre el cultivo y propagación <i>in vitro</i> de especies del género <i>Agave</i> , (Ordaz et al. 2008).	32
Cuadro 3: Resultados más destacados y tiempo de obtención de brotes en estudios de cultivo <i>in vitro</i> en agaves mezcaleros (Nakamura, 1990).	33
Cuadro 4: Resultados obtenidos realizando conteos diarios del número de semillas germinadas (IVG).	60
Cuadro 5: Medidas máximas, mínimas y promedio de las plántulas germinadas <i>in vitro</i> .	62
Cuadro 6: Promedio de callos formados por repetición.	63
Cuadro 7: Registro de medidas en longitud (L) y ancho (A) de semillas de <i>Agave montana</i> .	80
Cuadro 8: Establecimiento <i>in vitro</i> de la primera siembra (8 de febrero de 2021) y tiempo correspondiente de germinación de las semillas.	80
Cuadro 9: Establecimiento <i>in vitro</i> de la segunda siembra (22 de febrero de 2021) y el tiempo de germinación de las semillas.	80
Cuadro 10: Establecimiento <i>in vitro</i> de la tercera siembra (19 de marzo de 2021) y el tiempo de germinación de las semillas.	81
Cuadro 11: Establecimiento <i>in vitro</i> de la primera siembra (8 de febrero de 2021) medidas de las plántulas obtenidas de la primera repetición.	81
Cuadro 12: Establecimiento <i>in vitro</i> de la segunda siembra (22 de febrero de 2021) medidas de las plántulas obtenidas de la segunda repetición.	81
Cuadro 13: Establecimiento <i>in vitro</i> de la tercera siembra (19 de marzo de 2022) medidas de las plántulas obtenidas de la tercera repetición.	82

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Representación gráfica de la diversidad de agaves en México (tomada de CONABIO, 2021).	16
Figura 2: Morfología del maguey (agaves), (Tomado de García-Mendoza, 2007).	19
Figura 3: <i>Agave montana</i> A. Hoja. B. bráctea. C. flor, corte longitudinal. D. flor y E. capsula (Tomada de Villareal, 1996).	27
Figura 4: Fotografía del <i>Agave montana</i> en su hábitat natural. (Tomada de: https://WWW.naturalista.mx/taxa/290757-Agave montana Alejandro Huereca-Algunos derechos reservados (CC BY-NC-ND))	29
Figura 5: Esquema del proceso de micropropagación (Fuente: http://ocw.udl.cat/enginyeria-i-arquitectura/fructicultura/continguts-1/-7/monografia-no-7-cap.-6.-microprop.-y-otros-metodos).	31
Figura 6: Enjuagues con diferentes detergentes para la correcta desinfección de las semillas.	49
Figura 7: Reactivos y equipo básico (balanza analítica y plancha electromagnética) para la preparación del medio de cultivo MS.	50
Figura 8: Siembra de semillas en medio MS.	51
Figura 9: Siembra de semillas en medio MS.	53
Figura 10: Trasplante de callos a medio de cultivo para enraizamiento.	54
Figura 11: A) Semilla de <i>Agave montana</i> , B) Registro de medida (Archivo personal).	56
Figura 12: Semillas viables (tinción roja) e inviables (blancas) analizadas por la prueba de sal de tetrazolio (Archivo personal).	57
Figura 13: Respuesta de germinación <i>in vitro</i> , realizada por triplicado (Archivo personal).	58
Figura 14: Resultados de número de semillas germinadas e índice de velocidad de germinación.	59
Figura 15: Ecuación para cálculo del IVG (Maguire 1962).	59
Figura 16: Porcentaje de germinación <i>in vitro</i> de semillas.	60
Figura 17: Respuesta de formación de callos en <i>in vitro</i> , realizada por triplicado (Archivo personal).	62

Figura 18: Brotes derivados de los callos e inducción de raíces en las plántulas obtenidas *in vitro*. 65

Figura 19: Brotes generados se logró en medio basal con reguladores del crecimiento. 66

RESUMEN

Agave montana Villarreal, es una especie de maguey nativos que además de ser importante en la vegetación de alta montaña en los últimos años, se ha utilizado para la obtención de bebidas alcohólicas (mezcal) derivadas de los azúcares que producen. La extracción de plantas del medio silvestre, sin ningún manejo puede llevar a la pérdida de sus poblaciones, aunado a los factores que limitan la multiplicación masiva por métodos convencionales. Por lo anterior, es necesario buscar alternativas que favorezcan su multiplicación y limiten el uso indiscriminado de las plantas silvestres, siendo la micropropagación una técnica adecuada que permite la clonación a gran escala, pero dentro de cultivos *in vitro*, obteniendo plantas sanas y libres de patógenos. El objetivo fue establecer el protocolo de cultivo *in vitro* a partir de la germinación *in vitro* de las semillas de *A. montana*, seguido de la micropropagación utilizando tejido meristemático y desarrollando nuevas plántulas vía organogénesis indirecta (callos) seguido de la inducción de raíces dentro del sistema *in vitro*. Los resultados de los ensayos dan cuenta de que las semillas tienen un bajo porcentaje de germinación (26.6%) el cual disminuyó conforme pasa el tiempo de almacenamiento, Con; respecto a su establecimiento *in vitro* se observó la inducción exitosa de callos al cultivar explantes de meristemo apical de plántulas jóvenes en un medio MS adicionado con 30 g/L⁻¹ de sacarosa, 0.5 mg/L⁻¹ de ácido naftalenacético (ANA) y 0.3 mg/L⁻¹ de bencilaminopurina (BAP) el 4.43 g/L⁻¹, seguido de la fragmentación de los callos para subcultivarlos y obtener brotes. Las plántulas obtenidas a partir de callos se trasplantaron en frascos con medio MS (4.43 g/L⁻¹) adicionado con 0.5 mg/L⁻¹ de ANA (para la inducción de raíces) y 15 g/L⁻¹ de sacarosa. Las plántulas enraizadas se aclimataron en sustrato relación 8-1-1 (peatmoss, vermiculita y perlita) hidratado y esterilizado. La obtención de plántulas completas a partir del cultivo *in vitro* es una alternativa para su aprovechamiento racional y una estrategia de conservación de las plantas silvestres y con ello del ecosistema del que forman parte.

Palabras clave: *Agave montana*; ácido naftalenacético; 6-bencilaminopurina; micropropagación, conservación.

1. INTRODUCCIÓN

En México varias especies de magueyes se han cultivado desde épocas prehispánicas, es así que a partir de la colonia inició su uso como materia prima para la obtención de bebidas espirituosas, fibra, sustancias químicas, entre otras; incluso considerándolo una planta ornamental (Colunga-García Marín *et al.*, 2007), siendo prácticas que en la actualidad se conservan. Los agaves suelen ser plantas de lento crecimiento, su propagación es a través de hijuelos adventicios, bulbillos y semillas. La producción de semillas y bulbillos se realiza una vez en el ciclo de vida de la planta al alcanzar la madurez (6 a 10 años). Algunos autores consideran que la reproducción sexual como un método ineficiente en el género, debido a que tienen un ciclo de vida que se considera largo, por lo tanto, se asume una problemática para su desarrollo y producción en viveros por lo que demanda mucho tiempo, mantenimiento y espacio (Rosales *et al.*, 2008a).

En algunos cultivos de *agave*, en México, se han presentado factores que limitan la multiplicación masiva por métodos convencionales, por lo que se han buscado alternativas para la aplicación de técnicas que favorecen la propagación y el mejoramiento. Derivadas de la biotecnología vegetal podemos considerar a la micropropagación como una técnica que aporta mayores ventajas, ya que consiste en la clonación por lo tanto mantiene las características genotípicas del progenitor, además; la multiplicación ocurre en lapsos cortos y poco espacio en comparación a la multiplicación tradicional, y se obtienen plantas sanas y libres de patógenos. La biotecnología aporta otras técnicas de propagación que pueden resultar importantes para el mejoramiento y conservación de los agaves (Domínguez-Rosales *et al.*, 2008).

En el presente trabajo se realizó la revisión bibliográfica del potencial biotecnológico que tiene una especie de agave de reciente identificación, que aún no se ha domesticado, pero, ya se ha comenzado a utilizar en la producción de mezcal en la zona norte de México, por lo que se debe de tener un mayor conocimiento de su biología y respuesta de propagación para posteriormente proponer su aprovechamiento racional y un programa de conservación. Además, se presentan los resultados obtenidos de cuatro etapas del cultivo *in vitro*, así

como de la aclimatación a condiciones *ex vitro*, considerando que la propagación de *A. montana* a partir de la germinación de semillas y su posterior micropropagación es un hecho viable y reproducible, por otra parte, también se demuestra la gran capacidad de adaptación de las plántulas obtenidas bajo condiciones *in vitro* a las condiciones fuera del medio en cultivo.

2. OBJETIVOS

Objetivo General

- Establecer un protocolo de cultivo *in vitro* para el aprovechamiento y conservación de *Agave montana* Villarreal.

Objetivos Específicos

- Conocer la respuesta de germinación de las semillas de *A. montana* al cultivarlas *in vitro*.
- Establecer el protocolo para la micropropagación a partir de tejidos meristemático vía organogénesis indirecta (callos).
- Enraizar las plántulas obtenidas a partir de callos para su posterior aclimatación *ex vitro*.

3. HIPÓTESIS

Si se proveen las condiciones nutricionales y ambientales a las semillas sembradas en un medio de cultivo nutritivo, adicionado con fitohormonas y bajo condiciones asépticas, entonces se promoverá la germinación y el desarrollo de plántulas que posteriormente servirán como explantes viables en el proceso de micropropagación.

4. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1. Generalidades

4.1.1. Descripción de la familia Asparagaceae

Las especies se caracterizan por ser erectas o subardentas, mayormente herbáceos a leñosos perennes o anuales; rizoma corto, simpodial, a veces suculento y fusiforme; tallos ásperos y duros, raramente entrelazados, a veces espinosos, derivado de ramas u hojas laterales modificadas, con ramas laterales transformadas en filocladas en forma de hoja, o tallos modificados (estructuras asimilatorias) fasciculados, verdes, delgados y en forma de aguja; Raíces cilíndricas o fusiformes, raíces laterales a veces tuberosas, cubiertas por un velamen múltiple; Flores en fascículos o nacidas solas, bisexuales o unisexuales y monoicas o dioicas (Kubitzki, y Rudall, 1998; Van Jaarsveld y Egli, 2019).

4.1.2. Descripción de la subfamilia Agavoideae

La subfamilia Agavoideae, de acuerdo con Dahlgren *et al.*, (1985) está formada por un grupo de plantas con o sin tallos aparentes, con hojas suculentas, coriáceas o herbáceas, en rosetas, flores bisexuales y semillas de color negro. Rzedowski (1978) menciona que las especies de agaváceas son propias de los ecosistemas áridos y semiáridos de México donde se, presenta un alto grado de endemismo. Sin embargo, esta familia se distribuye en casi todos los ambientes, incluyendo áreas tropicales y templadas.

La subfamilia Agavoideae se ha dividido en nueve géneros taxonómicos (*Agave* L., *Beschorneria* Kunth, *Furcraea* Vent., *Hesperaloe* Engelm., *Hesperoyucca* Engelm. *Manfreda* Salisb., *Polianthes* L., *Prochnyanthes* S. Watson y *Yucca* L), de los cuales se reconocen cerca de 346 especies que se distribuyen en el continente americano (García-Mendoza y Galván, 1995; Bogler *et al.*, 2006;

Good-Avila *et al.*, 2006). De las cuales (75%) se encuentran en México (García-Mendoza, 2011).

4.1.3. Distribución de las Agaváceas

El género *Agave* es endémico de América, descrito por Carlos Lineo en 1753, a partir de la especie *Agave americana*; las especies se distribuyen desde los 34 ° Latitud Norte hasta los 60 ° Latitud Sur, es decir desde el sur de los Estados Unidos de América hasta Colombia y Venezuela, incluyendo las Antillas. En México, los agaves están distribuidos en el norte y centro, así como en la región de Tehuacán-Cuicatlán, desde el nivel del mar hasta los 3400 m de elevación; se han descrito 261 especies y de estas, aproximadamente el 70% son endémicas (García-Mendoza, 2007) además nuestro país es el centro de origen y de la diversificación de las especies de agave (figura 1).

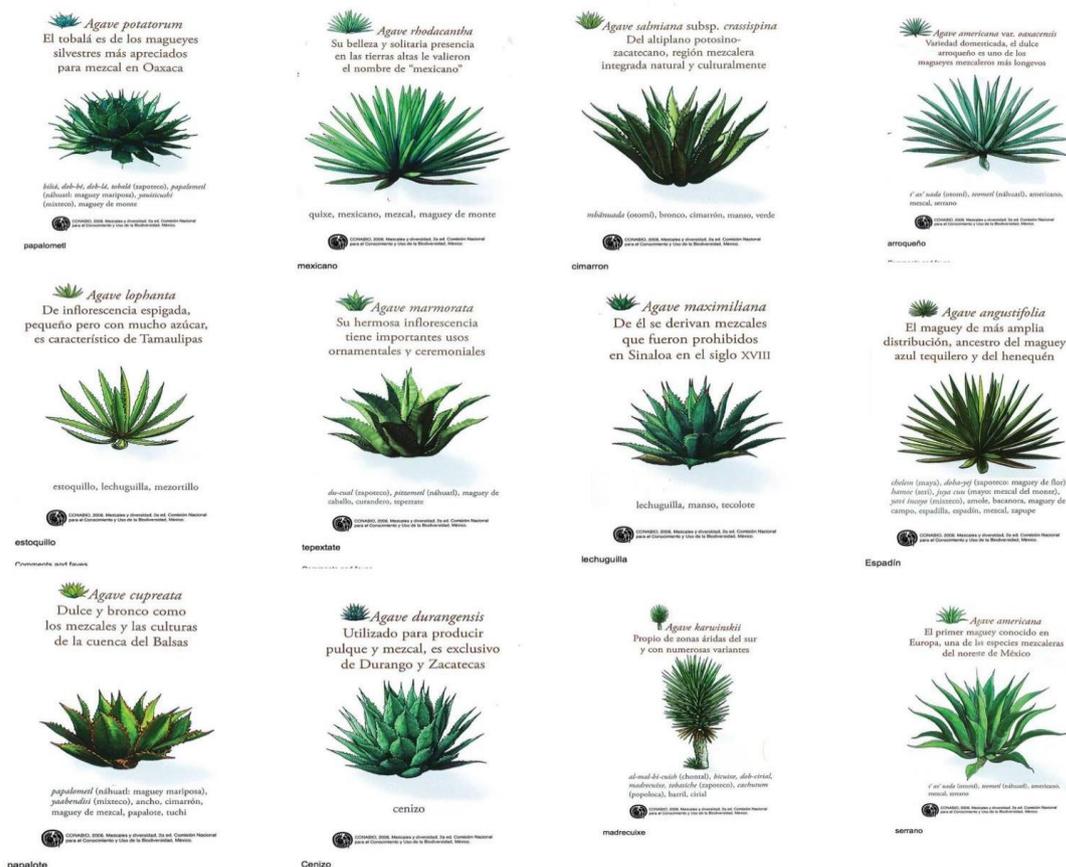


Figura 1: Representación gráfica de la diversidad de agaves en México (tomada de CONABIO, 2021).

4.2. Genero *Agave*

4.2.1. Descripción del género *Agave*

El género *Agave* propuesto por Linnaeus (1753) fue ubicado en la Clase VI, Hexandria Monogynia. A continuación, fue incluido en diferentes familias, como Amaryllidaceae (Bentham y Hooker, 1883; Trelease, 1920; Pax y Hoffman, 1930), Agavaceae (Dumortier, 1829; Hutchinson, 1934; Takhtajan, 1980; Cronquist, 1981; Dahlgren et al., 1985; Lott y García-Mendoza, 1994; Verhoek, 1998; Reveal y Hodgson, 2002; García-Mendoza, 2011; Reveal, 2012). En los últimos años, con base en evidencias morfológicas y moleculares en Asparagaceae, subfamilia Agavoideae (APG III, 2009; APG IV, 2016). No obstante, su ubicación taxonómica aún es controversial por tanto Asparagaceae presenta una morfología heterogénea y desde un punto de vista molecular aún no está bien caracterizada (APG III, 2009; Chase *et al.*, 2009; Reveal, 2012).

El género *Agave* se divide en 2 subgéneros *Littaea* y *Agave*, el primero se reconoce por las inflorescencias espiciformes o racemosas, mientras que, el segundo presenta inflorescencias paniculadas con las flores agrupadas en umbelas laterales (Gentry, 1982; Castorena-Sánchez, 1985).

La morfología de los agaves (figura 2) de acuerdo con la descripción de Johnson y Steiner (2000) y García-Mendoza (2011) es la siguiente:

- Tallos. Son gruesos pero cortos, simples, en las plantas postradas ramificados o con vástagos estoloníferos o intrafoliares, raíces fibrosas.
- Hojas. En roseta, densas o laxas, lineares, lanceoladas espatuladas u ovadas, ápice con espina terminal o ligeramente endurecido, margen ocasionalmente con mamilas, dentado, denticulado, córneo o filífero, rígidas, lisas, estriadas o escabrosas, suculentas o fibrosas, generalmente glabras.

- Flores. bisexuales, protándricas, pediceladas o sésiles, erectas, epíginas, succulentas, constreñido sobre el ovario, verdosas, amarillentas, blanquecinas o purpúreas, en pares o de 2 a 40 flores por inflorescencias;
- Tépalos. De 6 a 2-verticilados, similares, imbricados, libres o fusionados en un pergonio tubular, hipocrateriforme, infundibuliforme o campanulado, ápice recto o recurvado; nectarios 3;
- Estambres. Cuenta con 6, libres o insertos en el tubo, exertos, filamentos filiformes, anteras dorsifijas, versátiles, dehiscencia longitudinal;
- Ovario. Cilíndrico o triquétero, prolongado en un cuello, 3-carpelar, 3-locular, óvulos numerosos, anátropos, en dos series por lóculo; estilo exerto, filiforme, estigma 3-lobado, glandular papiloso.
- Cápsulas. Por lo general son monocárpicas, leñosas, dehiscencia loculicida septifragal.
- Semillas. Lunulares, triangulares aplanados, angostamente aladas en su porción convexa, negras, brillantes
- Inflorescencias. Presentan una inflorescencia, integrado por un escapo 8 alto, semi leñoso y una terminal en forma en espiga o panoja donde se encuentran las flores. Al ser monocárpicas, la florescencia acontece sólo una vez en su existencia, que, dependiendo de la especie, sucede entre los 5 y los 20 años. Las inflorescencias son de apariencia paniculada y de estructura racemosa. Existe una tendencia hacia el aumento de los racimos compuestos y otra hacia la reducción de las ramas laterales de segundo y tercer orden con una consiguiente condensación de las flores (Álvarez, 1986). El grado de ramificación se incrementa del ápice a la base, de tal manera, que dan una apariencia piramidal o cónica. Las flores son bisexuales, epíginas, campaniformes, con seis tépalos, agrupados en dos series; los tépalos internos poseen una costilla a central gruesa a lo largo de su longitud; los filamentos están engrosados en su parte basal y el estilo es basalmente grueso y triquetro. Los bulbillos son bracteados o foliosos; los bracteados son masivos y no emiten hojillas evidentes al

momento de madurar en la inflorescencia, mientras que, los foliosos producen hojillas desde que son muy joven es, su forma y tamaño son estados de carácter importantes para separar especies.

El tamaño de las inflorescencias es también tan variable como especies existen, y generalmente guarda proporción con el tamaño de la roseta, y aunque se ha especificado que la división de los subgéneros es por la forma de la inflorescencia, realmente en muchas especies del subgénero *Littaea* y algunas del subgénero *Agave*, tienen una forma intermedia definida taxonómicamente como racemo-paniculada (Gentry, 1982).

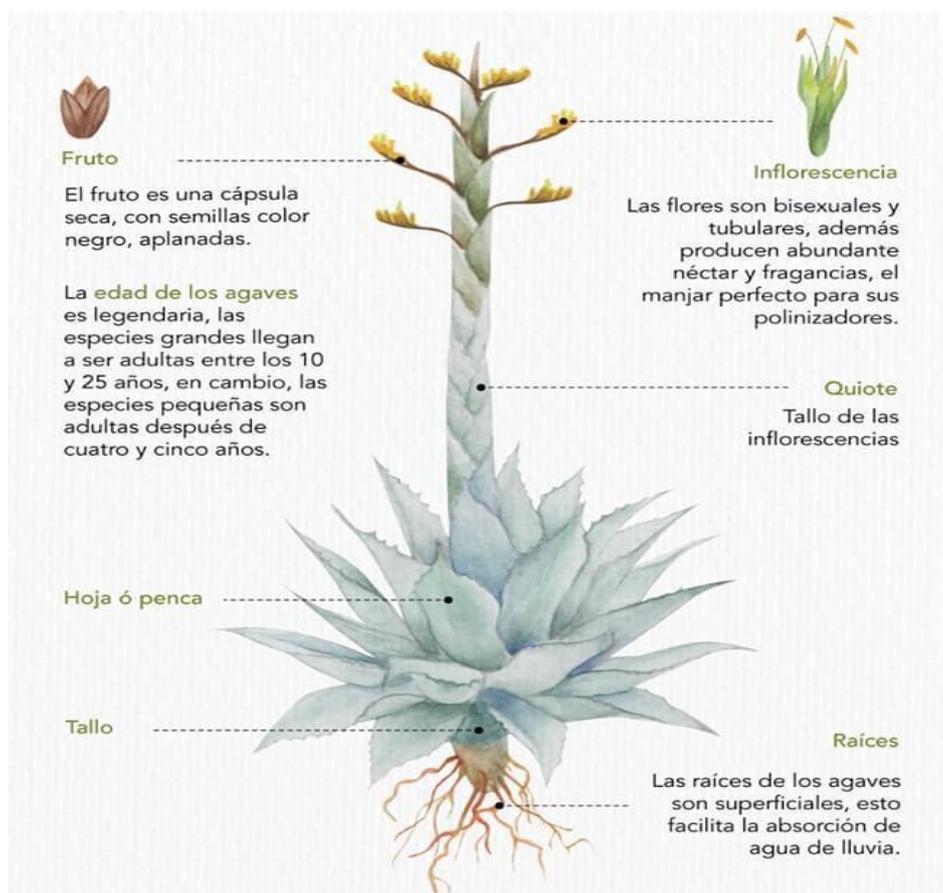


Figura 2: Morfología del magüey (agaves), (Tomado de García-Mendoza, 2007).

De acuerdo con Nobel (1996), existen diversas formas de propagación de las plantas de *Agave*, entre las cuales, pueden ser apomixis, bulbillos, rizomas, hijuelos o semilla. En el caso de *Agave tequilana* Weber se observó que su forma de propagación ha sido por hijuelos, ya que por semilla el porcentaje de germinación es de 4 a 6 %. Esto no sucede para el caso de *Agave durangensis*, donde se encontró que el porcentaje de la germinación por semillas es de 94 a

96%, mientras que su propagación por hijuelos es de 4 a 6 hijos por planta, a partir de 3 o 4 años.

Cuando se reproduce a partir de un rizoma, se observa que sale de la base de la planta que, al estar al ras del suelo, le da el sol y entonces, crece una yema que da origen a un hijuelo. La producción de frutos y semillas es grande en los agaves; producen hasta 65,000 semillas, y una vez maduras son dispersadas por el viento. La mayoría de los agaves se propaga de manera asexual, produciendo clones en diferentes partes de la roseta o la inflorescencia. Los hijuelos se desarrollan en la base de la planta, o mediante estolones emergen a alguna distancia de la planta madre, producen raíces y, con el tiempo, crecen de manera independiente (García-Mendoza, 2007).

4.3. Fisiología y ecología del género *Agave*

4.3.1. Fisiología de los agaves

La alta productividad de varias especies de *Agave*, junto con su uso de la vía CAM (por sus siglas en inglés *Crassulacean Acid Metabolism*), ha llevado a algunos a creer que pueden usarse para resolver problemas ambientales urgentes y necesidades energéticas (Borland *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2015). La vía CAM permite a los agaves colonizar ambientes semiáridos donde el agua es escasa y las temperaturas de la superficie del suelo a menudo superan los 55 ° C (Nobel, 1996).

De manera general el mecanismo de fijación de carbono denominado CAM se refiere a que las plantas abren sus estomas durante la noche (cuando el potencial hídrico de pérdida es bajo) permitiendo la entrada de CO₂ uniéndose a una molécula de piruvato formando oxalacetato seguido de malato, este último se almacena en forma de ácido málico en vacuolas para posteriormente, en el día se libere el CO₂ y se utilice en las reacciones del ciclo de Calvin. La importancia ecológica de la fijación nocturna del CO₂ radica en su contribución a la sobrevivencia de las mismas plantas, al proveer un mecanismo de recirculación interna de CO₂ en condiciones de sequía severa, que evita la

inhibición del aparato fotosintético, cuando el cierre de las estomas impide la absorción del CO₂ externo. Además, la vía CAM contribuye a la producción de materia orgánica y crecimiento de la planta (Granados, 1993).

También, la naturaleza suculenta y rica en fibra de las hojas de agave permite la continuación del CO₂ fijación y otras reacciones bioquímicas vitales durante períodos prolongados de sequía, que pueden durar hasta 7 años o más (Lüttge, 2004; García-Mendoza, 2007; Matiz *et al.*, 2013). Conjuntamente, la disposición en roseta de las hojas de agave permite una absorción máxima de la radiación fotosintéticamente activa (Nobel, 1994) y permite la canalización del agua hacia sus sistemas radiculares relativamente poco profundos (Gentry, 1982; Matiz *et al.*, 2013).

Las raíces de los agaves pueden encogerse en respuesta al secado de los suelos, minimizando la pérdida de agua (Nobel y Sanderson, 1984), pero también pueden generar raíces finas para permitir una rápida absorción de agua después de un evento de lluvia de corta duración (North y Nobel, 1998). Mientras, las hojas muertas se acumulan en la base de los agaves, amortiguando el tejido foliar vivo de las altas temperaturas de la superficie del suelo, que pueden oscilar entre 50 y 55 ° C (Nobel, 1994). Es probable que las hojas muertas de agave también contribuyan a reducir la evaporación del suelo y aumentar la materia orgánica del suelo. El género también tiene el potencial de servir como modelo para determinar cómo los cultivos tolerantes a la sequía podrían ayudar a resolver las disparidades entre los recursos cada vez más escasos y las necesidades sociales apremiantes, particularmente al conectar los sistemas de cultivos tradicionales con los enfoques agrícolas modernos (Dubé *et al.*, 2014).

4.3.2. Importancia ecológica de los agaves

En el grupo Agavaceae existente una gran diversidad de morfologías florales y de polinizadores como murciélagos, colibríes, abejas y palomillas (Eguiarte *et al.*, 2000). Las variaciones en la morfología floral entre muchas de sus especies, pero en general la mayoría de sus flores presentan colores que van desde el verde claro al amarillo y en algunos casos rojo. La producción de polen y néctar

es principalmente de noche con concentraciones de azúcares bajas entre 12 y 25 °Brix (Rocha *et al.*, 2005). También presentan olores similares a frutas maduras y un alto contenido proteico en el polen (Howell, 1972; Gentry, 1982; Eguiarte *et al.*, 2000; Slauson, 2001). Estas adaptaciones florales permiten que se establezcan tendencias a polinizadores quiropterófilos (Faegri y Van Der Pijl 1979).

Los primeros estudios de polinización realizados en los agaves se desarrollaron en 1970 en los Estados Unidos de América, el agave más abundante fue polinizado por murciélagos y moscos (Howell, 1972; Faegri y Van Der Pijl, 1979; Gentry, 1982). Otros estudios como los de Schaffer y Schaffer (1977), demuestran que especies de *Agave* del subgénero *Litsea* son polinizadas por insectos y aves, principalmente abejas y colibríes (Rocha *et al.*, 2005).

Las plantas se desarrollan mejor, tanto a nivel individual como poblacional, sobre planicies extensas con suelos aluviales, de profundidad y textura medias y pH de neutro a ligeramente alcalino. Conviven también con variados tipos de vegetación, destacando entre otros: la vegetación xerófila, pastizales, matorrales, bosques, etc. Generalmente forma grupos o conglomerados dispersos dentro de la vegetación de pastizal y se le encuentra combinado con nopaleras y matorral micrófilo. Puede encontrarse lo mismo en sitios con altitudes de 300 msnm, que en lugares situados a más de 3000 msnm (Gentry, 1982). Gracias a su capacidad para desarrollarse sobre afloramientos rocosos y en áreas de suelo muy somero, los magueyes y lechuguillas actúan como generadores, conservadores y retenedores de suelo. Adicionalmente, juegan un papel central como fuente de sustento y de hábitat para una amplia gama de organismos (insectos, aves, pequeños mamíferos, microorganismos).

Para los animales, como los insectos, murciélagos o colibríes dependen de estas plantas, ya que en las hojas anchas se almacena el agua de lluvia, que no sólo le provee líquido a la misma planta, sino que sirve de sustento para estos animales y otros más (Eguiarte y González 2007).

4.4. Usos de los agaves

Las especies de *Agave* tienen gran importancia etnobotánica y económica. La conservación de su diversidad genética es importante desde diversos puntos de vista, desde los ambientales y éticos para mantener la biodiversidad. Se requiere que exista suficiente variación genética sobre la cual ir obteniendo las características que se pretenden mejorar (Eguiarte y González, 2007).

Los agaves se han utilizado durante siglos como fuente de alimento, bebida, destiladas o fermentadas a partir de su savia (pulque, mezcal y tequila medicina, extracción de fibras duras de las hojas (ixtle), combustible, ornato, construcción de viviendas, cercados e implementos agrícolas, entre otros usos (Gentry, 1982; Ojeda y Ludlow, 1995; Alanís-Flores y González-Álvarez 2010; García-Mendoza, 2007; Castillo-Quiroz *et al.*, 2007. Esta gran cantidad de usos le han merecido nombres como “árbol de la vida” y “árbol de las maravillas”, asimismo a formando parte de la cultura y religión de muchos pueblos indígenas (Granados, 1993).

Cuadro 1: Usos que se les da a varias especies de agaves, productos y parte de la planta empleada (Fuente: García, Méndez, y Talavera, 2001. El género *Agave* spp. en México)

	USO	PARTE DE LA PLANTA
CONSTRUCCION	Cercas, casas, corrales	Escapo floral (quite)
	Tejas. Canales para coleccionar agua de lluvia	Hojas
	Materiales compuestos: resinas termoplásticas o termófilas, fibras.	Residuos de fibra
FIBRAS	Cordelería, y cestería. Escobetillas y cepillos para limpieza. Estropajos, tejido y vestuario.	Fibras de hoja
ORNAMENTAL	Arcos florales	Fibras de las hojas
	En jardines, calles.	Planta completa
DOMESTICO	Jabón o detergente para trastes y ropa.	Hojas, tallos y raíces
	Macetas, recipientes para agua	Hojas, tallos (piña)
OTROS USOS	Industria química, farmacéutica, medicamentos y productos esteroides (saponinas).	Hojas, raíces, tallo y semilla.

	Productos de celulosa para papel. Producción de etanol, celulosa y glucosados	Hojas (pulpa, residuos del desfibramientos, bagazo) Jugos
--	---	---

De acuerdo con García *et al.* (2010) existen cuatro formas de aprovechamiento de los agaves, importantes por la generación de recursos económicos y a continuación se describen:

1. El aprovechamiento de las fibras. Un importante número de personas viven aún de esta actividad, ya sea produciendo la fibra del henequén, el sisal o la lechuguilla.
2. La venta de plantas de *Agave* con fines de ornato, actividad que en lo económico es difícil de cuantificar, pero no difícil de imaginar, ya que por doquier se pueden ver un amplio número de especies comercializadas, que van de las especies de gran tamaño, como *Agave salmiana* y *Agave americana* principalmente en su variedad *marginata*, a pequeñas, como *Agave striata*.
3. La extracción y aprovechamiento del aguamiel o tecuátl en náhuatl, que quizá sea el uso más antiguo, junto con la elaboración y consumo del aguamiel fermentado, conocido como pulque u octli en nahuatl, bebida ligada a la espiritualidad en el México prehispánico.
4. En la época colonial, el pulque perdió su noción religiosa y la alta demanda originó las haciendas pulqueras, que, en una cultura opuesta al origen de la bebida, fomentaron el consumo, hasta que fue desplazada por la cerveza. El aprovechamiento del aguamiel y del pulque se está modernizando, y empieza a ser una alternativa inclusive de exportación. Las plantas solitarias que forman rosetas son ideales para cultivar en contenedores decorativos y como plantas decorativas en lugares soleados.

Aunado a lo anterior se ha destacado que un número importante de especies de *Agave*; se utilizan en la elaboración de mezcal o tequila y representa una actividad *económica* en potencia para el desarrollo de las regiones productoras de agave. El maguey está disponible para su uso en la elaboración de mezcal cuando adquiere una edad entre los 7 y los 12 años (punto de madurez

fisiológica), lo que varía según la especie y de las condiciones agroecológicas y ambientales a las que hayan sido expuestos (García *et al.* 2010).

Para el aprovechamiento de los agaves, se ha explotado su capacidad reproductiva, de manera general la propagación de los agaves en campo puede darse de tres vías diferentes, y dependerá del tipo de especie (CONABIO 2006).

1) Propagación por semillas: Las semillas, son producto de la fecundación de los óvulos, esto se da cuando la planta produce un tallo floral y las flores funcionan como hembra y macho a la vez; primero funciona como macho y produce polen y después de unos días se comporta como hembra al recibir el polen y de esta manera se da la fertilización de los óvulos para luego generar nuevas plantas en donde heredan los genes de la planta madre y los genes de la planta de la que proviene el polen, hay variabilidad genética en la descendencia.

2) Propagación por hijuelos: Los hijuelos brotan a partir de las raíces o tallos subterráneos de la planta madre, estos hijuelos emergen antes de que la planta madre florezca, es decir las plantas producen hijuelos a lo largo de su vida antes de llegar a la floración, esta es una de las maneras más eficientes de propagación de manera natural.

3) Propagación por bulbilos: Los bulbilos, se desarrollan en las yemas que dejan las flores que se secan sin haber generado frutos. La propagación natural presenta dos dificultades, 1) baja reproducibilidad por bulbilos o hijuelos, 2) las actividades antropogénicas son la principal amenaza que se presenta en la propagación de estas especies, sobre todo cuando los productores cortan las plantas antes de llegar a su floración para aprovechar el azúcar de la piña y las hojas, provocando de esta manera que no se generen semillas, bulbilos o hijuelos.

4.5. *Agave montana*

4.5.1. Descripción de *Agave montana*

Agave montana es una de las especies descrita en años recientes, fue registrada en las partes altas en altitudes superiores a los 2,800 m en la Gran Sierra Plegada en el noreste de México (Villarreal 1996). De acuerdo con la descripción de la especie se puede clasificar taxonómicamente:

Reino: *Plantae*

División: *Magnoliophyta*

Clase: *Liliopsida*

Orden: *Asparagales*

Familia: *Agaváceae* o *Asparagaceae*

Subfamilia: *Agavoideae*

Género: *Agave*

Subgénero: *Agave*

Especie: *A. montana* Villarreal

Nombre común: Maguey de montaña

Las características morfológicas y fisiológicas más representativas de *Agave montana* son las siguientes: plantas semélparas, no se reproducen por hijuelos, sino que lo hacen por semilla, son protándricas (desarrollan sus estambres antes que los pistilos) y las hojas están dispuestas de 12 a 16 hileras (Villarreal, 1996).

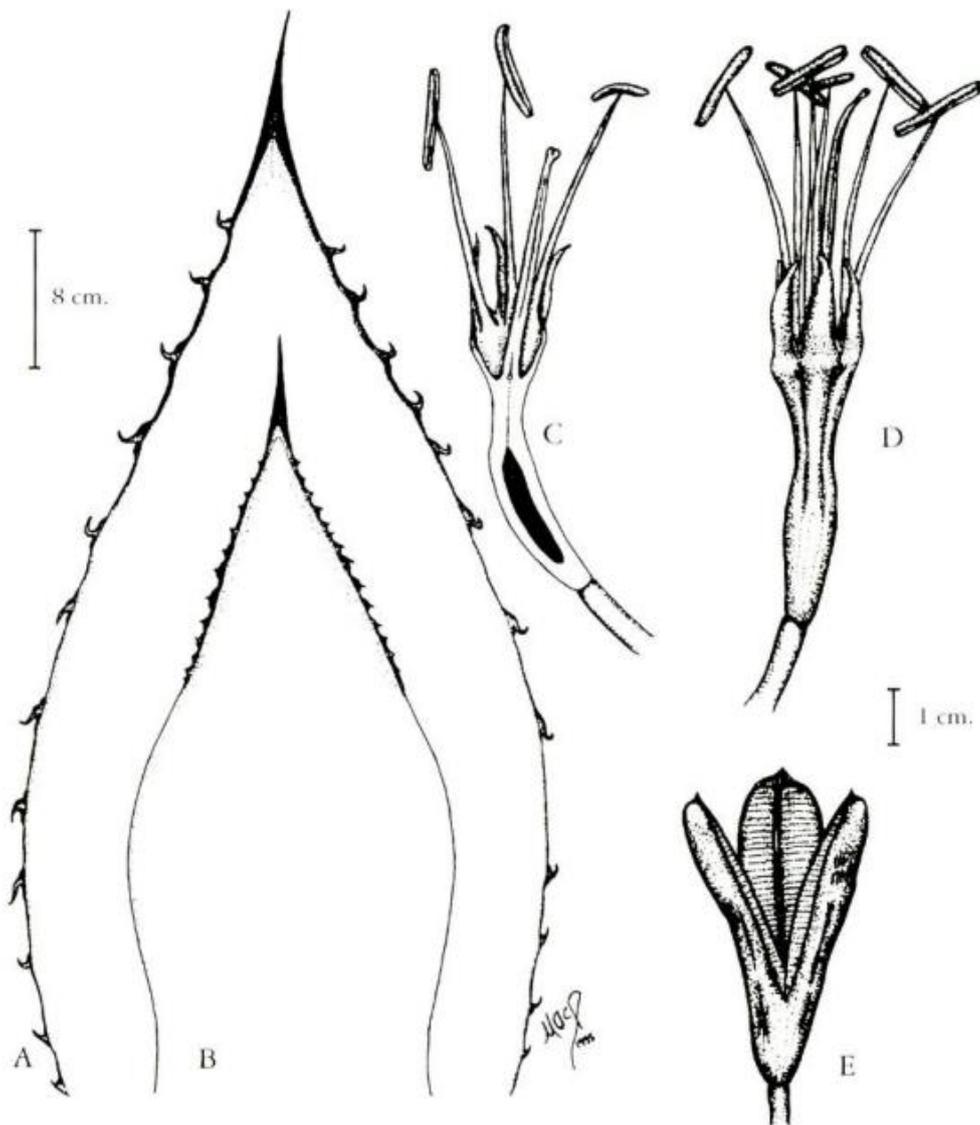


Figura 3: *Agave montana* A. Hoja. B. bráctea. C. flor, corte longitudinal. D. flor y E. capsula (Tomada de Villarreal, 1996).

De manera detallada, Villarreal (1996) la describe como una planta hemisférica rosetadas y compactas, con un diámetro de 1.40 a 1.65 m, con una de 90 a 1.25 m de altura; Hojas cortamente elípticas, ligeramente cóncavas a casi planas de 30 a 40 cm de largo y 15 a 17 cm de ancho, arreglas en espiral en un tallo corto en 12 a 16 hileras, con 84 a 112 por planta, de color verde amarillento; inflorescencia de 3.5 a 4.5 m de alto, ovoide con alrededor de 30 ramillas florales ; brácteas elípticas dentadas de 18 a 25 cm de largo y 8 a 12 cm de ancho café rojizas; tallo floral de 12 a 16 cm de diámetro; flores amarillas y suculentas de 6

a 7 cm; tépalos lanceolados de 2 cm de largo y 3 a 4 mm de ancho; capsulas oblongas de 5 a 6 cm de largo y 1.5 a 2 cm de ancho café oscuro; semillas lacrimiformes de 5 a 6 mm de largo y de 3 a 4 mm de ancho negro brillante. Además, *Agave montana* es una planta semélpara, es decir que no se reproducen por hijuelos, sino que lo hacen por semilla y son protándricas, desarrollan sus estambres antes que los pistilos. Está relacionado con *A. gentryi* y *A. parrasana*, ya que presenta un escapo floral grueso de 12-16 cm de diámetro y cubierto de brácteas cóncavas y suculentas, además de que ambas especies son simétricas en la forma de la roseta. Sin embargo, se diferencia de ellas por presentar rosetas más grandes de 1.65 m de diámetro y 1.25 m de altura, un mayor número de hojas (hasta 112 por individuo), hojas paniculadas y ovaladas, mayor número de ramas florales (aproximadamente 30 ramas) y brácteas elípticas dentadas de 18-25 cm de largo y 8-12 cm de ancho (Villarreal, 1996).

4.5.2. Distribución de *Agave montana*

Los representantes de esta especie nativa del noreste, se distribuye en los estados de Coahuila, Nuevo León, Tamaulipas y parte de Querétaro, en bosques de pino-encino en altitudes entre los 3,200 y 3,400 m en la Sierra Madre Oriental (Villarreal, 1996). En su hábitat natural, el agave de montaña crece en una variedad de suelos ricos en materia orgánica. Sin embargo, no puede sobrevivir en suelos mal drenados, como también la planta puede tolerar un pH de suelo ácido neutro.



Figura 4: Fotografía del *Agave montana* en su hábitat natural. (Tomada de: [https://WWW.naturalista.mx/taxa/290757-Agave montana](https://WWW.naturalista.mx/taxa/290757-Agave%20montana) Alejandro Huereca-Algunos derechos reservados (CC BY-NC-ND))

4.5.3. Importancia económica de *Agave montana*

Las plantas de agave de montaña son utilizadas en jardinería por su porte extraordinariamente estético. Se adapta bien en zonas de veranos frescos e inviernos fríos y húmedos, de heladas e incluso nevadas. No es un agave del desierto por lo que puede establecerse en condiciones de media sombra y una cierta humedad en los jardines.

Tomando como base individuos de *Agave montana*, en el año 2016 se produjo mezcal artesanal blanco 100% *Agave / A. montana* 45% Alc.Vol. / 750mL, con una producción 369 botellas, considerada una edición limitada denominada “Mezcales Únicos”. Atribuyendo las características de aroma: carbonizado profundo, notas herbales, bosque húmedo y sabores: paladar medio dulce, final potente y muy largo con tonos mentolados dulces (Mezcales de Leyenda Mezcales únicos Montana Edición Especial 2016) considerado un producto completamente artesanal y único debido a que es una planta endémica y cosechada en su hábitat natural.

Para la siembra no requiere acondicionamiento especial del sustrato de plantación, aunque prefiere un buen drenaje y precisos aportes periódicos de agua sobre todo en verano. No requiere protección contra las heladas cuando la

planta se ha adaptado al terreno y adquiere unos 50 cm de altura, la planta se desarrolla con mucho más vigor en el suelo que en contenedor.

4.6. Técnicas de Biotecnología vegetal aplicada a las plantas del género Agave

La biotecnología en los últimos años se ha considerado una estrategia técnica para resolver problemas (agrícolas) y hacer un uso adecuado de los recursos naturales. Tal es el caso que presenta Domínguez-Rosales *et al.* (2008) quien ha observado que las plantas de agave son de crecimiento lento, así como sus bajas tasas de reproducción asexual y reproducción sexual limitada, entre otros factores que hacen a los agaves sean difíciles de multiplicar masivamente por métodos convencionales una de ellas es la polinización y viabilidad de las semillas. Se sugiere que las técnicas de propagación es una opción prometedora para resolver estos problemas del agave.

4.6.1. Cultivo *in vitro*

El cultivo de tejidos vegetales surgió como una técnica rápida de propagación de plantas. Además, se ha estudiado su uso como herramienta para resolver problemas de nutrición vegetal, sin embargo, su aplicación biológica en la detección y estudio de sustancias naturales activas ha sido más aplicadas (Murashige y Skoog, 1962; Pérez Molphe Balch *et al.*, 1999).

El cultivo de tejido *in vitro* consiste básicamente (figura 5) en cultivar pequeños segmentos de las plantas (explantes) sobre medios sintéticos estériles bajo condiciones controladas, con el propósito de generar plantas con las características genótípicas del progenitor (Robert *et al.*, 2006). También se puede llevar a cabo a partir de cualquier parte de la planta como; meristemos, tallos, raíz, hojas, inflorescencias entre otras.

La mayoría de los trabajos en esta área se refieren al cultivo y propagación *in vitro* de algunas especies del género. La regeneración *in vitro* se ha alcanzado a

través de la obtención de brotes a partir de meristemos auxiliares localizados en el segmento basal de las plantas, o bien a través de organogénesis o embriogénesis somática indirecta, es decir, a partir de tejido calloso generado también *in vitro*. En general, todos los antecedentes confirman que la biotecnología puede ser el método más eficiente para la propagación de plantas de agave con fines de producción masiva o establecimiento de plantaciones.

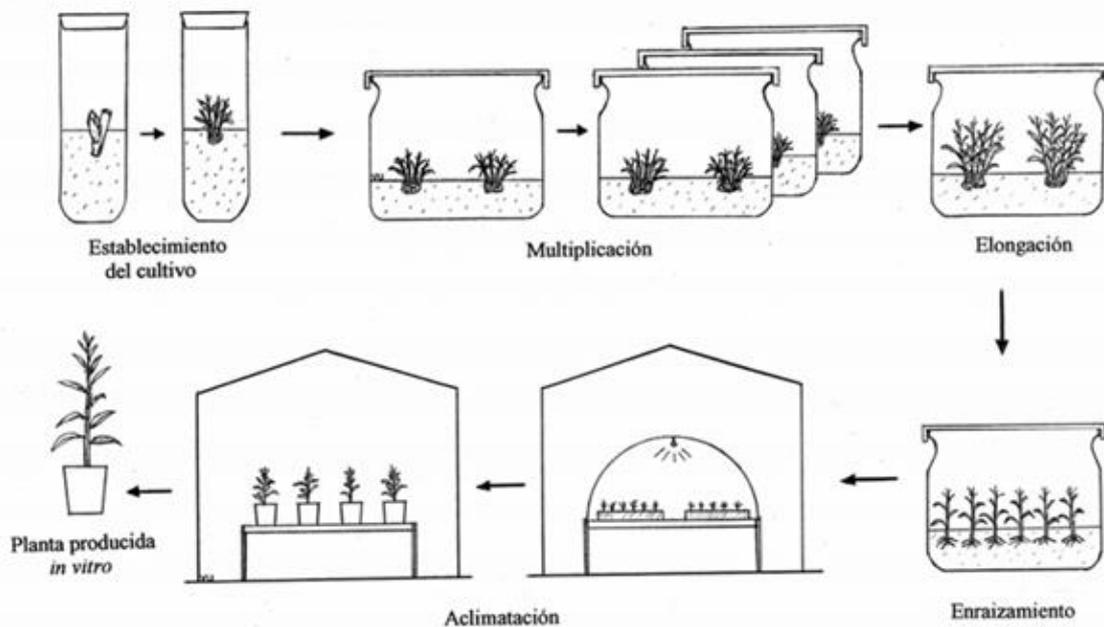


Figura 5: Esquema del proceso de micropropagación (Fuente: <http://ocw.udl.cat/engineyria-i-arquitectura/fructicultura/continguts-1/l-7/monografia-no-7-cap.-6.-microprop.-y-otros-metodos>).

En la (Cuadro 2) se resumen los trabajos más destacados en el área. En general, todos los antecedentes confirman que la Biotecnología puede ser el método más eficiente para la propagación de plantas de *Agave* con fines de producción masiva o establecimiento de plantaciones.

Cuadro 2: Antecedentes sobre el cultivo y propagación *in vitro* de especies del género *Agave*, (Ordaz et al. 2008).

Especie de Agave	Avance Reportado	Medio de cultivo/Reguladores de crecimiento utilizados	Referencia
<i>A. parrasana</i>	Regeneración de brotes a partir de meristemos basales y organogénesis indirecta	MS adicionado con BA (13.3, 26.6, 39.9 y 53.2 uM) y 2.4-D (0 Y 0.04 uM).	Santacruz-Rubalcaba y col. (1999)
<i>A. sisalana</i>	Regeneración de plantas a través de organogénesis indirecta.	MS, MS + (NH ₄ NO ₃ ; 1500 mg L ⁻¹) y MS + hidrolizado de caseína (1000 mg L ⁻¹), todos adicionados con 2, 4-D (9.05 uM) y cinetina (4.6 Um).	Hazra y col. (2002)
<i>A. victoria-reginae</i>	Regeneración por embriogénesis somática y generación de brotes a partir de meristemos basales.	MS fue con 2.26 uM de 2, 4-D para la inducción de callo. MS con 2. 2-4.4 uM de BA para la generación de brotes.	Martinez-Palacios y col (2003)
<i>A. sisalana</i>	Regeneración por embriogénesis somática	MS con 2, 4-D (0.5-1 mg L ⁻¹) más BAP o cinetina (1-2 mg L ⁻¹) para la formación de callo, MS con 1 mg L ⁻¹ de cinetina para la diferenciación de embriones somáticos.	Nikam y col. (2003)
<i>A. angustifolia</i>	Generación de brotes de a través de organogénesis directa a partir de segmentos de médula de tallo.	MS con 1 mg L ⁻¹ de BA	Enriquez del Valle y col. (2005)
<i>A. tequilana</i>	Regeneración de plantas a través de organogénesis indirecta y generación de brotes a partir de meristemos.	Para la formación de callos el mejor tratamiento fue con ANA. La regeneración a partir de meristemos y de callo se logró con 1.1 uM de 2.4-D y 44 uM de BA.	Valenzuela-Sánchez y col. 2006
<i>A. salmiana</i>	Generación de brotes a partir de meristemos.	MS con 2.0 mg l-1 BA +D15y 0.25 mg l-1 AIA.	Silos-Espino y col (2007)
<i>A. tequilana</i>	Regeneración por embriogénesis somática.	Se utilizaron MS combinaciones de 2.4-D/ba uM para la formación de callos, MS en distintas concentraciones de BA, cinetina, 2iP y TDZ para la diferenciación de embriones somáticos.	Portillo y col. (2007)
<i>A. vera-cruz</i>	Regeneración por embriogénesis somática.	Se utilizó MS adicionado con 4,52 uM de 2.4-D para la formación de callos, MS adicionados con 5.37 uM de NAA más 0.91 uM de zeatina.	tejavathi y col. (2007)

La alta demanda de los productos obtenidos de los agaves pone en peligro de extinción a las poblaciones silvestres (López *et al.*, 2018). La micropropagación está basada en la propagación asexual de plantas, en la que se toman segmentos de una planta madre (hoja, tallo, semillas, raíces ápices y meristemos) para luego seguir dos vías de propagación, embriogénesis u organogénesis (directa e indirecta) y el resultado de esto es la regeneración de nuevos brotes, que dan paso a la obtención de plantas genéticamente idénticas (Espinosa-Leal *et al.*, 2018). En agaves mezcaleros se han reportado algunos casos de éxito utilizando técnicas de cultivo *in vitro*, como también con el método de la micropropagación de Agaves que consisten en: a) cultivo de yemas laterales y b) el cultivo de cambio vascular. Para llevar a cabo la micropropagación de una especie es necesario tener en cuenta los siguientes pasos: establecimiento aséptico del cultivo, multiplicación y el enraizamiento y propagación del inoculo para su trasplante al suelo (Nakamura, 1990).

Cuadro 3: Resultados más destacados y tiempo de obtención de brotes en estudios de cultivo *in vitro* en agaves mezcaleros (Nakamura, 1990).

Especie	Método aplicado	Tiempo de obtención	Resultados más destacados	Autor y año
Propagación <i>in vitro</i> del "Maguey bruto" (<i>Agave inaequidens</i> Koch), una especie amenazada de interés económico.	Organogénesis directa.	6 meses	Las secciones de tallo formaron hasta 72 brotes, la concentración 3.0 mg litro de BA incremento la altura de brotes y la formación de nuevas hojas. los reguladores BA, Kin y 2p en las concentraciones de 3 y 10 mg litro generaron una mayor altura de la planta, mayor número de hojas y brotes nuevos además hubo presencia de estructura globulares y raíces.	Aureoles Rodríguez <i>et al.</i> , (2008)
Efecto de citocininas en la propagación <i>in vitro</i> de agaves mexicanos.	Organogénesis directa	5 meses	Sus resultados indicaron que en <i>A. cupreata</i> y <i>A. karwinskii</i> se obtuvieron 10.5 y 6.1 brotes por explante con 1.5 y 1 mg L TDZ dando 8.5 y 11 brotes por explante.	Domínguez Rosales <i>et al.</i> , (2008a)
Capacidad embriogénica de callos inducidos en ejes embrionarios	Organogénesis indirecta	6 mes	Obtuvieron la formación de callos embriogénicos en aquellos que fueron inducidos en el medio MS-25 adicionado con	Arzate-Fernández y Mejía - Francisco., (2011).

cigóticos de <i>Agave angustifolia</i> Haw.			3.0 mg L DE 2,4-D y 1.0 mg l de BA, en condiciones de oscuridad. Se logró la germinación de todos los embriones somáticos en el medio MS-50 sin reguladores de crecimiento vegetal, y se dio la regeneración plantas completas de <i>A angustifolia</i> .	
Micropropagación de <i>Agave americana</i> .	Organogénesis directa	6 meses	Registraron 18.5 brotes por explante provenientes de tallo en la concentración de 13.32 um de BA. Registraron la formación de brotes adventicios a partir de segmentos foliares en la combinación de hormonas de 2.68 Um ANA más 13.32 Um BA. También se dio la frecuencia de enraizamiento más alta en las concentraciones de hormonas: 4.92 UM de AIB y 1.48 Um más 1.61Um de ANA.	Ying Chen et al., (2014).

La investigación sobre cultivo de tejidos y micropropagación de agaves data de principios de la década de los ochenta del siglo pasado, y las primeras especies que se emplearon en estudios de cultivo de tejido fueron: *Agave sisalana* y *Agave fourcroydes* (ambas fibreras), *Agave tequilana* (tequilera) y *Agave atrovirens* (pulquera); sin embargo, el valor económico de las cadenas productivas que hacen uso de estas plantas, por esas fechas era bajo. Con la crisis de la industria tequilera a finales de la década próxima pasada y principios de esta, cuando la materia prima escaseó, los tequileros recurrieron a múltiples opciones para abastecerse de material. Entonces se presentó un nuevo interés por la micropropagación, ya que la demanda de plántulas de *Agave tequilana* superó por mucho la oferta, lo que provocó un súbito incremento en los precios por plántula. Quizá el factor que más impactó en el desabasto del agave fueron enfermedades causadas por bacterias, hongos e insectos que afectaron considerablemente las plantaciones, aunque ahora estos causales han sido plenamente identificados (Garrido y Rodríguez, 2004).

4.6.2. Medios de cultivo

Los nutrientes básicos requeridos por las células vegetales son similares a los nutrientes que aporta el suelo para el desarrollo de las plantas. La composición de los medios de cultivo ha sido estudiada por diferentes científicos como Heller (1953); Murashige y Skoog (1962); Gamborg *et al.* (1970); Schenk y Hildebrandt (1972); y el De Fossard (1976), donde concuerdan que el medio debe estar conformado principalmente por los siguientes componentes: macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, aminoácidos, azúcares y gelificantes; sin embargo, la composición puede variar dependiendo del genotipo de la planta y el objetivo de la investigación. Según los autores Hurtado y Merino (1988), los ingredientes del medio de cultivo se pueden clasificar en: sales inorgánicas, compuestos orgánicos, complejos naturales, materiales inertes de soporte. En el mercado podemos encontrar productos preparados con los requerimientos nutritivos básicos y en diferentes concentraciones. Las casas comerciales que los elaboran y venden como Sigma-Aldrich y Bioplant, por mencionar algunas.

Hurtado y Merino (1988), mencionan que el éxito que se obtenga en un cultivo de tejidos vegetales depende del uso del medio nutritivo adecuado, como también del empleo de tejidos viables, incubación, calidad de reactivos, asepsia, etc.

4.6.2.1. Sales inorgánicas

A través de los años se han llevado a cabo investigaciones con el fin de satisfacer las necesidades de plantas específicas, por lo tanto, los ha llevado obtener la formulación de varias mezclas salinas. La fórmula de Murashige y Skoog (1962) se ha demostrado que es el medio óptimo para una gran variedad de especies, así como para diferentes partes de una planta. La fórmula contiene grandes cantidades de macronutrientes y contiene una alta concentración de nitrógeno en forma de NH_4NO_3 y KNO_3 , se recomiendan generalmente el empleo de diluciones de 3 a 1 (Thorpe, 2007).

4.6.2.2. Compuestos orgánicos

Hurtado y Merino (1988) señalan que los compuestos orgánicos se pueden clasificar en tres grupos: carbohidratos, sustancias hormonales y vitaminas. Estos compuestos se adicionan dependiendo de la respuesta que se busca, en específico el uso de fitohormonas. Comúnmente se han obtenido buenos resultados al emplear otros aminoácidos y/o amidas, algunas purinas y pirimidinas, hexitoles y ácidos orgánicos.

4.6.2.3. Fuentes de carbono

La sacarosa es la fuente de carbono más ampliamente usada y se emplea a una concentración de 2 a 396 ppm; sin embargo, en ciertas especies se emplean concentraciones muy elevadas (5 a 12%). Ocasionalmente se emplea la glucosa en cultivos de monocotiledoneas, así como la fructosa y el almidón para otras especies Hurtado y Merino (1988).

4.6.2.4. Vitaminas

Miller y Erston (2010); UNPL, (2019), señalan que las vitaminas son compuestos orgánicos necesarios para la realización del metabolismo normal de ciertos organismos vivos, semejándose a las enzimas u hormonas que el organismo necesita en cantidades relativamente mínimas para su normal crecimiento y desarrollo.

La tiamina (B1), es un componente esencial de las coenzimas que catalizan la oxidación del ácido pirúvico en el ciclo respiratorio. Por eso, sin esta vitamina las células vivas no pueden realizar sus funciones vitales siendo utilizada en 0,4 mg/l.

La riboflavina (B2), es necesaria para el crecimiento de las raíces y funciona reduciendo la cantidad de auxina del sistema radicular. Una gran cantidad de auxina inhibe el crecimiento de la raíz.

El niacina (B12), desempeña un papel importante en la respiración porque es un componente de las coenzimas I y II, que son grupos portadores de hidrógeno en la fase respiratoria de deshidrogenación.

El ácido ascórbico (vitamina C), interviene en los sistemas de oxidación de la célula y establece potenciales favorables de *óxido-reducción*. Se emplean cristales de ácido ascórbico (vitamina C) para reducir los taninos oxidados *in vitro* o en la superficie de frutos recién cortados.

Hurtado y Merino (1988), dicen que la única vitamina que ha demostrado tener importancia en cultivos de células y órganos es la tiamina; algunas otras se utilizan debido a que pueden estimular procesos de crecimiento específicos.

4.6.2.5. Aminoácidos y amidas

Hurtado y Merino (1988); UNPL, (2019), mencionan que los requerimientos de aminoácidos y/o amidas se pueden determinar rápidamente por medio de la adición de un hidrolizado proteico. Los aminoácidos y amidas tienden a tener efectos benéficos son la L-arginina, ácido L-aspártico, L-asparagina, ácido L-glutámico y L-glutamina. La L-serina juega un papel muy importante en la iniciación de embriones haploides en cultivos de anteras; la L-tirosina es crítica en la formación de tallos de cultivos de callos.

4.6.2.6. Materiales inertes de soporte

Hurtado y Merino (1988); Thorpe, (2007), señalan que el agar es el material de soporte más usado en el cultivo de tejidos, provee al medio de un excelente gel húmedo que sirve como soporte al inóculo. Sin embargo, fisiológicamente no es inerte, puesto que es una fuente de cantidades variables de sustancias inhibitoras o estimulantes del crecimiento. Otros agentes gelificantes usados algunas veces en lugar del agar son la poliacrilamida y la silicagel. En medio líquido se usa, papel filtro como puente o plataforma que es muy frecuente, así como la fibra de vidrio, también se recomienda añadir carbón, en bajas concentraciones, ayuda a adsorber sustancias que se forman como desecho en

algunos medios de cultivo, se emplea carbón que debe ser muy fino y preferentemente prelavado.

4.6.2.7. Sustancias hormonales

Las hormonas vegetales, compuestos químicos especializados producidos por las plantas, son los principales 10 factores internos que controlan el crecimiento y el desarrollo. Las fitohormonas se producen en cantidades muy pequeñas en unas partes de las plantas y son transportadas a otras, donde ejercen su acción. Una misma fitohormona puede desplegar efectos distintos en diferentes tejidos de destino (Parra, 2007 y UNPL, 2019).

4.6.2.8. Auxinas

Las auxinas son el grupo más importante de hormonas involucradas en la formación de raíces adventicias (Hartmann *et al.* 1997). Se sintetiza en las yemas apicales de los tallos y se distribuye en otras partes de la planta, entre otras funciones de las auxinas prevalece: dominancia apical, aumentar el crecimiento de los tallos, promover la división celular en el cambium vascular y diferenciación del xilema secundario, estimular la formación de raíces adventicias, estimular el desarrollo de frutos (partenocárpicos en ocasiones), fototropismo, promover la división celular, promover la floración en algunas especies, promover la síntesis de etileno (influye en los procesos de maduración de los frutos) y favorece el cuaje y la maduración de los frutos, inhibe la abscisión o caída de los frutos (Parra, 2007; Costa *et al.* 2017).

Hurtado y Merino (1988), mencionan que las auxinas se usan en una concentración de 0,1 a 1 0,0 mg/l. Las principales auxinas utilizadas para la preparación de medios de cultivo: ácido 3-indolacético (ALA) (muy termolábil), ácido 3-indolbutírico (AIB), ácido naftalenacético (ANA), ácido 4-clorofenoxiacético (CPA), ácido 2, 4-diclorofenoxiacético (2, 4-D), ácido 4-amino-3, 5, 6-tricloropicolínico (Tordón, producto comercial, M. R.).

4.6.2.9. Citocininas

Son derivados de la adenina que promueven la división celular. Las citocininas *in vivo* incrementan la tasa de división celular, el transporte de solutos hacia las hojas, semillas, flores y frutos, producen un retardo de la senescencia de las hojas. (Salisbury y Ross, 1994).

Parra (2007); Argueso *et al.* (2009), menciona que las citocininas es una de las hormonas vegetales, se sintetizan en los meristemos apicales de las raíces, aunque también se producen en los tejidos embrionarios y en las frutas. El transporte en la planta es por vía acropétala, desde el 11° ápice de la raíz hasta los tallos, moviéndose a través de la savia en los vasos correspondiente al xilema. Las funciones atribuidas a este grupo son: estimulan la división celular y el crecimiento, inhiben el desarrollo de raíces laterales, rompen la latencia de las yemas axilares, promueven la organogénesis en los callos celulares, retrasan la senescencia ó envejecimiento de los órganos vegetales, promueven la expansión celular en cotiledones y hojas, promueven el desarrollo de los cloroplastos.

La 6-bencilaminopurina (6-BAP), es una citoquinina sintética que, junto con las auxinas, genera respuestas en el crecimiento y desarrollo de plantas. Se ha usado para inducción de brotes (Ross y Grasso, 2010) y medio de germinación de semillas (Raza *et al.* 2017).

4.6.3. Micropropagación

La micropropagación o propagación clonal es una de las aplicaciones más empleadas del cultivo *in vitro*, el cual se ejecuta a través de la multiplicación de un fragmento de una planta madre llamado explante. Con este procedimiento se obtiene una descendencia uniforme, es decir, plantas genéticamente idénticas, a las cuales se les denominada clones. Las yemas apicales vegetales de las plantas son uno de los explantes más utilizado para los procesos de propagación *in vitro*, Moreno (2015).

Para entender las etapas de la micropropagación, Castillo (2004) menciona que se requieren, los que a continuación se describen: seis pasos fundamentales dentro del proceso.

1. Selección y preparación de la planta madre
2. Desinfección de las yemas de la planta y/o desinfección de semillas
3. introducción del material seleccionado *in vitro*
4. Multiplicación de brotes
5. Enraizamiento
6. Aclimatación

Esta secuencia de etapas abarca el ciclo completo de la multiplicación de *plantas in vitro*; puede ser aplicada a diferentes especies vegetales, en cada caso se podrán incluir simplificaciones o cambios de acuerdo a las características de las plantas, pero en términos generales son comunes al proceso de propagación *in vitro*.

a) Preparación de la planta madre

Para poder establecer el cultivo en condiciones de asepsia, se deben obtener explantes con un nivel nutricional y un grado de desarrollo adecuado. Para obtener estos explantes es recomendable mantener a las plantas madre, es decir la planta donadora de yemas, durante un período de tiempo que puede oscilar entre unas semanas o varios meses en un invernadero bajo condiciones controladas. En ese ambiente se cultiva la planta en condiciones sanitarias óptimas y con un control de la nutrición y riego adecuados para permitir un crecimiento vigoroso y libre de enfermedades.

b) Desinfección del material vegetal

Una vez elegida la planta madre, se extraerán los fragmentos a partir de los cuales se obtendrán los explantes, que pueden ser yemas, trozos de hojas, porciones de raíces, semillas, etc. Antes de obtenerlos, se hará una desinfección de los fragmentos de planta madre para eliminar los contaminantes externos. Considerados como agentes contaminantes más comunes a los hongos y las bacterias que habitan en forma natural en el ambiente. Una vez desinfectado el material vegetal, se debe mantener en condiciones de asepsia. Trabajando en

campanas de flujo laminar para extraer los explantes a partir del material vegetal los cuales se introducirán en los recipientes de vidrio conteniendo medio de iniciación para poder controlar la sanidad y la viabilidad, luego de realizar la desinfección del material con hipoclorito de sodio (agua clorada comercial) durante un período de 5 a 15 minutos, seguido por 3 a 4 enjuagues en agua esterilizada.

c) Introducción del material *in vitro*

Luego de la desinfección superficial, las semillas o las yemas dependiendo del material seleccionado, se ponen en medio de cultivo estéril. En un período de una semana o quince días, comienza el proceso de germinación o regeneración de nuevos tejidos vegetales, iniciando el ciclo de cultivo *in vitro*.

d) Multiplicación de los brotes

Durante esta fase se espera que los explantes que sobrevivieron la fase 1 y 2 en la cual originan brotes (de procedencia axilar o adventicia) con varias hojas. En la base de cada hoja hay una yema que se desarrollará luego de ser puesta en contacto con el medio de cultivo. Periódicamente estos nuevos brotes se deben subcultivar en un nuevo medio mediante divisiones y resiembras en tubos de cultivo u otros recipientes adecuados. Estas operaciones se siguen realizando en la cámara de flujo realizan en la cámara de flujo laminar o en un lugar aislado que nos permita mantener las condiciones de asepsia. De esta forma aumenta el número de plantas en cada disección o división de las plantas. El número de plantas que se obtiene dependerá de la especie vegetal y de las condiciones del medio de cultivo. El número de plantas que se obtiene por la vía de la micropropagación permite alcanzar incrementos exponenciales, considerando que todos los factores que afectan el crecimiento hayan sido optimizados.

e) Elección de un medio de enraizamiento de los explantes

Para enraizar los explantes se utilizan principalmente plantas individuales de un tamaño aproximado de 2 centímetros. Los brotes obtenidos durante la fase de multiplicación se transfieren a un medio libre de reguladores de crecimiento o que solo contenga hormonas del tipo auxinas. Algunas especies de plantas no necesitan pasar por esta etapa y emiten sus raíces en el mismo medio de cultivo

donde desarrollan yemas nuevas, por lo tanto, el proceso de multiplicación y enraizamiento transcurren en forma simultánea.

f) Aclimatación de los explantes enraizados

Los explantes recién enraizados son muy sensibles a los cambios ambientales, de manera que el éxito o el fracaso de todo el proceso dependen de la aclimatación. En esta etapa las plantas sufrirán cambios de diferente tipo que permitirán la adaptación de estas a vivir en condiciones naturales. En el momento en que se extraen los explantes o plantulas enraizados de los frascos, están poco adaptados a crecer en un invernadero, ya que estos explantes han enraizado y crecido en ambientes con una humedad relativa muy elevada y generalmente tienen estomas (estructuras responsables de regular la transpiración y pérdida de agua en la planta) que no son completamente funcionales frente a descensos de la humedad relativa, y por lo tanto demasiado lentos para evitar la desecación del explante. Por otra parte, crecer en ambientes tan húmedos también suele implicar la falta de una cutícula con cera bien desarrollada, que representa la barrera física para evitar la pérdida de agua a lo largo de toda la superficie de la planta.

De acuerdo con la siguiente lista presenta una comparación de acuerdo con Castillo (2004), se puede observar diferencias en las características de una planta en condiciones de laboratorio (*in vitro*) respecto a una planta en condiciones naturales (*in vivo*):

In vitro

- No realiza fotosíntesis
- Crecimiento en condiciones controladas
- Crecimiento en condiciones de asepsia
- Alta humedad relativa Estomas no funcionales
- Ausencia de pelos radiculares
- Ausencia de cera en la cutícula

In vivo

- Realiza fotosíntesis

- Crecimiento en condiciones no controladas
- Exposición a los patógenos y gérmenes del ambiente
- Humedad relativa variable
- Estomas funcionales
- Presencia de pelos radiculares
- Presencia de cera en la cutícula

4.6.4. Tipos de cultivo

La producción de plantas y de metabolitos puede realizarse mediante cultivos de tejidos vegetales diferenciados o indiferenciados.

4.6.4.1. Cultivos diferenciados

Los métodos de regeneración de plantas por cultivo *in vitro* incluyen la embriogénesis somática y la organogénesis.

4.6.4.2. Embriogénesis somática

Los embriones que no implican de la fusión de gametos se definen como embriones somáticos, asexuales o adventicios. Son estructuras bipolares con un eje radical-apical, no poseen un vínculo vascular con el tejido materno y son idóneos de crecer y formar plantas normales. La embriogénesis somática se puede adquirir directamente a partir de células aisladas o utilizando callos (Litz y Jarret, 1991; Jiménez-González, 1998; Gómez- Kosky *et al.* 2002).

4.6.4.3. Organogénesis directa

La organogénesis reside en la formación de un origen unipolar a partir de una yema y el desarrollo se origina en brotes vegetativos que rápidamente enraízan vía la formación y proliferación de meristemas radicales. Los brotes pueden establecerse directamente del explante (organogénesis directa). La organogénesis se desarrolla por inoculación de tejido meristemático estéril (yemas axilares o adventicias) en un medio agregado con niveles óptimos de

sales, de agregados orgánicos y de reguladores de crecimiento (Krikorian, 1991; González, 2005).

4.6.4.4. Organogénesis indirecta

Es la formación de nuevos brotes, pero no directamente del tejido organizado extraídos de la planta si no de un tejido intermediario amorfo indiferenciado llamado callo. La formación de plantas a través de callos representa una alternativa para la producción de masas indiferenciadas, que son un conjunto de callos que pueden crecer rápidamente para forman millones de células de las que en teoría podrían formar millones de nuevas plantas (Robert *et al.*, 2004).

4.6.4.5. Cultivos indiferenciados

Los cultivos vegetales indiferenciados se logran a partir de órganos o tejidos organizados cultivados en un medio nutritivo adecuado (sólido o líquido) que provoca la pérdida parcial de los caracteres morfológicos y funcionales de una célula o tejido ante la presencia de auxinas exógenas. En medio sólido se obtienen masas celulares más o menos compactas que constituyen los callos, mientras que en medio líquido se logran las suspensiones celulares formadas por células libres o agregadas. Los cultivos de células vegetales indiferenciadas pueden exhibir una gran variedad estructural, genética y metabólica con respecto a la planta madre.

4.6.4.6. Tipos celulares presentes en los cultivos *in vitro* indiferenciados

En los cultivos indiferenciados se hallan células con gran diversidad de tamaños y formas, de citoplasma denso, con vacuolas pequeñas y con alta eficacia morfogénica que se pueden homologar a las células meristemáticas de las plantas. También se observan células alargadas y células muy grandes con una gran vacuola central y bajo potencial morfogénico. No obstante, debido a que las células en suspensión se dividen en forma asincrónica, los tipos celulares

descritos pueden no pertenecer a tipos celulares diferentes, (Gómez-Kosky, 2002) los cataloga como células meristemáticas, parenquimáticas y gigantes.

4.6.4.7. Crecimiento de callos y suspensiones celulares

Los cultivos de callos son de crecimiento lento y heterogéneo, para impedir la falta de nutrientes, los callos deben ser subcultivados a medio fresco en períodos cortos, variables según la especie (30-45 días). La tasa de crecimiento y las características de friabilidad dependen de las especies, del balance hormonal, de la concentración de agar, calcio y magnesio y de la intensidad luminosa (Gómez-Kosky, 2002).

Aunque los cultivos de células en suspensión son apreciados semejantes a los de microorganismos, cada tipo de cultivo presenta particularidades. Los cultivos de células vegetales en suspensión presentan una cinética de crecimiento similar a la microbiana, pero de desarrollo en mayor espacio de tiempo.

4.6.5. Otras aplicaciones de la biotecnología en los agaves

Se ha utilizado una técnica de propagación masiva para los agaves denominada Sistemas de Inmersión Temporal (SIT). Los SIT son sistemas semiautomatizados que utilizan medios de cultivos líquidos que permiten la inmersión de las plantas en ciclos alternos y de esta manera aprovechan mejor los nutrientes disponibles en el medio de cultivo, su principal ventaja es que es un sistema desarrollado que simplifica el proceso de micropropagación, reduce los costos de producción y aumenta el número de especies vegetales a escala comercial (Pramita *et al.* 2018; Kunakhonnuruk *et al.*, 2019).

Otra técnica que ha sido utilizada para incrementar la micropropagación de plantas es el uso de luces tipo LED. Los LED se han tomado como una nueva alternativa en los laboratorios de micropropagación, sustituyendo a las lámparas fluorescentes. Algunos estudios indican que los LED presentan grandes ventajas frente a la luz fluorescente, generan menos radiación de calor, son de espectro monocromático, de mayor durabilidad, bajo consumo de energía y lo más

importante es que proporcionan luz en diversas regiones espectrales, aumentando la fotosíntesis y el desarrollo de las plantas, (Martínez-Estrada *et al.*, 2016; Bello-Bello *et al.*, 2017c).

Al utilizar diferentes colores de led se observan efectos positivos sobre el desarrollo morfogénético de las plantas *in vitro*, mayor desarrollo de embriones somáticos, incremento en el número de brotes, promoción en el desarrollo de raíces, estimulación en la síntesis de pigmentos fotosintéticos, y plántulas de mayor calidad Botero y López (2015); Martínez-Estrada *et al.*, (2016); Murillo-Talavera *et al.*, (2016); Chen *et al.*, (2016); Ramírez-Mosqueda *et al.*, (2017).

Es evidente que existe un amplio uso de técnicas biotecnológicas aplicadas a las plantas, las modificaciones en los medios de cultivo, elección de explantes, adición de fitohormonas y técnica de siembra, dependerán directamente del objetivo que se plantee en la investigación.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Material biológico (semillas)

Se utilizaron semillas de *Agave montana* colectadas en marzo del año 2018 en Sierra de la Marta, ubicada en el Municipio de Arteaga, Coahuila (datos proporcionados por el colector).

Las semillas se conservaron en una bolsa de papel y se seleccionaron eligiendo las de color negro (viables) de las claras, que están consideradas como semillas vanas.

5.2. Caracterización física de las semillas

Para describir las características físicas de las semillas, se determinó su tamaño y color. La primera característica requirió del uso de un vernier digital (electronic/caliper) la medición se realizó colocando la semilla en la escala y anotando su longitud y ancho. Para asignar el color se utilizó la carta de colores de Munsell (Munsell, 2000).

5.3. Prueba de viabilidad de semillas

Geory Lakon citada por (Labrada, 2005) menciona el desarrollo y establecimiento de la metodología para obtener la viabilidad de las semillas. La prueba de viabilidad tiene como propósito determinar lo viable que es una semilla para producir una plántula normal (mediante su potencial de actividad bioquímica). Esta prueba evalúa con base en patrones de tinción y permite identificar actividad enzimática en tejidos, las semillas no viables muestran deficiencias y/ o anomalías de naturaleza para producir una plántula de desarrollo normal.

Para tener la certeza de que las semillas colectadas son viables para su siembra, se realizó una prueba de viabilidad de embriones con 50 semillas, éstas se colocaron en un vaso de precipitados, cubiertas con agua, se guardaron en refrigeración (0°C) por 24 h, transcurrido el tiempo se cortaron las semillas por la mitad, se les retiró el agua y se cubrieron con una solución de sal de tetrazolio al 1% se incubaron a 30°C por una hora y posteriormente se visualizó en un estereoscopio el patrón de tinción de los embriones (área e intensidad de color) además de realizar el conteo total de resultados.

La viabilidad se expresó en porcentaje mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Viabilidad} = \frac{\text{No. de semillas teñidas}}{\text{No. total de semillas}} \times 100$$

5.4. Cultivo *in vitro*

5.4.1. Desinfección de las semillas:

Las semillas recibieron una desinfección con detergente biodegradable (Foca) lavando durante 3 minutos, después se hizo otro lavado con Sorbitan (Tween 20) por 5 minutos, seguido de tres enjuagues con agua destilada. Para eliminar la presencia de hongos y bacterias, las semillas se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio comercial (Cloralex, relación 20 ml de agua y 30 ml de cloro) por 10 min y enjuagadas con agua destilada estéril, seguido de otro lavado con alcohol al 70% (35 ml de alcohol absoluto y 15 ml de agua destilada) por 3 minutos y también se enjuagaron con agua destilada estéril. Se descartó el agua de enjuague y reservaron las semillas en el vaso hasta su siembra.



Figura 6: Enjuagues con diferentes detergentes para la correcta desinfección de las semillas.

5.4.2. Elaboración de Medio MS para germinación:

Para la preparación de un litro de medio de cultivo se pesaron en la balanza analítica (A&D/GR-200) 4.43 g/L^{-1} de medio Murashige y Skoog (MS) y 30 g/L^{-1} de sacarosa (D-sacarosa producto S 391), los cuales se añadieron a un vaso de precipitados con agua, se disolvieron las sustancias y se aforó el volumen a 1000 ml. Se ajustó el pH, comenzando con la calibración del potenciómetro (Hanna Instruments/HI98107) y posteriormente midiendo el pH del medio preparado ajustándolo a un valor entre 5.6 a 5.8, utilizando hidróxido de sodio (NaOH) para disminuir la acidez o ácido clorhídrico (HCl) para aumentarla. Para finalizar se añadió al medio el agente gelificante, en este caso se utilizaron 7 g/L^{-1} de agar bacteriológico (Plant Media), disolviéndolo mientras se le aplicaba calor y agitación, hasta llevar a punto de ebullición utilizando una placa magnética (Corning PC-320) y un agitador magnético. Una vez disuelto e incorporado el agar se retiró el medio del calor y se vertieron aproximadamente 25 ml de medio en cada frasco de cultivo (los contenedores son de vidrio y fueron previamente lavados y esterilizados) al terminar se cubrieron los recipientes con papel aluminio.



Figura 7: Reactivos y equipo básico (balanza analítica y plancha electromagnética) para la preparación del medio de cultivo MS.

5.4.3. Esterilización del medio MS y material de soporte:

Los frascos que contenían el medio de cultivo, así como el material de soporte para la siembra, que consistió en matraces con agua destilada, pinzas, cajas Petri, toallas absorbentes (Sanitas R), vasos de precipitados de 50 ml y una probeta de 100 ml, se cubrió y guardó en bolsas de polipapel, para su esterilización en autoclave (Presto) a 120 lb/presión por 20 minutos. Previo a la esterilización se lavó la autoclave y agregó agua destilada, después de concluido el proceso de esterilización, los materiales se retiraron de la autoclave y se guardaron en un lugar limpio y seco y los medios de cultivo se almacenaron en el refrigerador.

5.4.4. Siembra y germinación *in vitro*

En un área estéril se trabajó para la siembra de semillas que previamente habían sido desinfectadas, tomando con las pinzas cada semilla y se colocaron 5, una a una en cada frasco con medio de cultivo, posteriormente se taparon y sellaron con plástico auto adherible. Los frascos con explantes se incubaron a temperatura ambiente con una media de 23 ± 3 °C. Se utilizaron 50 semillas para cada siembra (3 repeticiones).

Se llevó un registro del número de semillas que germinaron, así como de los explantes y medios contaminados o sin ninguna respuesta, durante 45 días.



Figura 8: Siembra de semillas en medio MS.

5.5. Micropropagación

5.5.1. Soluciones de Reguladores de crecimiento

BAP (6-Bencilaminopurina)

Se preparó una solución madre de 10 ml con 0.04 gr de BAP. El procedimiento consistió en diluir los 0.04 gr de BAP con Ácido Clorhídrico gota a gota y agua tibia, para los 10 ml se aforó agregando agua destilada.

ANA (Ácido Naftalenacetico)

Se preparó una solución madre de 250 ml + 10 ppm del regulador para enraizar ANA; para esto se tuvo que pesar en una balanza analítica 0.01 gr del regulador ANA, diluido con alcohol gota a gota hasta disolverse y aforado a 250 ml de agua destilada.

5.5.2. Elaboración de medio para micropropagación (MS adicionado con ANA + BAP)

Para la preparación del medio se utilizó: 0.5 mg/L^{-1} de ANA, 0.3 mg/L^{-1} de BAP, 4.43 g/L^{-1} de Medio MS y 30 g/L^{-1} de Sacarosa. Todos los reactivos se pesaron

en la balanza analítica. Para tener un pH óptimo se calibró con un potenciómetro a una escala 5.6-5.8, utilizando NaOH y HCl para el ajuste del pH. La solución se aforó a 1 L después, se le agregó 7 g/L⁻¹ de agar como gelificante y se calentó en una plancha magnética, hasta el punto de ebullición y con la ayuda de un agitador magnético para una mejor dilución de los solutos, se vertió el medio en frascos de cristal previamente lavados, esterilizados y tapados.

5.5.3. Esterilización de medios y material de soporte.

Se esterilizaron los frascos con el medio y los materiales de micropropagación a una autoclave a 120 lb/presión por 20 minutos. Previamente lavada la autoclave y agregándole agua potable a una cantidad considerable, los frascos se colocaron en bolsas de plástico y el matraz con agua destilada, pinzas, mangos, cajas Petri, Sanitas, vasos de precipitado y probetas, se embolsaron y marcaron con cinta indicadora. Después de la esterilización los materiales se llevaron a refrigeración.

5.5.4. Siembra de explantes para la obtención de callos.

Obtenidas las plántulas de *A. montana* de 3 cm con dos hojas formados, se retiraron del medio y se colocaron en una caja Petri para realizar el corte a partir de la zona basal por arriba de la zona radicular, aproximadamente 1 cm, hasta donde se consideró actividad celular del tejido meristemático. Los explantes obtenidos de 1 cm se llevaron al medio antes mencionado (ANA y BAP).



Figura 9: Siembra de semillas en medio MS.

5.6. Enraizamiento

5.6.1. Elaboración de medios para enraizamiento (MS + ANA)

Para la preparación del medio de MS+ANA se utilizó, 0.5 mg/L^{-1} de ANA, 4.43 g/L^{-1} de Medio MS y 15 g/L^{-1} de Sacarosa. Pesado en una balanza analítica y aforado en una probeta. El pH se midió con un potenciómetro y ajustó en un valor de 5.7, utilizando NaOH y HCl para disminuir o aumentar la acidez. Después se le agregó 7 g/L^{-1} de agar y se disolvió aplicando calor hasta la ebullición utilizando una plancha magnética a una temperatura de $200^\circ \text{ Celsius}$, y con la ayuda de un agitador magnético para una mejor dilución de los solutos. Disuelto el medio, se vertió en frascos de vidrio previamente lavados, esterilizados y tapados.

5.6.2. Esterilización de medios y material de soporte.

Los frascos con el medio y los materiales para el enraizamiento se esterilizaron en una autoclave a 120 lb/presión por 20 minutos. Previamente lavado la autoclave y agregándole agua potable a una cantidad considerable. Los frascos se colocaron en bolsas de plástico y el matraz con agua destilada, pinzas,

mangos, cajas Petri, Sanitas, vasos de precipitado y probetas, se embolsaron y con cintas indicadoras. Después de la esterilización se llevó a refrigeración.

5.6.3. Enraizamiento de plántulas obtenidas a partir de callos.

Después de obtenidas los callos de *A. montana*, se observó que se formaron brotes que generan nuevas plantas, así que se decidió separar las fracciones de callo que presentaban brotes y estos se colocaron en un medio para promover la formación de raíces, se colocaron en una caja Petri para separar las plántulas, se trasplantaron a un nuevo medio que contenía regulador ANA, este proceso se realizó todo en asepsia; colocando de 4 a 5 plantas en cada frasco.



Figura 10: Trasplante de callos a medio de cultivo para enraizamiento.

5.7. Aclimatación

5.7.1. Preparación de sustrato y trasplante

Las plantas obtenidas y enraizadas con ácido naftalanacético en *In vitro* se trasplantaron a sustrato (*ex vitro*), con la asepsia necesaria para una mejor sobrevivencia de las plántulas y a una incubación a temperatura de 25° C. Posterior a este proceso se llevó las plantas a condiciones del ambiente.

Para lo anterior se preparó el sustrato con *peat moss*, vermiculita y perlita (proporción 8:1:1) hidratado y esterilizado a una temperatura de 120 lb/presión por 30 minutos, se colocó en charolas de plástico con un domo de protección, dentro de estos contenedores se colocaron las plantas seleccionadas para su aclimatación.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Caracterización física de las semillas

A partir de la medición de las semillas, se determinó que en promedio su longitud es de 43 mm y el ancho es de 36 mm (Tabla 5, en anexos). El color corresponde al negro (Gley B Y BG 2.5/1006) consultado en http://edafologia.ugr.es/programas_suelos/practclas/abcsol/comun/mgley2.htm, estos resultados contribuyen a la descripción de la especie, ya que tal información no se menciona en la descripción de la especie realizada por Villarreal (1996) no se mencionan características morfológicas de la semilla; sin embargo, Vázquez-Díaz *et al.*, (2011) registran para el *Agave salmiana* características típicas de color negro y forma ovoide que comparten con el género *Agave*.

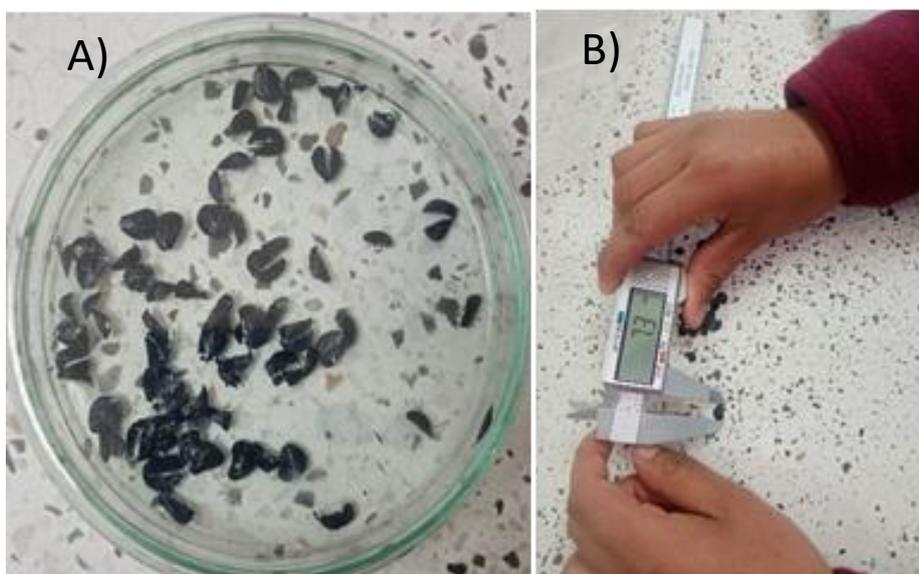


Figura 11: A) Semilla de *Agave montana*, B) Registro de medida (Archivo personal).

6.2. Prueba de viabilidad de semillas

De las 50 semillas utilizadas para la prueba de viabilidad, se obtuvo que 12 semillas (24%) se consideraron viables, ya que se observó una tinción mayor al 80% del área del embrión, determinada por comparación con la guía del Servicio

Nacional de Inspección y Certificación de Semillas (SNICS) (<https://www.gob.mx/snics/es/articulos/como-saber-que-tan-viable-es-una-semilla?idiom=es>, 2018) y 38 no viables.

La viabilidad, de acuerdo con la definición propuesta el SNICS, es la capacidad que guarda la semilla para dar una respuesta de germinación, por consiguiente, consideramos que las semillas de *A. montana* tienen una baja viabilidad. Por otra parte, la técnica da un estimado de la respuesta de germinación, pero se deben de considerar a los factores abióticos como humedad, luz, temperatura y edad de la semilla como detonantes de la formación de una nueva planta, así como Sánchez *et al.* (2011) refiere que la respuesta de germinación disminuye al incrementar el tiempo en el que se almacenan las semillas y sin una temperatura controlada (preferentemente baja). Condición que se observó en las semillas, ya que la fecha de colecta se refiere a marzo de 2018, de capsulas verdes (información proporcionada por la colectora), y conforme transcurría el tiempo y se realizaba la germinación de las semillas su respuesta era menor.

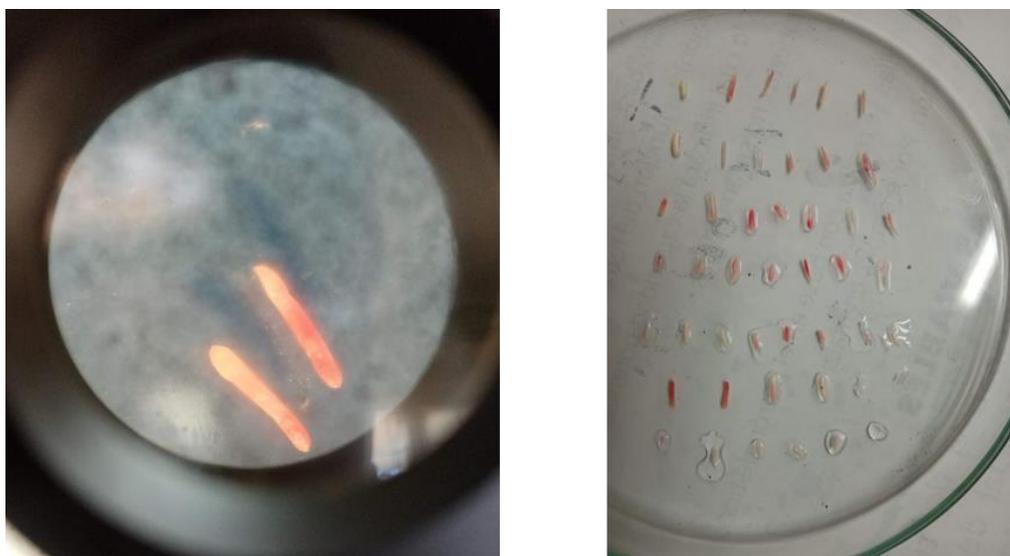


Figura 12: Semillas viables (tinción roja) e inviables (blancas) analizadas por la prueba de sal de tetrazolio (Archivo personal).

Comparando el resultado de la prueba de viabilidad (24 %) y la germinación de las tres repeticiones obtenemos un promedio de 26.6 % de semillas germinadas. Determinamos que la prueba de viabilidad para esta especie *A. montana* difiere en un 2.6 % con la prueba de germinación, considerando que es un porcentaje bajo

de diferencia y puede haber factores como la interpretación del color lo que lleve a ese cambio en el valor determinado.



Figura 13: Respuesta de germinación in vitro, realizada por triplicado (Archivo personal).

6.3. Velocidad y porcentaje de germinación

Para la respuesta de germinación se evaluó la velocidad y porcentaje, considerando una semilla germinada la que pasó por el proceso de inhibición, activación del metabolismo, movilización de nutrientes, rompimiento de testa y formación de primordios radiculares y caulinares. De acuerdo con el registro de datos, en la figura 14 se observa que el tiempo mínimo de germinación ocurrió en el día 4 dds (repetición 2) y el máximo fue para el día 37 (repetición 1); el día con el máximo de germinación fue entre los días 9 y 11 en todas las repeticiones.

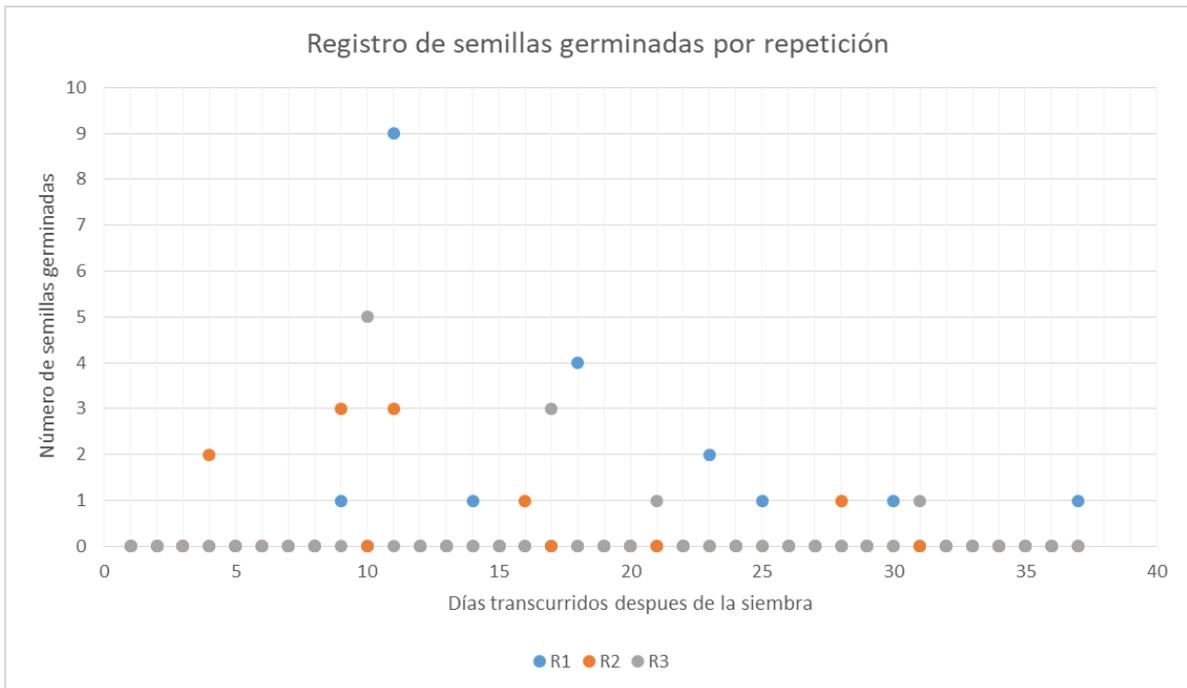


Figura 14: Resultados de número de semillas germinadas e índice de velocidad de germinación.

Con los datos obtenidos, se calculó el índice de velocidad de germinación (IVG), de acuerdo con la propuesta de Maguire (1962) y Martínez *et al.* (2010), que representa la relación del número de semillas germinadas, con el tiempo de germinación.

$$IVG = \frac{P_1}{T_1} + \frac{P_2}{T_2} + \frac{P_3}{T_3} + \dots + \frac{P_n}{T_n}$$

Figura 15: Ecuación para cálculo del IVG (Maguire 1962).

Dónde: P1, P2, P3...Pn = representa el número de plántulas normales, germinadas y completas en el primer, segundo, tercer y último conteo de la evaluación; y T1, T2, T3... Tn = es el tiempo en días para cada germinación.

Comparando los valores de las tres repeticiones se observa que el valor de R1 y R3 es muy cercano, pero son mayores respecto al valor de R2 (Cuadro 4).

El índice de IVG nos permite evaluar la respuesta de las semillas germinadas en un medio MS y determinan en gran medida la calidad de las semillas. Así mismo, permite reconocer el efecto de tratamientos a las semillas como el medio MS, en la respuesta de germinación y desarrollo de plántulas.

Cuadro 4: Resultados obtenidos realizando conteos diarios del número de semillas germinadas (IVG).

Número de repetición	IVG
R1	7.62
R2	4.95
R3	7.08

Respecto al porcentaje de germinación se realizaron tres pruebas en las cuales los porcentajes fueron de 40 % para la primera repetición, 20 % para la segunda y 20 % para la tercera, considerando que en promedio se tiene un porcentaje de 26.6 %, cabe destacar que al comparar los porcentajes de germinación con el valor de viabilidad registrado con la prueba de sal de tetrazolio, se observaron que ambos valores son cercano y se pueden utilizar como referencia para conocer la respuesta de germinación *in vitro*.

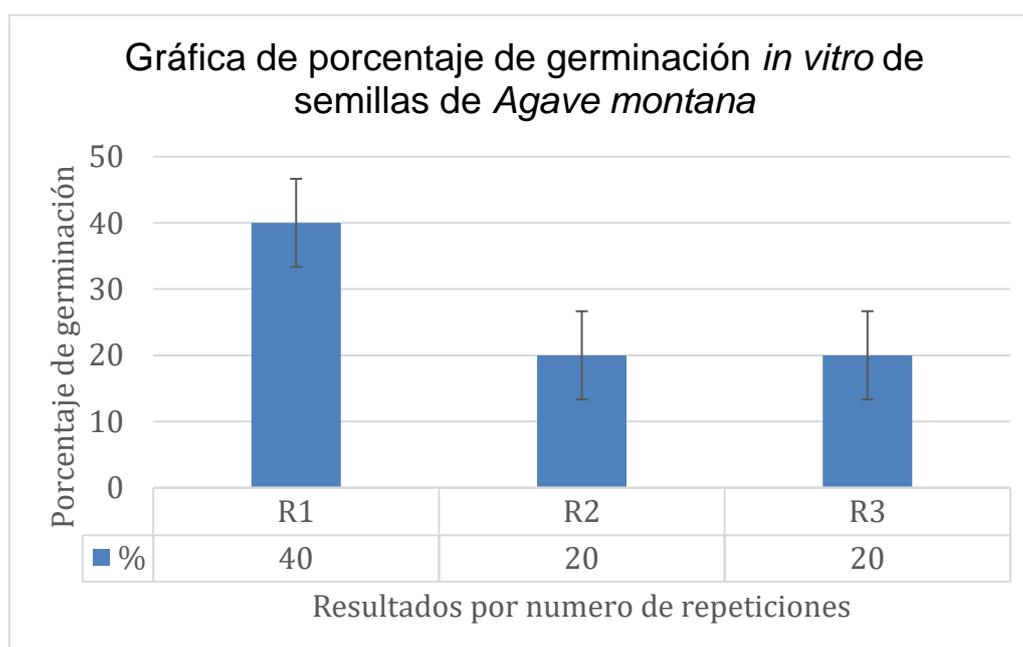


Figura 16: Porcentaje de germinación *in vitro* de semillas.

Al comparar los resultados con los de otras especies de agaves se encontró que, Niño-Vázquez (2013), registró resultados de *A. mapisaga* con un promedio del 68 % y una germinación de 70 % contra *A. angustifolia* subsp. *tequilana* con un promedio de 19 % de semillas viables con una germinación de un promedio de 30 % y sugiere que sus resultados se atribuyen a la incompatibilidad genética

por causa de los efectos de la endogamia y factores que afectan el desarrollo del polen (parteaguas para la formación del fruto), o de factores aberrantes en el desarrollo del gametofito femenino que pueden estar relacionados con la baja fertilidad observada para esta especie.

Es probable que la proporción de embriones inviábiles de *A. angustifolia* subsp. *tequilana* que presentaron también procedan de la fertilización con tubos polínicos anormales y que esto represente condiciones de debilidad y en consecuencia mortalidad del embrión en el corto plazo (Escobar-Guzmán *et al.*, 2008), en este estudio no se puede asegurar la endogamia, pero si la baja viabilidad determinado por la inmadurez de la semilla y el tiempo de almacenamiento de la misma.

Independiente a la comparación de los resultados obtenidos con otros autores, destacamos que, los datos de germinación *in vitro* para *A. montana* son la primera referencia registrada, ya que se ha realizado una búsqueda bibliográfica exhaustiva y no se tiene ningún otro referente.

La contaminación se atribuye a dos factores, el primero la interacción del medio natural con las semillas, y el segundo a faltas en el protocolo de desinfección (tiempo, uso de detergentes y/o desinfectantes); sin embargo, el número de semillas contaminadas es de 0.4 (en promedio) lo cual no representa un valor que lleve a resultados negativos en la investigación.

Otros valores registrados para el desarrollo de las plántulas fueron la altura formada, como referente para futuras investigaciones. Los registros por repetición (Cuadros 11, 12 y 13, anexos) se concentran en la Cuadro 5, donde distinguimos valores diferentes para la altura máxima y mínima obtenida, pero en los valores promedio, si observamos mayor uniformidad, considerando que el tamaño de las plantas en promedio se encuentra entre los 2.5 y 3.9 cm. La diferencia del tamaño la atribuimos solo a las características genéticas de cada semilla, ya que la concentración de nutrientes, de agua y pH del medio fue igual en las tres repeticiones. Por otra parte, si hay un factor en la incubación de las semillas que pudiera llevar a la diferencia en el crecimiento, y es la temperatura, que, aunque se mantiene constante en el área de incubación, se tienen fluctuaciones derivadas del ambiente (clima de acuerdo a la estación).

Cuadro 5: Medidas máximas, mínimas y promedio de las plántulas germinadas *in vitro*.

Plántulas germinadas	Altura (cm)		
	Máxima	Mínima	Promedio
Repetición 1	4.4	1	2.68
Repetición 2	2.7	2.5	2.56
Repetición 3	6	2.3	3.96

6.4. Micropropagación

Callogenesis y Organogénesis

El tejido meristemático utilizado para la inducción en la formación de callo fue el apical caulinar, aplicando una concentración de las fitohormonas 3 mg/L-1 de BAP tomando como referencia a los experimentos de Reyes-Silva *et al.* (2013) quienes cultivaron nolinias y con diferentes concentraciones (1, 2, 3 y 4 mg/L-1) de citocininas (BA, 2iP, TDZ y MT) y de auxinas (ANA) 0.5 mg/L-1, así como también en el trabajo de Rodríguez *et al.* (2021) quienes utilizaron concentraciones ANA de 0.2, 0.3 y 0.4 mg/L-1.

Se registró una respuesta favorable ya que se observó la formación de tejido calloso blanquecino, que con el paso del tiempo se tornaba verde (Fig. 17) y desarrollaba brotes tal como lo obtuvieron Reyes-Silva *et al.* (2013) en la misma concentración que utilizaron en la siembra de siete especies de nolinias Reyes-Silva *et al.* (2013), a pesar de que son especies diferentes, es común su origen taxonómico (familia Asparagácea) y morfológico (crecimiento en roseta).



Figura 17: Respuesta de formación de callos en in vitro, realizada por triplicado (Archivo personal).

Por otra parte, se confirma que los explantes jóvenes tienen una alta respuesta en la división celular debido a que se encuentra en crecimiento y sus meristemas están activos tal como lo presenta Domínguez-Rosales *et al.* (2008) quienes describen la regeneración *in vitro* de 5 especies de agaves obteniendo brotes a partir de meristemas axilares localizados en el segmento basal de las plantas, o bien a través de organogénesis o embriogénesis somática indirecta, a partir de tejido calloso generado también *in vitro*, tal como el presente estudio, siendo los callos que formaron del tejido meristemático nosotros consideramos que se trata de un proceso de organogénesis indirecta.

En los resultados de la micropropagación: se consideraron dos respuestas, la primera fue la formación de tejido calloso “callogenesis” y posteriormente a partir de ese callo la formación de brotes que darán origen a tallo, hojas y raíces para constituirse como una planta completa.

Para inducir la formación de callo se seleccionó el tejido meristemático apical caulinar utilizando una concentración de fitohormonas 0.5 mg/L-1 de ANA; en sus resultados ellos obtuvieron un número de callos 10.5 por explante en nuestro caso cada explante, formó en promedio de 9 callos por repetición (Cuadro 6), Rodríguez *et al.* (2021) Utilizaron concentraciones de ANA de 0.2, 0.3 y 0.4 mg/L en cultivos de *Agave durangensis* Gentry registraron un resultado semejante a los de este estudio para la formación de callos si bien sus resultados es para otra especie, es evidente la acción de la relación citocinina y auxina como promotoras de la dediferenciación celular e incremento de volumen del tejido ocasionado por la división celular.

Cuadro 6: Promedio de callos formados por repetición.

Siembra de explante	Número de callos
Repetición 1	10
Repetición 2	8
Repetición 3	9
Promedio	9

En el trabajo de Domínguez-Rosales *et al.* (2008) establecieron protocolos para la propagación masiva *in vitro* de *A. cupreata*, *A. karwinskii*, *A. potatorum*, *A. difformis* y *A. obscura*; las tres primeras se utilizan para producir mezcal en los Estados de Guerrero y Oaxaca, y las dos últimas son ornamentales. En general,

todos los antecedentes confirman que la biotecnología vegetal (cultivo *in vitro*) puede ser el método más eficiente para la propagación de plantas de agave con fines de producción masiva o establecimiento de plantaciones.

Es evidente que una respuesta para la detección de material vegetal, en este caso nuevas plantas de agave, se pueden obtener a partir de un proceso de cultivo *in vitro* (Cuadro 2), los ejemplos mostrados en la revisión de Domínguez-Rosales *et al.* (2008), demuestran que esta producción masiva puede aplicarse tanto a tejidos de especies silvestres como cultivados (para ornamentales y mezcaleras).

Respecto a la organogénesis, como segunda respuesta de la micropropagación, tuvimos los siguientes resultados 2, 3 y 5 brotes por unidad de callo es decir, el segmento que previamente se estableció e indujo a la formación de tejidos calloso, obteniendo un aproximado de 4 plántulas nuevas por frasco, considerando que en cada recipiente se sembraron 5 explantes, si ese valor se multiplica por el total de recipientes en cada repetición, entonces al final del experimento obtuvimos un total de 60 plántulas nuevas.

Otro aspecto observado fue la capacidad de regeneración del callo, ya que al subcultivar, después de la obtención de brotes el tejido calloso se resembró volviendo a generar callo y posteriormente nuevos brotes. En particular esta respuesta se atribuye a dos factores, uno es la totipotencia que tiene la célula vegetal para que a partir de una célula se pueda regenerar una planta nueva con todas las características de la planta que le dio origen,

Y el segundo factor que contribuye a la regeneración del tejido, fue la concentración de fitohormonas que contiene el medio: bencilaminopurina y ácido naftalenacético, citoquinina y auxina respectivamente, que al encontrarse ambas en el medio activan la división celular.

6.5. Enraizamiento

Después de desarrollados los brotes derivados de los callos, se les permitió crecer hasta observar una estructura típica de plántula (callo y hojas) (Figura 18), sin embargo, esas plántulas no presentaban raíces y debían ser inducidas para

su transformación. Por lo anterior, se cultivaron en otro medio que contenía solo ácido naftalenacético, auxina cuya capacidad está relacionada con la rizogénesis.

De un total de 60 brotes, 20 se cultivaron en medio para enraizamiento y entre el día 10 y 40 dds se observó la formación de 3 raíces por brote. La rizogénesis es necesaria debido a que es un órgano que se requiere para la asimilación de nutrientes y absorción de agua, además de su función como soporte de la planta.

Cabe destacar que esta última parte fue fundamental para el proceso siguiente denominado aclimatación, aunque no fue parte del planteamiento inicial, se observó si los brotes que formaron raíces presentaron la capacidad de adaptarse a las condiciones *ex vitro*, así que se seleccionaron 10 plantas y se trasladaron en un sustrato preparado con *peatmoss*, agrolita y vermiculita en relación 8:1:1. Después de los 15 a 20 dds se observó que las plantas se habían adaptado, observándose erguidas, turgentes y de un mayor tamaño.

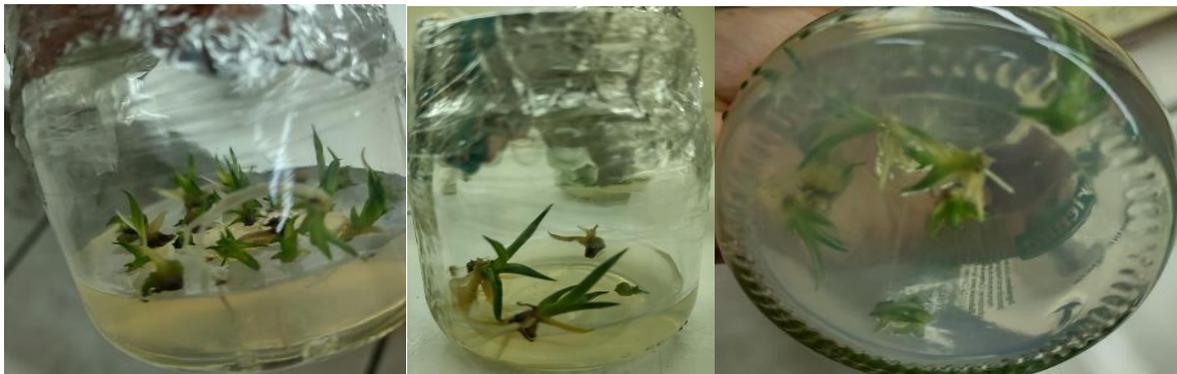


Figura 18: Brotes derivados de los callos e inducción de raíces en las plántulas obtenidas *in vitro*.



Figura 19: Brotes generados se logró en medio basal con reguladores del crecimiento.

7. CONCLUSIONES

La germinación *in vitro* de las semillas de *Agave montana* es viable, sin embargo, disminuyó conforme se incrementó el tiempo de almacenamiento.

Se logró la inducción de callos a partir del tejido meristemático apical caulinar al adicionar al medio de cultivo una proporción mayor de citocininas respecto a la auxina utilizada.

A partir de las condiciones de cultivo *in vitro* utilizados en el presente estudio se sugieren como un protocolo repetible y confiable, además aplicable a otras especies de *Agave*, además para *Agave montana* puede servir como una estrategia para el aprovechamiento y conservación.

8. LITERATURA CITADA

- Alanís-Flores, G. J., y M. González-Álvarez. (2010). Uso de los magueyes en Nuevo León. Ciencia. Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, México.
- Álvarez de Z., A. Á. (1986). Las inflorescencias de Agavaceae. *Revista del Jardín Botánico Nacional*, 3-14 p.
- APG III. (2009). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society* 161(2): 105-121.
- APG IV. (2016). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society* 181(1): 1-20.
- Argueso, C. T., Ferreira, F. J., y Kieber, J. J. (2009). Environmental perception avenues: the interaction of cytokinin and environmental response pathways. *Plant Cell Environment*, 32(9): 1147-1160.
- 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(2): 101-106.
- Aureoles-Rodríguez, F., J. P. Legaria-Solano, J. Sahagún-Castellanos y M. G Peña-Ortega, (2008). Propagación *in vitro* del Maguey bruto (*Agave inaequidens* Koch), una especie amenazada de interés económico. *Revista Chapingo. Serie Horticultura*, 14(3): 263-269.
- Bello-Bello, J. J., Pérez-Sato, J. A., Cruz-Cruz, C. A. y Martínez-Estrada, E. (2017c). Light-emitting diodes: progress in plant micropropagation. *InTech*, 6(1): 93-103.
- Bentham, G. y J.D., Hooker. (1883). Genera Plantarum III. Reeve and Co., Londres, 780- 781 p.

- Bogler, D. J., Pires, J. C., y Francisco-Ortega, J. (2006). Phylogeny of Agavaceae Based on *ndhF*, *rbcL*, and its Sequences. *Aliso: A Journal of Systematic and Floristic Botany*, 22(1): 313-328.
- Borland, A. M., Griffiths, H., Hartwell, J., y Smith, J. A. C. (2009). Exploiting the potential of plants with crassulacean acid metabolism for bioenergy production on marginal lands. *Journal of Experimental Botany*, 60(10): 2879-2896.
- Botero, L. y López, J. (2015). Efecto de diferentes longitudes de onda procedentes de luces LED sobre el crecimiento y morfogénesis de la especie recalcitrante *Peltogyne purpurea* Pittier bajo condiciones de cultivo *in vitro*. XVI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Guadalajara Jalisco México.
- Castillo-Quiroz, D., J. A. Villarreal Quinanilla y A. Cano Pineta. (2007). El género *Agave* L. bajo cultivo: Taxonomía, distribución y usos. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales* 32(101): 57-70.
- Castillo, A. (2004). Propagación de plantas por cultivo *in vitro*: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. INIA, Uruguay.
- Castorena-Sánchez, I. (1985). Estudio citogenético de agaves productores de fibra en Yucatán: *A. angustifolia*, var. *marginata* hort., *A. fourcroydes*, *A.* híbrido 11648, *A. ixtli*, *A. sisalana*. (Tesis de Doctorado). Universidad Nacional Autónoma de México, México. 41-51 p.
- Chase, M. W., Reveal, J. L., y Fay, M. F. (2009). A subfamilial classification for the expanded asparagalean families Amaryllidaceae, Asparagaceae and Xanthorrhoeaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 161(2): 132-136.
- Chen, C. C., Agrawal, D. C., Lee, M. R., Lee, R. J., Kuo, C. L., Wu, C. R. y Chang, H. C. (2016). Influence of LED light spectra on *in vitro* somatic embryogenesis and LC-MS analysis of chlorogenic acid and rutin in *Peucedanum japonicum* Thunb.: a medicinal herb. *Botanical Studies*, 57(1): 1-8.

- Colunga-García Marín, P., A. Larqué, L. E. Eguiarte y D. Zizumbo-Villarreal (2007). En lo Ancestral hay Futuro: del tequila, los mezcales y otros Agaves. *Centro de Investigación Científica de Yucatán*, México. 395-402 p.
- CONABIO. (2006). Mezcales y diversidad, 2a. ed. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México.
- Costa, J.M., Reis, M., Passarinho, J.A., Ferreira, M.E. y Almeida, D.P.F. (2017). Microeconomic and environmental sustainability of *Portuguese* greenhouse horticulture: a critical assessment. *Acta Horticulturae*. 1170: 1117-1124.
- Cronquist, A. (1981). An integrated system of classification of flowering plants. Columbia University Press. New York, USA. 1261 p.
- Dahlgren, R. M. T., H. T. Clifford y P. F. Yeo. (1985). The Families of The Monocotyledons: Structure, Evolution and Taxonomy. Springer-Verlag. Berlin, Germany. 520 p.
- Domínguez-Rosales, M., A. Alpuche S., N. Vasco M. y E. Pérez M. B. (2008) Efecto de citocininas en la propagación *in vitro* de agaves mexicanos. *Revista Fitotecnia Mexicana* 31:317-322.
- Domínguez-Rosales. M. S., González, J. M. de L., Rosales, G. C., Quiñones, V. C., Díaz de León, S. D., Mireles, O. S. J. y Pérez, M. B. E. (2008a). El cultivo *in vitro* como herramienta para el aprovechamiento, mejoramiento y conservación de especies del género *Agave*. *Investigación y Ciencia* 41: 53-62.
- Dubé, L., Webb, P., Arora, N. K., y Pingali, P. (2014). Agriculture, health, y wealth convergence: bridging traditional food systems and modern agribusiness solutions. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1331: 1–14.
- Dumortier, B. C. J. (1829). Agavineae. Analyse des Familles des Plantes. J. Casterman, Tournay. 57-58 p.

- Eguiarte Fruns, L.E. y A. González González. (2007). De genes y magueyes, estudio y conservación de los recursos genéticos del tequila y el mezcal. *Ciencias* 87: 28-35.
- Eguiarte, L. E., V. Souza y A. Silva. M. (2000). Evolución de la familia Agavaceae: filogenia, biología reproductiva y genética de poblaciones. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 66: 131–150.
- Enríquez del Valle, J.R., Carrillo-Castañeda, G., Rodríguez de la O, J.L. (2005) Sales inorgánicas y ácido indolbutírico en el enraizado *in vitro* de brotes de *Agave angustifolia*. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 28: 175-178.
- Escobar-Guzmán, R. E., Hernández, F. Z., Vega, K. G., y Simpson, J. (2008). Seed production and gametophyte formation in *Agave tequilana* and *Agave americana*. *Botany*, 86(11): 1343-1353.
- Espinosa-Leal, C. A., Puente-Garza, C. A., y García-Lara, S. (2018). *In vitro* plant tissue culture: means for production of biological active compounds. *Planta*, 248(1): 1-18.
- Faegri, K. y L. Van Der Pijl. (1979). The principles of pollination ecology. 3rd ed. Pergamon, Press. London, Oxford. Great Britain. 244-248 pp.
- Fossard, R.A. (1976). Tissue culture for plant propagators. University of New England, Armidale, Australia.
- Gamborg, O., L., F. Constabel, R. A. Miller. (1970). Embryogenesis and production of albino plants from cell cultures of *Bromus inermis*. *Planta*, 95: 355-358.
- García, E. Javier; Méndez, S. de Jesús; Talavera, Daniel (2010). El género *Agave* spp. En México: principales usos de importancia socioeconómica y agroecológica. *Revista Salud Pública y Nutrición*. Edición Especial No. 5- . (ISSN 1870-0160). México.
- García, Mendoza, A. J. (2007). Los agaves de México. *Ciencias* 87: 14-23.
- García-Mendoza, A. (2011). Agavaceae. *In*: Medina, R. (ed.). Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Fascículo 88. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., México. 95 p.

- García-Mendoza, A., y Galván-V, R. (1995). Riqueza de las familias Agavaceae y Nolinaceae en México. *Botanical Sciences* (56): 7-24.
- Garrido, L., y Rodríguez, B. (2004). Avances en la investigación del *agave tequilero*. Consejo Regulador del Tequila AC México.
- Gentry, H. S. (1982). Agaves of Continental North America. Tucson, AZ, EE.UU.: University of Arizona Press: 154-171.
- Gómez, Kosky, R., M.S. de Feria, L.P. Posada, T. Gilliard, F.M. Bernal, M.V. Reyes, M.M, Chávez y E.M. Quiala. (2002). Embriogénesis somática del cultivar híbrido de banano FHIA-18 (AAAB) en medio líquido y escalado en un biorreactor. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 68: 21–26.
- González, E. J. (2005). Mass propagation of tropical crops in temporary immersion systems. *In: Liquid culture systems for in vitro plant propagation*. 197-211 p.
- Good-Avila, S. V., Souza, V., Gaut, B. S. y Eguiarte, L. E. (2006). Timing and rate of speciation in Agave (Agavaceae). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103 (4): 9124-9129.
- Granados D. (1993), Los agaves en México, 1ª. Edición., Universidad Autónoma Chapingo, México. 252 p.
- Hartmann, H., Kester, D., Davies, F., y Geneve, R. (1997). Plant Propagation, Principles and Practices. New Jersey: Prentice-Hall. doi: <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2018.1212.68>.
- Hazra, K. S., Das, S., Das, K. A. Sisal (2002). Plant regeneration via organogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 70: 235-240.
- Heller R. (1953), Rescherches sur la nutrition minérale des tissus végétaux cultivés *in vitro*. *Ann. Sci. Nat. Bot. Veg. Ser. II*: 1-5.
- Howell, D. J. (1972). Physiological adaptations in the syndrome of chiropterophily with emphasis on the bat *Leptonycteris* Lydekker. The University of Arizona. 152 p.
- http://edafologia.ugr.es/programas_suelos/practclas/abcsol/comun/mgley2.htm

- Hurtado, D.; Merino, M. (1988). Cultivo de tejidos vegetales. México, Trillas. 232 p.
- Hutchinson, J. (1934). The families of flowering plants II. Monocotyledons. MacMillan y Co. London, UK. 234 p.
- Jiménez González. (1998). Mass propagation of tropical crops in temporary immersion systems. Institute of Plant Biotechnology. Central University of las Villas:191-195 p.
- Johnson SD, Steiner KE. (2000). Generalization versus specialization in plant pollination systems. *Trends in Ecology and Evolution* 15: 140-143.
- Krikorian, A. (1991). Propagación clonal *in vitro*. En: Roca, W. y Mroginski, L. (Ed). Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones. CIAT, Cali, 95-12 p.
- Kubitzki, K. y Rudall, P.J. (1998). Asparagáceas. En: Kubitzki, K. (eds) Plantas con flores · Monocotiledóneas. Las familias y géneros de plantas vasculares, vol 3. Springer, Berlín, Heidelberg. 457-460 p.
- Kunakhonnuruk, B., Inthima, P. y Kongbangkerd, A. (2019). *In vitro* propagation of Rheophytic Orchid, *Epipactis Flava* Seidenf. A comparison of semi-solid, Continuous Immersion and Temporary Immersion Systems. *Biology*. 8(4): 2-8.
- Labrada R, (2005). Manejo de malezas para países en desarrollo. Addendum 1, Estudio FAO Producción y Protección Vegetal. 403 p.
- Linnaeus, C. (1753). *Species Plantarum*. Holmiae. Stockholm, Sweden. 1200 p.
- Litz, R. E y Jarret, R. L. (1991). Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos: embriogénesis somática y organogénesis. En: Cultivos de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones (WM Roca & LA Mroginski, eds.), pp.: 143-152. CIAT. Cali. Colombia.
- López, L., Merino, Y., Enríquez, J., Rodríguez, G. y Lagunas, Z. (2018). Organogénesis *in vitro* en tejidos de tallo de *Agave marmorata* y *Agave angustifolia*. *Revista Mexicana de Agroecosistemas*, 5(2): 98–105.

- Lott, E. J. y A. García-Mendoza. (1994). Agavaceae. In: Davidse, G., M. Sousa S. y A. O. Chater (eds.). Flora Mesoamericana Volumen 6. Alismataceae a Cyperaceae. Instituto de Biología-Universidad Nacional Autónoma de México, Missouri Botanical Garden, The Natural History Museum (London). México, D.F., México. 35-47 p.
- Lüttge U., (2004). Ecophysiology of crassulacean acid metabolism (CAM). *Annals of Botany* 93: 629 – 652.
- Maguire, D. (1962). Speed of germination-aid. In: Selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Sci. (USA)*. 2(1): 176-177.
- Martínez Solís, J., Virgen Vargas, J., Peña Ortega, M. G., y Santiago Romero, A. (2010). Índice de velocidad de emergencia en líneas de maíz. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 1(3): 289-304.
- Martínez-Estrada, E., Caamal-Velázquez, J. H., Morales-Ramos, V., y Bello-Bello, J. J. (2016). Light emitting diodes improve *in vitro* shoot multiplication and growth of *Anthurium andreanum* Lind. *Propagation of Ornamental Plants*, 16(1): 3-8.
- Martínez-Palacios, A., Ortega-Larrocea, M. P., Chávez, V. M., y Bye, R. (2003). Somatic embryogenesis and organogenesis of *Agave victoriae-reginae*: Considerations for its conservation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 74(2): 135-142.
- Matiz, A., Mito, P. T., Mayorga, A. Y., Freschi, L., y Mercier, H. (2013). CAM photosynthesis in bromeliads and agaves: what can we learn from these plants. *Photosynthesis*, 1: 91-134.
- Mezcales de Leyenda Mezcales únicos Montana Edición Especial 2016. <https://www.oldtowntequila.com/mezcales-de-leyenda-mezcales-unicos-montana-edicion/>
- Miller, A. y Erston, J.V. (2010). Fisiología Vegetal. 48-53 p.
- Moreno, K. M. Q. (2015). Micropropagación de plátano enano (*Musa* spp) utilizando manos de flores masculinas inmaduras con diferentes

concentraciones de desinfectantes y reguladores de crecimiento. *Producción Agropecuaria y Desarrollo Sostenible*, 3: 51-59.

Munsell color, (2000), Munsell® Soil Color Charts: New Windsor, Nueva York. EUA, GretagMacbeth. <https://munsell.com/about-munsell-color/how-color-notation-works/how-to-read-color-chart/>

Murashige, T.; Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant.* (15): 437-97.

Murillo-Talavera, M. M., Pedraza-Santos, M. E., Gutiérrez-Rangel, N., Rodríguez-Mendoza, M. D. L. N., Lobit, P., y Martínez-Palacios, A. (2016). Led light quality and *in vitro* development of *Oncidium tigrinum* and *Laelia autumnalis* (Orchidaceae). *Agrociencia*, 50(8): 1065-1080.

Nakamura, T. (1990). Propagacao vegetativa *in vitro* de *Coffea* spp. Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeiraas, Campos Jordao, Brasil. 129 pp.

Nikam, D. T., Bansude, M. G. y Aneesh Kumar, C. K., (2003). Somatic embryogenesis in sisal (*Agave sisalana* Perr. Ex Engelm). *Plant Cell Rep.* 22: 188-194.

Niño Vázquez, R. (2013). Germinación y viabilidad seminal de *Agave angustifolia* subsp. *tequilana* y *Agave mapisaga*, 21 p.

Nobel, P. S. (1994). Remarkable Agaves and cacti. Nueva York, EE.UU.: Oxford University Press.

Nobel, P. S. (1996). Ecophysiology of roots of desert plants, with special emphasis on agaves and cacti. Plant roots: the hidden half. Dekker, New York, New York, USA, 823-844 p.

Nobel, P. S. y Sanderson, J. (1984). Rectifier-like activities of roots of two desert succulents. *Journal Experimental of Botany*, 35 (5): 727-737.

North, G. B., and Nobel, P. S. (1998). Water uptake and structural plasticity along roots of a desert succulent during prolonged drought. *Plant Cell Environ.* 21: 705–713.

- Ojeda Revah, L. y B. Ludlow-Wiechers. (1995). Palinología de Agavaceae, una contribución biosistemática. *Bol. Soc. Bot. México* 56: 25-43.
- Ordaz, S. J. M., Gómez, C. R., de León, S. D. D., Rosales, M. S. D., Balch, E. P. M., Valles, C. Q., y Jiménez, M. D. L. L. G. (2008). El cultivo *in vitro* como herramienta para el aprovechamiento, mejoramiento y conservación de especies del género *Agave*. *Investigación y Ciencia*, 16(41): 53-62.
- Parra, R. (2007). Las hormonas vegetales. Disponible en http://www.wikilearning.com/curso_gratis/las_hormonas_vegetales-funcion_principal/2422-3
- Pax, F. y K. Hoffmann. (1930). Amaryllidaceae. In: Engler, A. y K. Prantl (eds.). *Die Natürlichen Pflanzenfamilien* 15A. 391-430 p.
- Pérez-Molphe Balch, E., M. R. Ramírez-Malagón, H. G. Núñez-Palenius y N. Ochoa Alejo. (1999). Introducción al cultivo de tejidos vegetales. Universidad Autónoma de Aguascalientes. 179 p.
- Portillo, L., Santacruz-Ruvalcaba, F., Gutiérrez-Mora, A., y Rodríguez-Garay, B. (2007). Somatic embryogenesis in *Agave tequilana* Weber cultivar azul. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 43(6): 569-575.
- Pramita, A. D., Kristanti, A. N., Utami, E. S. W., y Manuhara, Y. S. W. (2018). Production of biomass and flavonoid of *Gynura procumbens* (Lour.) Merr shoots culture in temporary immersion system. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 16(2): 639-643.
- Ramírez-Mosqueda, M. A., Iglesias-Andreu, L. G., y Luna-Sánchez, I. J. (2017). Light quality affects growth and development of *in vitro* plantlet of *Vanilla planifolia* Jacks. *South African Journal of Botany*, 109: 288-293.
- Raza, G., Sing, M., y Bhalla, P. (2017). *In vitro* plant regeneration from commercial cultivars of soybean. *BioMed Research International Australia*. doi:<https://doi.org/10.1155/2017/7379693>
- Reveal, J. L. (2012). An outline of a classification scheme for extant flowering plants. *Phytoneuron*, 37: 1-221.

- Reveal, J. L. y W. C. Hodgson. (2002). Agave Linnaeus. In: Flora of North America Editorial Committee (ed.). Flora of North America North of Mexico. Oxford University Press. New York, USA. 442-461p.
- Reyes-Silva, A. I. R., Muñoz, C. F. M., Reyes, M. E. P., y Balch, E. P. M. (2013). Propagación *in vitro* de nolináceas mexicanas. *Investigación y Ciencia*, 21(58): 12-20.
- Robert, M. L., Herrera-Herrera, J. L., Herrera-Alamillo, M. A., Quijano, A. y Balám, U. (2004). Manual for the *in vitro* culture of Agaves. United Nations Industrial Development Organization. 10-51p.
- Robert, M. L., J. L. Herrera-Herrera, E. Castillo, G. Ojeda y M. A. Herrera-Alamillo (2006). An efficient method for the micropropagation of *Agave* species. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.) 318: 165-178.
- Rocha, M., A. Valera y L.E. Eguiarte. (2005). Reproductive ecology of five sympatric *Agave Littaea* (Agavaceae) species y Central Mexico. *American Journal of Botany* 92(8): 1330-1341.
- Rodríguez, D. G. D., Díaz, C. P., Simental, J. A. C., Sánchez, I. A. O., Gallegos, H. M. L., y Ruiz, J. Á. P. (2021). Reguladores de crecimiento en el desarrollo vegetativo de vitroplantas de *Agave durangensis* Gentry. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 8(1): 21.
- Rosales, M. S. D., L. M. G. Jiménez, C. R. Gómez, C. Q. Valles, S. D. D. de León, S. J. M. Ordaz y E. P. M. Balch (2008a). El cultivo *in vitro* como herramienta para el aprovechamiento, mejoramiento y conservación de especies del género *Agave*. *Investigación y Ciencia* 16(41): 53-62.
- Ross, S., y Grasso, R. (2010). *In vitro* propagation of “Guayabo del país” (*Acca sellowiana* (Berg.) (Burret). *Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology*, 83-87.
- Rzedowski, J. (1978). Vegetación de México. Ed. Limusa. México, DF, México. 504 p.
- Salisbury, F.B. y Ross, C.W. (1994). Fisiología Vegetal. V.V. González (trad). Primera edición. Grupo Editorial Iberoamérica. México. 759 p.

- Sánchez Arellano, J. G., Parra Galindo, M. A., Silva Olivas, M. F., & Pedroza Pérez, D. (2011). Efecto de la temperatura y tiempo de almacenamiento sobre la viabilidad en semillas de zámota (*Coursetia glandulosa*, Gray) *Biotechnia*, 13(3), 36-40.
- Santacruz-Ruvalcaba, F., Gutiérrez-Pulido, H., Rodríguez-Garay, B. (1999). Efficient *in vitro* propagation of *Agave parrasana* Berger. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 56: 163-167.
- Schaffer, W. M., y Schaffer, M. V. (1977). The adaptive significance of variations in reproductive habit in the Agavaceae. *Evolutionary Ecology*, 261 p.
- Schenk, R. V y Hildebrandt, A. C. (1972). Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can. J. Bot.* 50: 199- 204.
- Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas | 30 de mayo de 2018
<https://www.gob.mx/snics/es/articulos/como-saber-que-tan-viable-es-una-semilla?idiom=es>, 2018
- Silos-Espino, G., González-Cortés, N., Carrillo-López, A., Guevaralara, F., Valverde-González, M. E., y Paredes-López, O. (2007). Chemical composition and *in vitro* propagation of *Agave salmiana* 'Gentry'. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 82(3): 355-359.
- Slauson, L. (2001). Insights on the pollination biology of *Agave* (Agavaceae). *Haseltonia* 8: 10-23.
- Takhtajan, A. L. (1980). Outline of classification of flowering plants (Magnoliophyta). *The Botanical Review* 46: 225-359.
- Tejavathi, D. H., Rajanna, M. D., Sowmya, R. y Gayathamma, K. (2007). Induction of somatic embryos from cultures of *Agave veracruz* Mill. *In vitro Cellular & Developmental Biology Plant*, 43(5): 423-428.
- Thorpe, T. (2007). History of plant tissue culture. *J. Mol. Microbial Biotechnol*, 37: 169-180.
- Trelease, W. (1920). Amaryllidaceae. In: Standley (ed.). Trees and shrubs of Mexico. Contributions U.S. National Herbarium 23(1): 105-142.

- UNPL. (2019). TP N° 1: medios de cultivo. Obtenido de http://aulavirtual.agro.unlp.edu.ar/pluginfile.php/41270/mod_resource/content/2/1_TP_Medios_de_cultivo_1_.pdf.
- 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 Cellular & Developmental Biology Plant*, 42(4): 336-340.
- Van Jaarsveld, E. y Eggli, U. (2019). Asparagáceas. En: Eggli, U., Nyffeler, R. (eds) Monocotiledóneas. Manual Ilustrado de Plantas Suculentas. Springer, Berlín, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-56324-3_33-1
- Vázquez-Díaz, E., García-Nava, J. R., Peña-Valdivia, C. B., Ramírez-Tobías, H. M., y Morales-Ramos, V. (2011). Tamaño de la semilla, emergencia y desarrollo de la plántula de maguey (*Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck). *Revista Fitotecnia Mexicana*, 34(3): 167-173.
- Verhoek, W. S. (1998). Agavaceae. In: Kubitzki, K. (ed.). The families and genera of vascular plants. Flowering plants Monocotyledons Lillanae (except Orchidaceae) Volume III. Springer. Berlin, Germany. 60-69 p.
- Villarreal Q, J. A. (1996). Una nueva especie de *Agave* subgenero *Agave* (Agavaceae) de México. *Sida, Contributions to Botany*, 191-195.
- Yan, X., Tan, D. K., Inderwildi, O. R., Smith, J. A. C., y King, D. A. (2011). Life cycle energy and greenhouse gas analysis for agave-derived bioethanol. *Energy & Environmental Science*, 4(9): 3110-3121.
- Yang, X., Cushman, J. C., Borland, A. M., Edwards, E. J., Wulschleger, S. D., Tuskan, G. A., y Holtum, J. A. (2015). A roadmap for research on crassulacean acid metabolism (CAM) to enhance sustainable food and bioenergy production in a hotter, drier world. *New Phytologist*, 207(3): 491-504.
- Ying, C., Chen, X., Hu, F., Yang, H., Yue, L. Trigiano, R. y Cheng, M. (2014). Micropropagation of *Agave americana*. *HortScience*. 49(3): 320-327.

Anexos

Cuadro 7: Registro de medidas en longitud (L) y ancho (A) de semillas de *Agave montana*.

Semilla	Repetición 1		Repetición 2		Repetición 3		Repetición 4		Repetición 5	
	L	A	L	A	L	A	L	A	L	A
1	6.4	4.9	7.1	5.9	7.6	5.5	5.9	4.2	6.8	4.7
2	6.1	5.7	7.8	5.0	6.6	4.5	7.3	4.7	7.2	6.0
3	6.7	4.7	7.1	5.6	7.2	5.3	7.2	5.4	6.3	4.7
4	6.9	5.1	7.0	5.5	7.5	5.1	7.4	4.6	7.1	4.9
5	7.0	4.0	7.1	4.8	5.7	4.7	7.2	5.0	7.3	6.3
6	7.5	5.7	5.8	4.1	5.7	4.7	7.4	5.4	6.8	5.2
7	6.9	4.4	7.3	5.2	7.5	4.8	5.9	4.4	6.5	5.4
8	7.1	4.9	6.4	5.5	5.4	4.0	6.6	4.6	6.8	5.2
9	6.9	4.4	6.1	4.7	6.6	5.1	6.0	4.9	5.3	4.7
10	7.1	4.7	6.7	5.0	7.2	4.7	6.8	5.1	6.5	4.3

Cuadro 8: Establecimiento *in vitro* de la primera siembra (8 de febrero de 2021) y tiempo correspondiente de germinación de las semillas.

Frasco	17 de febrero	19 de febrero	22 de febrero	26 de febrero	3 de marzo	5 de marzo	10 de marzo	17 de marzo
1		1	1	2				
2	1							
3		1		1	2		1	
4		1						
5						1		
6		2						1
7		2						
8		1						
9				1				
10		1						

Cuadro 9: Establecimiento *in vitro* de la segunda siembra (22 de febrero de 2021) y el tiempo de germinación de las semillas.

Frasco	26 de febrero	3 de marzo	5 de marzo	10 de marzo	22 de marzo
1	Contaminado				
2		1	1		
3					1
4	1	Contaminado			
5	1				
6	Contaminado				
7	Contaminado				
8		1		1	contaminado
9		1	2		
10	Contaminado				

Cuadro 10: Establecimiento *in vitro* de la tercera siembra (19 de marzo de 2021) y el tiempo de germinación de las semillas.

Frasco	29 de marzo	5 de abril	9 de abril	19 de abril
1			1	
2				
3		1		
4				
5	1			
6	3	1		1
7				
8	1			
9		1		
10	Contaminado			

Cuadro 11: Establecimiento *in vitro* de la primera siembra (8 de febrero de 2021) medidas de las plántulas obtenidas de la primera repetición.

Medidas de la primera siembra del 8 de febrero del 2021				
Frasco	5 de marzo	10 de marzo	12 de marzo	22 de marzo
1	2.3 cm, .6 cm, 1.5 cm	2.5 cm, .5 cm, 1.5 cm.	3 cm, .7 cm, 2 cm.	Le salió el segundo tallo.
2	1.5 cm	1.0 cm	1.3 cm	1.5 cm.
3	4cm	4 cm, 1.0 cm.	4.3cm, 1.3 cm	4 cm.
6	2.5 cm, 1 cm	2.5 cm, 2.0 cm	2.9 cm, 2.3 cm	2.5 cm, 1 cm
7	2.7 cm.	3 cm.	3 cm.	3 cm.
8	1 cm.	2 cm.	2.5 cm.	1 cm.
9	1 cm	2.1 cm.	2.3 cm.	1 cm.
10	1.5 cm	1.5 cm.	2 cm.	1.5 cm

Cuadro 12: Establecimiento *in vitro* de la segunda siembra (22 de febrero de 2021) medidas de las plántulas obtenidas de la segunda repetición.

Medidas de la segunda siembra del 22 de febrero del 2021					
Frasco	10 de marzo	12 de marzo	22 de marzo	29 de marzo	5 de abril
1	Contaminado				
2			2.3 cm, 1.6 cm.	2.6 cm, 2.3 cm.	2.7 cm.
3					
4	1.7 cm.	2 cm.			
5					
6					
7					
8					
9	1.5 cm.	2 cm.	2.3 cm.		2.5 cm.
10					

Cuadro 13: Establecimiento *in vitro* de la tercera siembra (19 de marzo de 2022) medidas de las plántulas obtenidas de la tercera repetición.

Medidas de la tercera siembra del 19 de marzo del 2021					
Frasco	29 de marzo	5 de abril	9 de abril	19 de abril	22 de abril
1	contaminado			1.5 cm	3.5 cm.
2					
3			1.5 cm.	2.4 cm.	3 cm.
4					
5	1.2 cm.	1.7 cm.	2.5 cm.	3.2 cm.	4 cm.
6	1.6 cm.	2.2 cm.	4.2 cm, 1.4 cm.	5.3 cm, 3 cm, 1.5 cm.	6 cm, 5 cm, 3.2 cm.
7					
8		1 cm.	1.7 cm.	2 cm.	3.2 cm.
9			1 cm.	1.3 cm.	1.7 cm.
10					