



RESPUESTA MORFOGENÉTICA DE DOS ESPECIES DE AGAVE REGENERADAS *IN VITRO* †

[MORPHOGENETIC RESPONSE OF TWO AGAVE SPECIES REGENERATED *IN VITRO*]

A.M. Arzate-Fernández*, I. Martínez-Velasco, C. Alvarez-Aragón,
S.Y. Martínez-Martínez and T.H. Norman-Mondragón

Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Fitomejoramiento. Facultad de Ciencias Agrícolas. Universidad Autónoma del Estado de México. Carretera Toluca-Ixtlahuaca Km. 11.5. Campus Universitario “El Cerrillo”, C.P. 50200, Toluca, Estado de México, México. Email: amaury1963@yahoo.com.mx

*Corresponding author

SUMMARY

Background: Agaves in Mexico are plants with great economic, gastronomic and cultural value. Despite the multiple forms of reproduction of plants belonging to the genus *Agave*, several of these species are threatened due to their slow growth, low percentage of seed viability, destruction of its habitat, excessive looting, interruption of its ripening cycle due to the use of their different organs, however, it has been possible to establish biotechnological techniques for its propagation, conservation and genetic improvement. **Objective:** At the present work were selected a representative species of *Agave*, one of them for pulque production (*A. salmiana*) (As) and the other one in the production of mezcal (*Agave marmorata*) (Am) with the aim to establish an efficient micropropagation protocol optimizing the concentrations of the cytokinin benzylaminopurine (BA) and the auxin 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), on the *in vitro* morphogenesis of both species. **Methodology:** Two *in vitro* culture systems were conducted in three explants (zygotic embryonic axis (E1), *in vitro* meristematic zone (E2) and *ex vitro* meristematic zone (E3)). **Results:** Shoots regeneration was achieved in all tested experiments; the highest number of shoots in As was 23.8 for explant using the E2 of directly regenerated *in vitro* germinated plants using a concentration of 10 mg L⁻¹ of BA, while in Am 24.7 shoots/explant were obtained with 5 mg L⁻¹ of BA using the zygotic embryonic axis who throughing a callus phase. **Implications:** The results obtained help to understand the importance of developing specific micropropagation protocols for each species, as well as contributing in the masive multiplications of *A. salmiana* and *A. marmorata* by understanding the effect of cytokinin BA and auxin 2,4-D and their combination in the formation of shoots by direct and indirect organogenesis. This provides a conservation alternative and an opportunity to start genetic improvement programs. **Conclusion:** The results of this research suggest that the choice of explant, multiplication system, species and plant growth regulators are the key to obtain a greater number of shoots with high *ex vitro* survival rates. **Keywords:** *In vitro* culture; *Agave salmiana*; *Agave marmorata*; direct and indirect organogenesis; 2,4-dichlorophenoxyacetic acid; benzylaminopurine.

RESUMEN

Antecedentes: Los agaves en México son plantas con gran valor económico, gastronómico y cultural. A pesar de las múltiples formas de reproducción de las plantas pertenecientes al género *Agave*, varias de estas especies están amenazadas debido a su lento crecimiento, bajo porcentaje de viabilidad de semilla, destrucción de su hábitat, saqueo desmedido e interrupción de su ciclo de maduración por el aprovechamiento de sus productos, sin embargo, se han logrado establecer técnicas biotecnológicas para su propagación, conservación y mejoramiento genético. **Objetivo:** En el presente trabajo se seleccionó una especie representativa para la producción de pulque (*Agave salmiana*) (As) y otra en la producción de mezcal (*Agave marmorata*) (Am) con el objetivo de establecer un protocolo de micropropagación optimizando las concentraciones de la citocinina bencilaminopurina (BA) y de la auxina 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), sobre la morfogénesis *in vitro* de ambas especies. **Metodología:** Se probaron dos sistemas de cultivo *in vitro* en tres diferentes explantes (eje embrionario cigótico maduro (E1), zona meristemática de plántulas *in vitro* (E2) y zona meristemática de plántulas *ex vitro* (E3)). **Resultados:** Se logró la regeneración de brotes en los sistemas probados; el

† Submitted February 4, 2020 – Accepted April 2, 2020. This work is licensed under a CC-BY 4.0 International License.
ISSN: 1870-0462.

mayor número de brotes en As fue de 23.8 por explante utilizando el E2 obtenidos de forma directa usando una concentración de 10 mg L⁻¹ de BA, mientras que en Am se obtuvieron 24.7 brotes/explante con 5 mg L⁻¹ de BA utilizando el eje embrionario cigótico maduro, el cual atravesó por una fase de callo. **Implicaciones:** Los resultados obtenidos ayudan a entender la importancia de desarrollar protocolos de micropropagación específicos para cada especie, así como contribuir en la multiplicación masiva de *A. salmiana* y *A. marmorata* al entender el efecto de la citocinina BA y la auxina 2,4-D y su combinación en la formación de brotes vía organogénesis directa e indirecta. Esto aporta una alternativa de conservación y una oportunidad de iniciar programas de mejoramiento genético. **Conclusión:** Los resultados de esta investigación sugieren que la elección del explante, sistema de multiplicación, especie y reguladores de crecimiento vegetal son la clave para obtener un mayor número de brotes con altas tasas de supervivencia *ex vitro*.

Palabras clave: Cultivo *in vitro*; *Agave salmiana*; *Agave marmorata*; organogénesis directa e indirecta; 2,4-diclorofenoxiacético; bencilaminopurina.

INTRODUCCIÓN

El género *Agave* incluye alrededor de 200 especies y el 75% de éstas tiene como centro de origen a México (Álvarez de Zayas, 1989; Mendoza, 2007; Reinchenbacher, 1985).

Las plantas de *Agave* tienen dos tipos de propagación: sexual y asexual (Alfonso-León, 2014). La maduración de la planta para que ocurra la reproducción sexual, dependiendo de la especie, puede variar entre 10-25 años (Monja-Mio *et al.*, 2018; Narváez-Suárez *et al.*, 2016). Existen dos vías de reproducción asexual: por bulbillos, los cuales se desarrollan a partir de la zona meristemática apical que crece en la inflorescencia (Binh *et al.*, 1990) cuyo origen es de herencia materna y la propagación por hijuelos, siendo ésta última la más empleada para establecer plantaciones comerciales de agave, ya que sólo tarda 5 años para que la planta comience a producir hijuelos, contrario a la formación de bulbillos donde se debe esperar a que la planta llegue a su madurez completa (Puente-Garza *et al.*, 2015). Sin embargo, la desventaja de la reproducción asexual y la generación de clones por la propagación de rizomas resulta en una baja variabilidad genética en las poblaciones de agave, haciendo el mejoramiento genético de estas plantas un problema muy difícil de resolver (Flores-Benítez *et al.*, 2007).

Entre los usos más comunes del género se encuentra la producción de destilados y fermentos, algunas de las especies más representativas en la elaboración de bebidas emblemáticas de maguey son: la especie *A. marmorata* empleada para la fabricación de mezcal (Nieto *et al.*, 2018), y para la extracción de pulque se utiliza mayormente *A. salmiana* (Aguilar-Juárez *et al.* 2014). Debido a la alta demanda en el mercado de la industria mezcalera, así como el auge creciente e interés por el pulque, ambas especies se encuentran bajo amenaza, aunado a ello la urbanización, alteración de su hábitat y baja tasa de reproducción por los ciclos largos de maduración, hacen a estas dos especies de interés para su desarrollo y conservación.

Por lo antes mencionado, mediante el proceso de morfogénesis que implica la formación de órganos a partir de células somáticas (George, 1993), el uso del cultivo *in vitro* ofrece una serie de ventajas, como obtener poblaciones con características élite, libres de patógenos y antecedentes genéticos estables (Domínguez-Rosales *et al.*, 2008). Cuando a partir de la siembra se observa la proliferación de células en forma desordenada y sin ninguna función predeterminada, se inicia la producción de callos a lo que se denomina organogénesis indirecta (Picca *et al.*, 2004, Valenzuela-Sánchez, 2006), por el contrario, cuando la formación de brotes se realiza directamente del explante sin la previa formación de callo se trata de organogénesis directa (Guerrero, 2010). Esta técnica también puede proporcionar material para la mejora del cultivo, utilizando herramientas de mejoramiento genético (Flores-Benítez *et al.*, 2007).

El objetivo de esta investigación fue crear protocolos para la propagación masiva de las especies *A. salmiana* y *A. marmorata* mediante la organogénesis directa e indirecta en tres tipos de explantes, evaluando cuatro combinaciones de 2,4-D y BA para la inducción de callo y cinco concentraciones de BA para la regeneración de plántulas.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se desarrolló en el laboratorio de Biología Molecular Vegetal, ubicado en el Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Fitomejoramiento de la Facultad de Ciencias Agrícolas, de la Universidad Autónoma del Estado de México, Campus Universitario "El Cerrillo", Toluca, Estado de México.

Material Vegetal

Los explantes usados para esta investigación fueron obtenidos a partir de semillas. La colecta de cápsulas silvestres se realizó para *A. salmiana* en el municipio de Toluca, Edo. México (19°24'32.12" LN y 99°41'26.80" LO) y la colecta de semilla de *A.*

marmorata se realizó en Zimatlán, Oaxaca (16°52'8.18" LN y 96°46'34.00" LO).

Se emplearon tres tipos de explantes: ejes embrionarios cigóticos maduros (E1) de 240 semillas, la zona meristemática de 480 plántulas germinadas *in vitro* de 45 días (E2) y la zona meristemática de 480 plántulas de 6 meses cultivadas bajo condiciones de invernadero (E3), de las dos especies de *Agave*. El establecimiento de cada fase experimental se desarrolló como se muestra en la Figura 1. Cabe señalar que cada explante utilizado constituyó una unidad experimental.

Desinfección y obtención de explantes

a) Explante 1: Ejes embrionarios cigóticos maduros (E1). Para la obtención de los E1 (Figura 2a) las semillas fueron lavadas a chorro de agua con jabón líquido (Axió[®]) más TWEEN 20[®] y agua corriente, posteriormente dentro de una campana de flujo laminar (CFL) en condiciones asépticas se realizó un enjuague con etanol al 70% durante un minuto (min), a continuación se colocaron en una solución de hipoclorito de sodio al 1% (Cloralex[®]) por 15 min en constante agitación y se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril, finalmente reposaron durante 24 horas (h) en gentamicina (Sulfato de gentamicina, concentración 160 mg/2ml) a una proporción de 16 μ l L⁻¹, finalmente dentro de la CFL se extrajeron los E1 y se colocaron por 10 min en agua destilada estéril con nanopartículas de Plata (50 mg L⁻¹ AgNP's) desarrolladas en el Centro Conjunto de Investigación en Química Sustentable UAEMéx-UNAM, inmediata a esta inmersión se colocaron 10 ejes embrionarios cigóticos maduros por caja Petri.

b) Explante 2: Zona meristemática de plántulas *in vitro* (E2). La obtención de las plántulas consistió en la germinación de semillas *in vitro* siguiendo la misma metodología de desinfección de semillas para la obtención de E1, después de la desinfección las semillas fueron germinadas en moldes de polipropileno con un volumen de 500 ml en donde se colocó 120 ml de medio de cultivo formulado en base a las sales inorgánicas MS (Murashige y Skoog, 1962) al 25 %, 30 g L⁻¹ de sacarosa, 0.5 g L⁻¹ de carbón activado, sin reguladores de crecimiento vegetal (RCV), gelificado con 5 g L⁻¹ de Agar (Sigma[®]), donde permanecieron 45 días. Se removieron hojas y raíces a las plántulas obtenidas 45 ddc (días después de iniciado el cultivo) en el medio sin RCV, ocupando solamente la parte basal de las plántulas (PB).

c) Explante 3: Zona meristemática de plántulas *ex vitro* (E3). Se colectaron plántulas de 6 meses de edad germinadas *ex vitro* de ambas especies (Figura 2d, e), las cuales fueron sumergidas en una solución compuesta por 1g L⁻¹ del bactericida Agry-gent[®] Plus 800 (Sulfato de gentamicina más clorhidrato de oxitetraciclina) más 1g L⁻¹ del fungicida sistémico Cercobin[®]M (Tiofanato metílico) por 10 min, posteriormente las pencas y todas las raíces fueron desprendidas de las plántulas (primer corte), obteniendo así la PBs, las cuales fueron lavadas a chorro de agua con jabón líquido (Axió[®]) más TWEEN 20[®] y agua corriente, posteriormente dentro de una CFL se realizó la misma metodología de desinfección que en semillas, modificando el tiempo de inmersión en gentamicina el cual fue de 25 min. En seguida, a las PBs se les realizó un segundo corte, consistiendo en la remoción restante de hojas hasta llegar a la zona meristemática (ZM) (Figura 2f), la cual fue sumergida durante 30 min en agua destilada estéril con nanopartículas de Plata (50 mg L⁻¹ AgNP's).

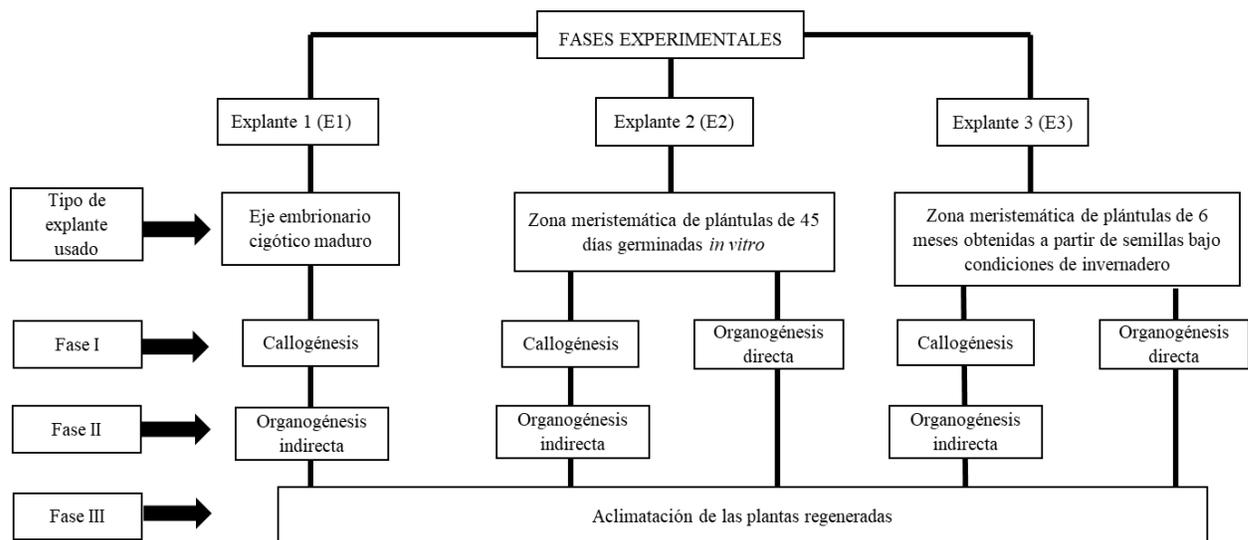


Figura 1. Fases experimentales realizadas en ambas especies de *Agave* para evaluar su respuesta morfogénica.

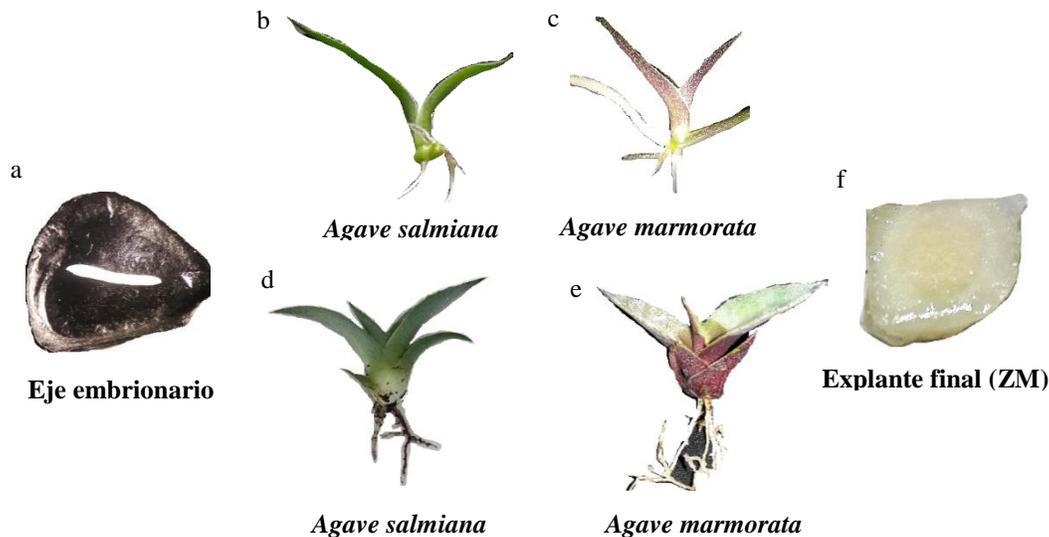


Figura 2. Tipo de explantes utilizados en la regeneración *in vitro* de dos especies de *Agave*. a) Eje embrionario cigótico maduro sobre la cubierta seminal de agave, utilizado en el E1. b y c) Plántulas germinadas *in vitro*, 45 días después de iniciado el cultivo (ddic), utilizadas en el E2. d y e) Plántulas germinadas *ex vitro*, de 6 meses, utilizadas en el E3. f) Corte transversal de tallo mostrando la zona meristemática (ZM) utilizada en el E2 y E3.

Medios de cultivo empleados en cada fase experimental

Callogénesis

Se evaluaron cuatro tratamientos para inducir callogénesis en los tres explantes (E1, E2 y E3), los tratamientos fueron formulados con sales MS (Tabla 1), los cuales fueron dispuestos en cajas Petri, colocando en cada caja 10 explantes, realizando 30 repeticiones por tratamiento y por tipo de explante (30x4x3), para un total de 360 unidades experimentales de cada especie, todos ellos fueron incubados en completa oscuridad a una temperatura de 25 ± 2 °C. Se realizaron observaciones a los 30, 60 y 90 ddic para evaluar la respuesta de los explantes en cada tratamiento en relación a la presencia, peso y apariencia de callo. A los 90 ddic aquellos explantes en donde se observó la formación de callo, fueron transferidos a un medio fresco para la inducción de brotes. En el caso particular del tratamiento uno (0.1 mg L^{-1} de BA y 0.1 mg L^{-1} de 2,4-D) no se le agregó agua de coco como lo reporta Binh *et al.* (1990) en su protocolo. La visualización de cambios morfológicos

(formación de callo y tipo de callo) en los explantes se realizó con la ayuda de un microscopio estereoscópico.

Organogénesis

Para la inducción de brotes vía organogénesis indirecta (OI) y directa (OD) se evaluó el efecto de cinco concentraciones de BA (Tabla 2) en los tres explantes. Se utilizaron frascos tipo gerber. Para la OI se colocaron tres callos en cada frasco y para la OD cinco explantes de la ZM de plántulas *in vitro* (E2) y *ex vitro* (E3) por frasco, realizando 30 repeticiones por tratamiento, manteniendo todos los cultivos en condiciones de luz (16/8 h), incubados a una temperatura de 25 ± 2 °C. Cada callo y explante de la ZM se consideró como una unidad experimental.

En cada explante el número de brotes se contabilizó a los 60 ddic realizándose un subcultivo a los 30 ddic. Los brotes obtenidos se separaron del explante original y se transfirieron al medio sin RCV para su crecimiento y enraizamiento. El medio de cultivo utilizado en esta etapa fue el mismo que se usó para la germinación de semillas *in vitro*.

Tabla 1. Tratamientos evaluados para inducir callogénesis en dos especies de *Agave*, en los tres explantes probados (E1, E2 y E3).

T	Reguladores de Crecimiento Vegetal (RCV)			Sacarosa (g L ⁻¹)	Vitaminas	Referencias
	Medio MS (%)	2,4-D (mg L ⁻¹)	BA (mg L ⁻¹)			
TC1*	100	0.1	0.1	20	MS	(Binh <i>et al.</i> , 1990)
TC2	100	1.0	15.0	30	MS	NA
TC3	25	3.0	1.0	60	L2	(Arzate-Fernández y Mejía-Franco, 2011)
TC4	25	5.0	3.0	60	L2	NA

T= tratamiento; TC= tratamiento de inducción de callo; NA= no aplica

*modificado: no se agregó agua de coco

Tabla 2. Concentraciones de citocinina evaluadas en la organogénesis en ambas especies de *Agave*.

Tratamiento	BA (mg L ⁻¹)	Sacarosa (g L ⁻¹)	MS (%)
TO1	0.0		
TO2	3.0		
TO3	4.0	30	100
TO4	5.0		
TO5	10.0		

TO = Tratamiento para inducción de brotes.

Aclimatación de plántulas regeneradas a condiciones *ex vitro*

Se seleccionaron las 50 plántulas regeneradas con mayor vigor de cada tratamiento, obteniendo un total de 250 por especie. Cada plántula fue colocada en un plug de espuma fenólica (peatFOAM®), y posteriormente en charolas de 180 cavidades. Las charolas fueron sumergidas en dos soluciones, la primera con 25% de fertilizante soluble Hydro-Solution (GrowCare®) y la segunda con el fertilizante soluble antes mencionado más 1 g L⁻¹ del enraizador Phyto Raizon® Plus (0.06% de ácido indol-3-butírico). Todas las plántulas estuvieron protegidas por una cubierta plástica (microtúnel), en donde las condiciones medidas por un termómetro digital con sensor de humedad (Stereon®) fueron: 50% de humedad y entre 20-35 °C de temperatura. Posteriormente, 30 días después de iniciada la aclimatación (ddía) el 50% de las plántulas seleccionadas fueron transferidas a macetas con una mezcla de peat moss más espuma fenólica (peatFOAM®) (1:1) y el otro 50% se colocó en vasos de plástico con tezontle en un sistema semi-hidropónico (SH).

El porcentaje de supervivencia, crecimiento y enraizamiento en invernadero de las plántulas regeneradas *in vitro* se determinó a los 30 ddía en el microtúnel y 60 ddía en las macetas y el SH, cada plántula se consideró como una unidad experimental.

Las variables evaluadas fueron las siguientes:

Porcentaje de formación de callo: ([Número de callos observados]* [100]/ 30 repeticiones).

Número de brotes por explante E1, E2, E3: El número de brotes se contabilizó a los 60 ddic en cada unidad experimental, después de ser sembrado en el medio sin RCV.

Longitud de brotes: se midió de la base al ápice con un vernier digital marca Stereon®.

Porcentaje de plántulas aclimatadas: ([Número de plántulas sobrevivientes] *[100]/Número total de plántulas aclimatadas a condiciones *ex vitro*).

Análisis estadístico

Los datos obtenidos sobre el porcentaje de obtención de callo a los 90 ddic, número y longitud de brotes regenerados de los tres explantes evaluados se sometieron a un análisis de varianza con ayuda del software Stathgraphics versión 5.0, y en donde se observaron diferencias significativas entre los tratamientos evaluados se realizó una prueba de comparación de medias con la diferencia mínima significativa (LSD), con un nivel de significancia del 95%. Cabe señalar que en cada fase experimental se realizaron experimentos independientes.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Callogénesis

La desdiferenciación de los ejes embrionarios cigóticos maduros (E1) se observó 5 días después de iniciado el cultivo (ddic) en el caso de Am, y a los 15 ddic en As. En ambas especies el proceso morfogénico inició con el aumento de tamaño de la zona radical en forma de bellota, resultado similar al reportado por Arzate-Fernández y Mejía-Franco (2011) con 3.0 mg L⁻¹ de 2,4-D y 1.0 mg L⁻¹ de BA en *A. angustifolia*. Sin embargo, la formación de masas callosas comenzó a presentarse entre los 15-25 ddic en As y entre los 10-15 ddic en Am en los tres explantes, resultado similar al obtenido por Binh *et al.* (1990) en *A. cantala* Roxb. y *A. fourcroydes* Lem, y Romero (2005) en *A. sisalana* Perrine y *A. atrovirens*, quien utilizó la PB de la planta como explante. En nuestro ensayo el porcentaje de formación de callo fue heterogéneo en los explantes E2 y E3 en ambas especies, mientras que el E1 mostró un comportamiento uniforme, es decir cada explante respondió de manera diferente a los cuatro tratamientos para la inducción de callo (Tabla 3), el mayor peso de callo a los 90 ddic en ambas especies se logró en el explante E3 con 0.7008 y 1.0870 g en As y Am, respectivamente. Los pesos de ambas especies quedan en la media de lo reportado en *A. angustifolia* (Arzate-Fernández y Mejía-Franco, 2011). La inducción de callogénesis se observó en los tres explantes evaluados, independientemente de la concentración de sales del medio MS (25% ó 100%), del nivel de sacarosa (20, 30 ó 60) o adición de Vitaminas (L2 o MS), sin embargo la respuesta de callogénesis fue diferente por tipo de explante. El tipo de callo encontrado en los mejores tratamientos (Tabla 3), en el caso de As, fue friable de coloración blanco perlado cuando se utilizó como explante el E1 y E2, resultados similares a los encontrados en *A. sisalana* (Das, 1992) donde se obtuvieron callos friables. Por el contrario, al utilizar el explante E3 se observaron callos compactos o compactos amarillentos, resultado similar al reportado por Romero (2005) en *A. atrovirens*. Esto se debe posiblemente a que diferentes tipos de explantes producen callos morfológicamente diferentes (Hazra *et al.*, 2002), además, se ha observado mayor variabilidad de callos en medios suplementados con BA, encontrándose callos friables, compactos y con cubierta mucilaginosa (Puentes-Garza *et al.*, 2015), mismos que se observaron en esta investigación. Cabe mencionar que a partir de los 45 ddic algunos explantes de ambas especies mostraron una oxidación parcial del tejido calloso.

Se logró la inducción de callogénesis a concentraciones iguales de RCV; 0.1 mg L⁻¹ de 2,4-D y 0.1 mg L⁻¹ de BA (TC1), utilizando el explante E2 y E3 en ambas especies, resultado similar a lo

encontrado por Yépez y De García, 2002 en *Agave cocui* Trelease; no así al usar el eje embrionario cigótico maduro. Además, con este resultado se comprueba que no es necesaria la adición de agua de coco para la generación de callo como lo menciona Binh *et al.* (1990) en *A. cantala* Roxb., *A. fourcroydes* Lem. y *A. sisalana* Perrine, esto puede deberse a la presencia de citoquininas en el agua de coco (Tantasawat *et al.*, 2010).

El porcentaje de callogénesis varió entre cada explante evaluado, siendo más homogéneo en el E1 donde se obtuvo el 100% en la mayoría de los tratamientos a excepción del TC1, mientras que en el E2 y E3 este valor fue sumamente dependiente del explante, especie y tratamiento. Los mejores porcentajes de inducción de callo coinciden con los mejores resultados obtenidos en el peso de callo. En esta investigación al usar la ZM de ambas especies independientemente de su edad, se observó una influencia por las concentraciones de ambos RCV para la inducción de callo.

En el TC3 (3.0 mg L⁻¹ de 2,4-D y 1.0 mg L⁻¹ de BA) probado para la inducción de callo embriogénico en *A. angustifolia* (Arzate-Fernández y Mejía-Franco, 2011) se obtuvieron callos de color blanco-cremoso, de consistencia suave y friable, contrastando con los resultados obtenidos en la presente investigación donde la mayoría de los callos obtenidos fueron compactos amarillentos.

En el caso de Am se observó que a mayor concentración de 2,4-D aumenta el peso de callo en todos los explantes probados, contrario a la citocinina BA ya que el TC2 con 15 mg L⁻¹ de este RCV no mostró un efecto significativo en el peso de callo de esta especie. Se sabe que a la adición de 2,4-D al tejido inactivo le sigue un aumento espectacular de ARN, bajo condiciones de inducción de callo, sólo las células que se dividen sintetizan y acumulan ARN (Lindsey y Yeoman, 1983), por lo tanto es posible que las altas concentraciones de esta auxina conduzcan a la división celular y consecuentemente a la formación de callos (Groenewald, 1977), lo anterior concuerda con lo observado en este trabajo donde se obtuvieron mejores resultados a concentraciones altas de 2,4-D lográndose la formación de callo similar con lo reportado por Ramírez-Malagón *et al.* (2008) y Valenzuela Sánchez (2006). Sin embargo, la especie As muestra un comportamiento totalmente opuesto, ya que a menor concentración de 2,4-D y adicionando una alta concentración de BA (15 mg L⁻¹) se obtuvo un mayor peso de callo, además, bajas concentraciones con ambos RCV como el TC1 (0.1 mg L⁻¹ de 2,4-D y 0.1 mg L⁻¹ de BA) favorecieron la inducción de callogénesis en esta especie donde se observaron callos mucilagosos (E2, TC1).

Esta investigación contrasta con los experimentos realizados por Das (1992) y Hazra *et al.* (2002), donde la luz fue un factor indispensable para la formación de callo, puesto que en condiciones de oscuridad se obtuvo la inducción de callogénesis, independiente del tratamiento, lo que permite hacer más eficaces los procesos al reducir el consumo de energía eléctrica. Además, la adición de 2,4-D mejora el estímulo morfogénico de los explantes cultivados en oscuridad, debido a que la degradación de esta auxina es más lenta en estas condiciones (Arzate-Fernández *et al.*, 1997). El comportamiento de los explantes de ambas especies en todos los explantes probados para la inducción de callo se muestran en la Tabla 3; los callos obtenidos en los mejores tratamientos de ambas especies en cada explante se pueden observar en la Figura 3. Cabe mencionar que después de transferidos los callos al medio de brotación estos siguieron creciendo en volumen.

Organogénesis

Inducción de brotes vía organogénesis indirecta. La regeneración de brotes comenzó a los 15 ddc en As y a los 10 ddc en Am en el explante E1 y E3, en el caso

del E2, donde se utilizó la ZM de plántulas *in vitro*, los tiempos de inducción fueron más lentos, 20 ddc en ambas especies.

En As la mayor tasa de brotes se obtuvo con una concentración de 10 mg L⁻¹ de BA (TO5) en los tres explantes. El mayor número de brotes obtenidos en As fue 20.6 brotes/explante obtenidos en el E1 (Figura 4a) utilizando como explante el eje embrionario cigótico maduro. Esto se puede apreciar en la Tabla 4 donde la acción de la citocinina BA es determinante para la obtención del número de brotes en esta especie, ya que, aumentando la concentración de BA de 5 mg L⁻¹ a 10 mg L⁻¹ se duplica o triplica el número de brotes en la mayoría de los tratamientos, puntualizando que la regeneración de brotes solo se presentó con la adición de BA concordando con los resultados de De la Peña *et al.* (2012) y Robert *et al.* (1987). Se observó una correlación entre los callos obtenidos en los mejores tratamientos y su posterior organogénesis; cabe mencionar que la oxidación que presentaron algunos callos en ambas especies no repercutió de manera negativa en la inducción de brotación, dado que los callos con estas características también indujeron brotes vigorosos.

Tabla 3. Análisis de las variables evaluadas para la inducción de callogénesis en los explantes E1, E2 y E3 de *A. salmiana* y *A. marmorata* en los diferentes tratamientos probados bajo condiciones de oscuridad.

NE	Especie	T	TC 30 ddc	TC 60 ddc	TC 90 ddc	Callogénesis (%)	Peso de callo (g)
E1	<i>A. salmiana</i>	1	-	-	-	-	-
		2	C	F	F	100	0.2464 ^a
		3	C	C	C	100	0.0841 ^b
		4	C	C	C	100	0.0714 ^c
	<i>A. marmorata</i>	1	-	-	-	-	-
		2	C	A	A	100	0.2386 ^b
		3	A	A	A	100	0.3121 ^b
		4	F	F	F	100	0.8168 ^a
E2	<i>A. salmiana</i>	1	M	M	M	100	0.2841 ^{ab}
		2	F	F	FO	70	0.3267 ^a
		3	F	F	F	20	0.0874 ^b
		4	C	CO	CO	20	0.0808 ^b
	<i>A. marmorata</i>	1	F	O	O	33.3	0.0572 ^c
		2	C	C	CO	46.6	0.0776 ^c
		3	A	A	A	100	0.5544 ^b
		4	F	F	F	100	0.7173 ^a
E3	<i>A. salmiana</i>	1	C	C	C	60	0.3006 ^b
		2	C	C	C	93.33	0.7008 ^a
		3	A	A	A	60	0.4006 ^b
		4	C	O	N	-	-
	<i>A. marmorata</i>	1	C	O	N	-	-
		2	C	C	C	16.6	0.2472 ^{bc}
		3	C	C	C	60	0.4405 ^b
		4	F	F	F	80	1.0870 ^a

NE= número de explante; T= tratamiento; TC= tipo de callo; F= callo friable; C= callo compacto; A= callo amarillento; M= callo mucilaginoso; O= callo friable con ligera oxidación; CO= callo oxidado; N= callo necrosado. Letras iguales no hay estadísticamente diferencias significativas entre los tratamientos.

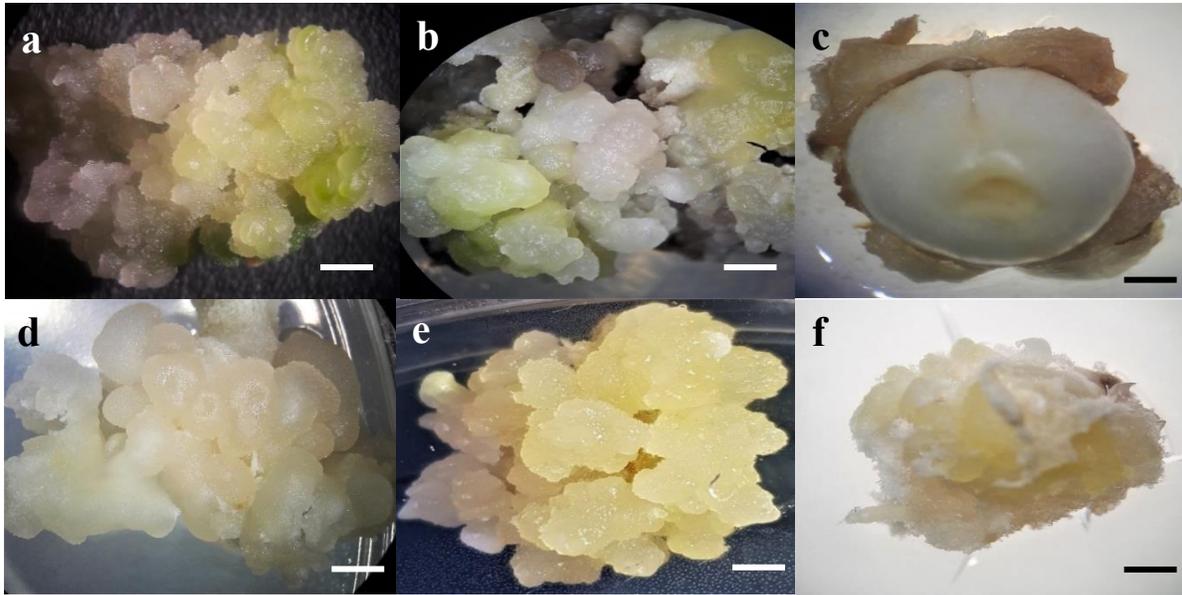


Figura 3. Callos obtenidos de *A. salmiana* con 1 mg L^{-1} de 2,4-D y 15 mg L^{-1} de BA en el E1 (a), E2 (b) y E3 (c); callos obtenidos de *A. marmorata* con 5 mg L^{-1} de 2,4-D y 3 mg L^{-1} de BA en el E1 (d), E2 (e) y E3 (f). Barra= 1mm.

El mayor número de brotes obtenidos en Am fue en el TO5 (10 mg L^{-1} de BA) el cual fue de 26.7 (Tabla 4) utilizando explantes E1, en donde los brotes regenerados presentaron hiperhídricidad y las plantas resultaron inviables, pero al reducir la cantidad de BA a 5 mg L^{-1} (TO4) se obtuvo un resultado muy similar en número de brotes al no presentar diferencias significativas y mejorando el crecimiento y desarrollo de estos al no hacerse visibles problemas de vitrificación (Figura 4d). Los resultados corroboran lo planteado por Caraballo *et al.* (2010) en *Agave fourcroydes* donde obtuvo brotes con vitrificación empleando una combinación de 0.025 2,4-D + 10.00 BA (mg L^{-1}). Se ha reportado que altas concentraciones de citocininas durante la etapa de multiplicación produce brotes hiperhídricos con baja capacidad de crecimiento y desarrollo anormal en algunas especies de *Agave*, ya que, al presentar desorganización celular, ausencia de tejido vascular y tejido de empalizada, conteniendo sólo mesófilo esponjoso las plantas con estas características no sobreviven a la transferencia en suelo (Castro-Concha, 1990). A pesar de lo antes mencionado, el mejor explante para la regeneración de brotes vía organogénesis indirecta fue el E1 en ambas especies de *Agave*. Valenzuela-Sánchez *et al.* (2006) utilizando esta vía de regeneración reportaron promedios de hasta 19.5 brotes/explante en *A. tequilana*, por su parte Silos-Espino *et al.* (2007) alcanzaron 20.3 brotes en *A. salmiana* lo que comprueba la eficiencia de nuestro protocolo de propagación.

Contrastante con As en Am el aumento de BA no favoreció la generación de más brotes, por el contrario, mermó el número de éstos (ver E2 y E3) concordando con Caraballo *et al.* (2010) donde reduciendo la concentración de BA incrementó la regeneración de brotes, su crecimiento y disminuyó la hiperhídricidad en *A. fourcroydes*.

En el presente trabajo la presencia de BA en ambas especies tiene un comportamiento ambiguo, mientras que en As el incremento de esta citocinina favorece la proliferación de brotes, en Am una concentración de 10.0 mg L^{-1} de BA (TO5) disminuyó el número de brotes regenerados con problemas de vitrificación.

Por otra parte, se puede afirmar que existe una relación entre el peso, tipo de callo y su posterior respuesta a la inducción de brotes, puesto que, se observó el mayor número de brotes de los mejores tratamientos obtenidos en la inducción de callo en los tres explantes para ambas especies. En donde se utilizó la ZM (E2 y E3) los explantes formaron un brote inicial a partir del cual aparecieron numerosos brotes a lo largo del tiempo de cultivo. Esta forma de crecimiento e inducción de brotes es similar al descrito por Binh *et al.* (1990), Powers y Backhaus (1989).

En todos los explantes la longitud de los brotes a los 45 ddic para As fue similar, con un promedio de 1.3-2.9 cm. En el mejor tratamiento (10 mg L^{-1} de BA) la mayor longitud se obtuvo usando como explante la ZM *ex vitro* (E3) con 2.0 cm en promedio. En Am la

longitud de brotes fue muy similar en los tres explantes siendo de 1.4-2.9 cm.

La relación auxina/citocinina durante el cultivo *in vitro* puede jugar una función crítica para inducir la respuesta morfogénica de las especies de *Agave* (Ramírez-Malagón *et al.*, 2008).

Inducción de brotes vía organogénesis directa. En el presente trabajo los resultados obtenidos de organogénesis directa son similares a los reportados por otros autores en especies de *Agave* (Das, 1992; Enríquez-Valle *et al.*, 2005; Santacruz-Ruvalcaba *et al.*, 1999; Silos-Espino *et al.*, 2007) al obtener regeneración de brotes sin la formación de callo a partir de la ZM de plantas.

De acuerdo a nuestro trabajo el mejor tratamiento para la inducción de brotes vía organogénesis directa en *As* fue el T5 (10 mg L⁻¹) no existiendo diferencias significativas entre la adición de 5 y 10 mg L⁻¹ de BA en el E3 en esta especie. El mismo comportamiento se muestra en *Am* en donde, el mejor tratamiento para esta especie fue el adicionado con 5 mg L⁻¹ de BA, el aumento de esta citocinina a 10 mg L⁻¹ no favoreció la inducción de brotes, por el contrario, el número de brotes disminuyó.

Como se observa en la Tabla 5, los mejores resultados en cuanto al número de brotes en ambas especies se obtuvieron al utilizar como explante la ZM de plántulas *in vitro* (E2). Puente-Garza *et al.* (2015) consiguieron 14.0 brotes/explante en *A. salmiana* con

una combinación de 10 mg L⁻¹ de BA y 0.04 mg L⁻¹ de 2,4-D. Lo anterior corrobora la eficiencia de la concentración de BA empleada en este trabajo para la inducción de brotes en esta especie. Sin embargo, en esta investigación se alcanzó un número superior de brotes (23.8 brotes/explante) sin la adición de 2,4-D, haciendo más eficiente el protocolo de brotación (Figura 5a). El número de brotes regenerados en *As* fue proporcional a la concentración de BA en el medio, por el contrario, en *Am* una concentración de 10 mg L⁻¹ de BA redujo la inducción de brotación (Tabla 5), además de observarse la formación de estructuras callosas de consistencia compacta y aspecto amarillento en el 30% de los explantes, a partir de estos callos se formaron brotes vigorosos y con buenas características, resultado similar al obtenido por Aguilar-Jiménez y Rodríguez-De la O, (2018) con la misma concentración de BA en *A. marmorata*. El T4 (5 mg L⁻¹ de BA) fue el mejor para estimular la proliferación de brotes en *Am* obteniendo 22.3 brotes/explante (Figura 5c) en el E2.

Mientras para algunas especies las concentraciones bajas de BA son suficientes para generar brotes como es el caso de *A. parrasana* Berge donde Santacruz-Ruvalcaba *et al.* (1999) obtuvieron 22 brotes/explante con 3.0 mg L⁻¹ de BA, en nuestro protocolo con la misma concentración de BA se lograron 7.8 y 4.1 brotes/explante en *As* y *Am*, respectivamente, ambas especies evaluadas mostraron un mejor comportamiento en los tratamientos que contenían mayor cantidad de BA. Por otro lado, Martínez-Palacios *et al.* (2003) reportaron 2.2 brotes/explante



Figura 4. Regeneración de brotes obtenidos vía OI de *A. salmiana* en un medio con 10 mg L⁻¹ de BA en el E1 (a), E2 (b) y E3 (c); brotes regenerados de *A. marmorata* en un medio con 5 mg L⁻¹ de BA en el E1 (d), E2 (e) y E3 (f). Barra = 1cm.

Tabla 4. Comparación de medias respecto del número y longitud de brotes obtenidos en el explante E1, E2 y E3 en ambas especies de *Agave* vía organogénesis indirecta (OI) a los 60 ddc en los tratamientos de inducción de brotes.

T	Explante 1 (E1)				Explante 2 (E2)				Explante 3 (E3)			
	As		Am		As		Am		As		Am	
	NB	LB (cm)	NB	LB (cm)	NB	LB (cm)	NB	LB (cm)	NB	LB (cm)	NB	LB (cm)
TC1TO1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0 ^l	0.0	0.0 ^m	0.0	0.0 ^k	0.0	0.0 ^k	0.0
TC1TO2	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0 ^{ji}	2.7	0.0 ^m	0.0	0.5 ^{kj}	2.3	0.6 ^{kj}	2.7
TC1TO3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.7 ^{kj}	2.7	1.2 ^{lk}	2.8	1.4 ^{ihg}	2.3	1.5 ^{jih}	2.4
TC1TO4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.4 ^{lk}	2.7	2.1 ^j	2.3	2.3 ^f	2.3	2.1 ^{ihg}	2.4
TC1TO5	0.0	0.0	0.0	0.0	1.5 ^{ih}	2.3	2.7 ⁱ	2.0	1.7 ^{hgf}	2.3	3.0 ^{hg}	2.3
TC2TO1	0.0 ^g	0.0	0.0 ^j	0.0	0.0 ^l	0.0	0.0 ^m	0.0	0.0 ^k	0.0	0.0 ^k	0.0
TC2TO2	4.5 ^{cde}	1.8	3.5 ^{hi}	1.4	3.6 ^{ed}	1.8	0.7 ^l	2.8	0.9 ^{ji}	2.3	0.7 ^{kj}	2.7
TC2TO3	4.6 ^{cde}	1.8	7.5 ^{fg}	1.7	4.7 ^c	1.7	1.6 ^{kj}	2.3	2.3 ^{fe}	2.3	1.3 ^{ji}	2.7
TC2TO4	6.6 ^c	1.4	5.5 ^{gh}	2.0	5.4 ^b	1.7	3.1 ^g	2.0	6.1 ^c	2.2	1.9 ^{ih}	2.4
TC2TO5	20.6 ^a	1.2	12.0 ^e	2.7	18.4 ^a	1.3	3.7 ^f	1.7	13.8 ^a	2.0	4.7 ^e	2.0
TC3TO1	0.0 ^g	0.0	0.0 ^j	0.0	0.0 ^l	0.0	0.0 ^m	0.0	0.0 ^k	0.0	0.0 ^k	0.0
TC3TO2	1.5 ^{fg}	2.6	5.0 ^{gh}	2.9	1.1 ^{ji}	2.8	1.7 ^{kj}	2.3	0.9 ^{ji}	2.3	1.7 ^{ih}	2.4
TC3TO3	0.5 ^{fg}	2.8	13.2 ^{de}	2.5	1.7 ^h	2.3	2.9 ^h	2.0	1.8 ^{gf}	2.3	3.7 ^g	2.1
TC3TO4	0.2 ^g	2.8	17.8 ^c	2.6	2.3 ^g	2.3	4.7 ^e	1.7	3.5 ^d	1.8	5.4 ^d	2.0
TC3TO5	16.2 ^b	1.4	17.8 ^b	2.6	3.5 ^e	1.8	5.7 ^d	1.7	6.6 ^{cb}	2.1	8.9 ^c	2.1
TC4TO1	0.0 ^g	0.0	0.0 ^j	0.0	0.0 ^l	0.0	0.0 ^m	0.0	0.0 ^k	0.0	0.0 ^k	0.0
TC4TO2	2.3 ^{efg}	2.6	10.0 ^{ef}	1.6	1.0 ^{ji}	2.8	2.0 ^j	2.3	0.9 ^{ji}	2.3	2.4 ^{ih}	2.4
TC4TO3	2.7 ^{def}	2.4	16.0 ^{cd}	2.9	1.7 ^h	2.3	6.9 ^c	1.8	1.4 ^{hi}	2.3	4.1 ^f	2.1
TC4TO4	4.8 ^{cd}	1.8	24.7 ^a	2.0	2.9 ^f	2.0	11.3 ^a	1.9	3.0 ^{ed}	2.2	12.5 ^a	1.7
TC4TO5	14.3 ^b	1.4	26.7 ^a	2.2	4.1 ^d	1.8	9.9 ^b	1.6	6.9 ^b	2.1	10.1 ^b	2.4

LB= longitud de brote; NB= número de brotes; T= tratamiento; TC= tratamiento utilizado para inducir callo; TO= tratamiento utilizado para inducir brotes. Letras iguales no hay estadísticamente diferencias significativas entre los tratamientos.

en *A. victoria-reginae* cultivado con 1mg L⁻¹ de BA; por su parte Silos-Espino *et al.* (2007) obtuvieron 20.3 brotes por explante con 2.0 mg L⁻¹ de BA y 0.25 mg L⁻¹ de AIA en la misma especie. Estos resultados confirman la respuesta heterogénea que ocurre entre las especies de *Agave* frente a la adición de diversos RCV (Domínguez-Rosales *et al.*, 2008).

Algunos de nuestros resultados difieren con los de otros autores que lograron la inducción de brotes mediante una combinación de auxinas y citocininas (Groenewald, 1976; Powers y Backhaus, 1989; Robert *et al.*, 1987), ya que en este trabajo el uso de BA fue suficiente para generar brotes sin pasar por una etapa de callo. Sin embargo, se requirieron altas concentraciones de BA para obtener una mejor respuesta, lo cual concuerda con Das (1992).

Organogénesis indirecta vs organogénesis directa.

Los brotes regenerados fueron heterogéneos en tamaño en ambas especies y en todos los explantes, el mayor

número de brotes observados en As se indujo por organogénesis directa utilizando como explante la ZM de plántulas *in vitro* (E2) obteniendo 23.8 brotes/explante (Tabla 5), esto contrasta con lo mencionado por Malda y Luz (2004) en *Agave salmiana* y *A. mapisaga*, quienes consiguieron mejorar la tasa de multiplicación utilizando semillas no así la ZM, resultado similar al encontrado en Am donde el mayor número de brotes se observó al utilizar el E1 y la técnica de organogénesis indirecta, alcanzando 26.7 brotes/explante (Tabla 4).

Esta investigación concuerda con diferentes autores al mencionar que el *Agave* requiere altas concentraciones de citocininas para inducir brotación, ya que para ambas especies la concentración alta de BA fue la que favoreció la regeneración de brotes (Robert *et al.* 1987).

Tabla 5. Comparación de medias respecto del número y longitud de brotes obtenidos en los explantes E2 y E3, vía organogénesis directa (OD) en *A. salmiana* (As) y *A. marmorata* (Am) a los 60 ddic en los tratamientos de inducción de brotación.

T	Explante 2				Explante 3			
	As		Am		As		Am	
	NB	LB (cm)	NB	LB (cm)	NB	LB (cm)	NB	LB (cm)
TO1	0.0 ^e	0.0	0.0 ^e	0.0	0.0 ^d	0.0	0.0 ^e	0.0
TO2	7.8 ^c	1.7	4.1 ^d	1.8	1.1 ^c	1.7	4.5 ^d	1.8
TO3	6.7 ^d	1.5	8.3 ^c	1.3	6.3 ^b	1.7	8.2 ^c	3.0
TO4	8.3 ^b	1.6	22.3 ^a	1.7	8.3 ^a	1.6	14.7 ^a	3.7
TO5	23.8 ^a	1.6	17.0 ^b	2.1	8.4 ^a	2.2	14.2 ^{ab}	2.2

NB= número de brotes; LB= longitud de brotes; T= tratamiento; TO= tratamiento utilizado para inducir brotes.

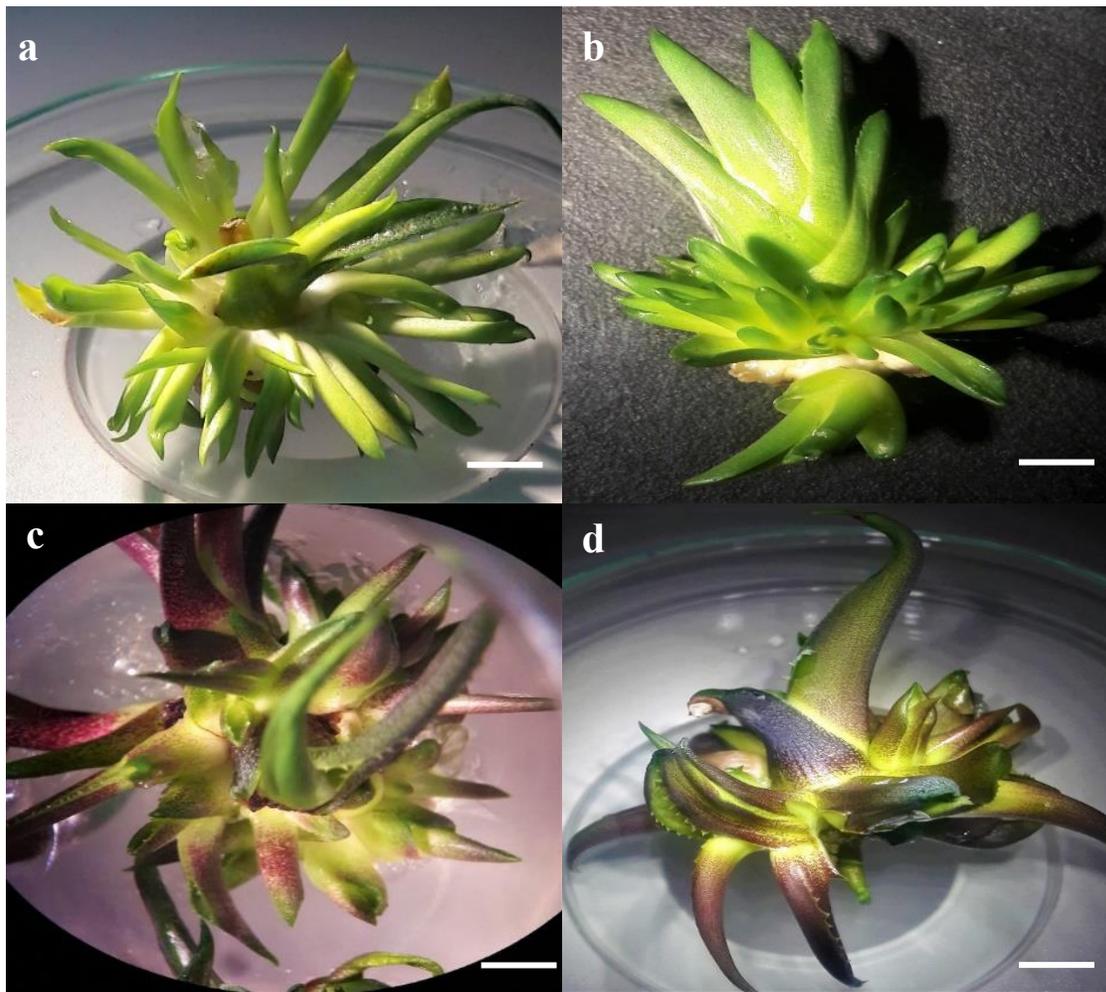


Figura 5. Regeneración de brotes vía OD de *A. salmiana* con 10 mg L⁻¹ de BA (TO5) en el E2 (a) y E3 (b); brotes regenerados de *A. marmorata* en un medio con 5 mg L⁻¹ de BA (TO4) en el E2 (c) y E3 (d). Barra = 1mm.

Cabe mencionar que, a pesar del importante resultado obtenido mediante la técnica de organogénesis indirecta, se debe considerar el tiempo para la obtención de estos explantes, ya que pasaron 195 días

para lograr brotes (90 días para la formación de callo más 60 días en los medios de inducción de brotes y 45 días más para el crecimiento de los brotes). En el caso del E2 fueron necesarios 240 días en total, sumando los

45 días para la obtención de las plántulas *in vitro*. En contraste, los brotes regenerados por organogénesis directa se obtuvieron en tan solo 105 días en el caso del E3 y 150 días en el E2, lo que escalado a nivel comercial brinda la oportunidad de obtener brotes en un tiempo corto, con lo cual se podrían reducir los costos de producción.

La baja tasa de brotación encontrada al usar como explante la ZM de plántulas *ex vitro* de seis meses (E3) comparada con los otros explantes utilizados (E1 y E2) puede deberse a que los tejidos juveniles presentan una mayor aptitud para la morfogénesis que los tejidos que provienen de órganos adultos o senescentes (Domínguez-Rosales *et al.*, 2008; Picca *et al.*, 2004). Por lo antes mencionado se concuerda con lo reportado por Hazra *et al.* (2002) al citar que la generación de brotes depende del origen del explante.

Nuestros resultados confirman que cada especie de *Agave* responde de manera diferente a los RCV suministrados *in vitro*, por lo cual resulta indispensable el desarrollo de protocolos de propagación particulares para cada una de ellas (Domínguez-Rosales *et al.*, 2008; Ramírez-Malagón *et al.*, 2008).

En la Tabla 6 se muestra un resumen de las concentraciones con las que se logró una mejor respuesta morfogenética en los tres explantes. Como se puede apreciar las mejores concentraciones fueron las mismas para el E1, E2 y E3, sin embargo los resultados arrojados en cada uno de ellos fueron totalmente diferentes, esto puede deberse a las cantidades endógenas de RCV que contiene los diferentes explantes utilizados, afirmándose una vez más que el resultado dependerá del explante, especie, técnica de cultivo, cantidad y combinación de RCV añadidos al medio de cultivo.

Todos los brotes obtenidos con los tres explantes fueron separados y transferidos al medio de crecimiento sin ningún RCV. En estas condiciones, todos los cultivos permanecieron 45 días. La longitud de brotes fue similar en los tres explantes mediante las dos vías, en As se obtuvo la mayor longitud de brotes siendo de 3.40-4.74 cm en contraste con Am que

alcanzó de 2.00-3.05 cm en promedio. El crecimiento de raíces varió respecto al explante y la especie como se muestra en la Tabla 7.

Enraizamiento *in vitro*

Se observó 5% de enraizamiento de las plántulas regeneradas en el medio sin RCV en el E1 y E2. As fue la única especie que enraizó en el E1. Por otro lado el E2 fue el que mejor respondió esta etapa, con una eficiencia del 20% en As en ambas técnicas de organogénesis (OI y OD), mientras que, solo 5% de las plántulas regeneradas vía OI y el 10% vía OD en Am enraizaron. Silos-Espino *et al.* (2007) recomiendan la adición de la auxina ácido indolacético (AIA) para *A. salmiana*, en la misma especie Puente-Garza *et al.* (2015) obtuvieron un 100% de enraizamiento en un medio libre de RCV, enriquecido con vitaminas L2. En algunas especies sólo es necesario agregar al medio de cultivo auxinas o bien carbón activado con el fin de estimular la generación de raíces (Domínguez-Rosales *et al.*, 2008). Por el contrario, se ha reportado el enraizamiento de varias especies de *Agave* en un medio basal sin RCV como; *A. arizonica* (Powers y Backhaus, 1989), *A. parrasana* Berger (Santacruz-Ruvalcaba *et al.*, 1999), *A. victoria-reginae* (Martínez-Palacios *et al.*, 2003), *A. fourcroydes* y *A. sisalana* (Binh *et al.*, 1990), lo anterior puede deberse a la síntesis de auxinas que ocurre en las hojas (Raven *et al.*, 1999), por lo que no es necesario la adición de RCV. Sin embargo, se debe tener en cuenta lo planteado por Fujii *et al.* (1990) quienes mencionan que la habilidad de obtener plantas con raíces no es necesariamente un indicador de continuo crecimiento y vigor en condiciones *in vitro*. Caraballo *et al.* (2010) mencionan que altas concentraciones de citocinina en el medio de cultivo inhiben la formación de raíces, tomando en cuenta que los mejores tratamientos para la regeneración de brotes en todos los explantes y en ambas especies contenían niveles altos de citocinina, este pudo ser un factor determinante para el bajo porcentaje de enraizamiento en los tres explantes.

Tabla 6. Comparativo de los mejores tratamientos respecto a la respuesta morfogenética del explante E1, E2 y E3 en *A. salmiana* (As) y *A. marmorata* (Am).

E	Callogénesis				Organogénesis indirecta (OI)				Organogénesis directa (OD)			
	As		Am		As		Am		As		Am	
	2,4-D/BA (mg L ⁻¹)	C (%)	2,4-D/BA (mg L ⁻¹)	C (%)	BA (mg L ⁻¹)	NB	BA (mg L ⁻¹)	NB	BA (mg L ⁻¹)	NB	BA (mg L ⁻¹)	NB
E1	1.0/15.0	100	5.0/3.0	100	10.0	20.6	5.0	24.7	N/A		N/A	
E2	1.0/15.0	70	5.0/3.0	100	10.0	18.4	5.0	11.3	10.0	23.8	5.0	22.3
E3	1.0/15.0	93.3	5.0/3.0	80	10.0	13.8	5.0	12.5	5.0	8.4	5.0	14.7

E=explante; C= callogénesis; NB=número de brotes

Aclimatación de plántulas a condición *ex vitro*

El uso de la espuma fenólica como sustrato favoreció el crecimiento multidireccional de las raíces (Figura 6a), además, al distribuir homogéneamente la humedad en todo el volumen de los plugs permitió no tener un exceso de agua en los explantes, lo cual es un factor determinante en la aclimatación de plántulas *in vitro*, ya que éstas se muestran resistentes al déficit de agua más no a su exceso (Binh *et al.*, 1990).

Se ha reportado que el aporte de nutrimentos mediante fertilización en *Agave tequilana* Weber (Uvalle y Vélez, 2007) aumentó la capacidad fotosintética para la fijación de CO₂ y la acumulación de biomasa de las plantas regeneradas. En nuestros ensayos la solución con Phyto Raizon® Plus (Solución 2) mostró una respuesta superior en la formación de raíces (Figura 6b), crecimiento de brotes y porcentaje de supervivencia en ambas especies, lo cual sugiere que la concentración de auxinas exógenas fue complementaria a las auxinas endógenas de cada plántula para estimular una respuesta de formación de raíces y mejor adaptación. Se puede observar en la Tabla 7 que con la Solución 2, el crecimiento de las plántulas aclimatadas a los 30 días después de iniciada la aclimatación (ddia) se vio favorecido con más de 1.0 cm de crecimiento en todos los explantes. De igual manera el porcentaje de supervivencia con ambas soluciones fue eficiente, sin embargo con la solución 2 se observó una mejoría notable teniendo el 100% de supervivencia en plántulas provenientes de siete de los diez tratamientos. Se ha reportado la aclimatación exitosa de *A. marmorata* utilizando como sustrato una

base de peat most con agrolita (Aguilar-Jiménez y Rodríguez-De la O, 2018), pero no se ha reportado el uso de espuma fenólica en la aclimatación de especies de *Agave*. Los tres explantes estudiados tuvieron una respuesta similar en el proceso de aclimatación, cabe mencionar que el porcentaje más bajo de supervivencia se obtuvo al utilizar el E1 como explante inicial.

Abreu *et al.* (2007) mencionan que la propuesta de una etapa intermedia entre la aclimatación y el vivero permite preparar a las plántulas obtenidas *in vitro* para soportar los rigores de las condiciones de campo en un ambiente menos agresivo y lograr un desarrollo adecuado, que le permita en un tiempo mínimo alcanzar el patrón de calidad. De acuerdo a nuestros resultados, cuatro semanas de aclimatación fueron suficientes para que entre el 20-75% de las plántulas formaran raíces.

A los 30 días, el 50% de las plántulas se transfirieron a maceta y el otro porcentaje a un sistema semi-hidropónico (Figura 6), en ambos casos se observó que algunas plántulas comenzaron a perder la hoja más vieja en ambas especies (Figura 6e y f), esto sugiere que durante el proceso de aclimatación la pérdida de hojas se favorece, debido al lógico estrés producido cuando las plántulas son transferidas a condiciones *ex vitro*, resultado similar al encontrado en *A. fourcroydes* Lem (Abreu *et al.*, 2007). De acuerdo con Tadeo (2000) una de las respuestas específicas de las plantas a los cambios externos es deshacerse de las partes no esenciales y recuperar los nutrientes presentes en esas partes, de las que se deshace, para dirigirlos hacia otros órganos.

Tabla 7. Respuesta de las plántulas regeneradas por organogénesis indirecta y directa de *A. salmiana* y *A. marmorata*, 30 ddia en las dos soluciones propuestas en la etapa de aclimatación.

E	P	Es	Solución 1						Solución 2					
			LB (cm)		C (cm)	R (%)		S (%)	LB (cm)		C (cm)	R (%)		S (%)
			1 d	30 d		1 d	30 d	30 d	1 d	30 d		1 d	30 d	30 d
E1	OI	As	4.74	6.24	1.50	5	55	75	4.13	5.55	1.43	5	70	70
		Am	2.90	3.76	0.86	0	55	95	3.05	4.50	1.46	0	75	80
E2	OD	As	4.36	4.98	0.62	20	30	90	3.50	4.68	1.18	20	50	100
		Am	2.43	3.34	0.91	10	60	90	2.79	4.11	1.33	10	65	100
	OI	As	4.58	5.17	0.59	20	20	95	4.04	5.33	1.29	20	55	100
		Am	2.15	3.06	0.91	5	50	100	2.88	3.94	1.06	5	55	100
E3	OD	As	3.70	4.37	0.67	0	35	100	3.98	5.16	1.18	0	55	100
		Am	2.00	3.55	1.55	0	50	95	2.13	3.17	1.04	0	60	100
	OI	As	3.40	4.12	0.72	0	40	100	3.82	5.05	1.23	0	70	100
		Am	2.27	3.10	0.84	0	55	95	2.78	4.29	1.52	0	60	90

E (Explante); P (Proceso); Es (Especie); OI (Organogénesis indirecta); OD (Organogénesis directa); As (*Agave salmiana*); Am (*Agave marmorata*); LB (longitud de brotes); C (crecimiento); R (porcentaje de formación de raíz); S (porcentaje de supervivencia). Solución 1= 25% del fertilizante soluble Hydro-Solution; Solución 2= 25% de fertilizante soluble más enraizador Phyto Raizon® Plus (1 g L⁻¹).



Figura 6. Plántulas *ex vitro* de *A. salmiana* y *A. marmorata* después de 30 días de aclimatación; As en un plug de espuma fenólica mostrando raíces (a), plántula enraizada de Am (b). Plántula aclimatada a los 30 días en el sistema hidropónico de As (c) y Am (d). Plántula aclimatada a los 30 días en maceta de As (e) y Am (f), las flechas en ambas imágenes indican las hojas viejas. Barra = 1 cm

Se tienen antecedentes de la aclimatación exitosa (94-100%) de diversas especies de *Agave*: *A. tequilana* (Valenzuela-Sánchez *et al.*, 2006); *A. cocui* (Salazar, Gonzalez *et al.*, 2009); *A. fourcroydes* (Abreu *et al.*, 2007); *A. americana* (Yescas-Arreola *et al.*, 2016). Con los resultados expuestos en la Tabla 7 se puede decir que el proceso de aclimatación fue satisfactorio, ya que las plantas mostraron un reinicio de crecimiento en ambos casos (semi-hidropónico y maceta), sin embargo, existió una merma del 20 % de las plántulas obtenidas de Am transferidas al sistema semi-hidropónico.

CONCLUSIONES

Fue posible la regeneración de plántulas de *A. salmiana* y *A. marmorata* Roezl, a partir de la formación de brotes vía organogénesis directa e indirecta. El mejor tratamiento para la inducción de calogénesis utilizando el eje embrionario cigótico maduro (E1), zona meristemática de plántulas *in vitro*

(E2) y la zona meristemática de plántulas *ex vitro* (E3) fue el TC2 (1.0 mg L⁻¹ de 2,4-D y 15 mg L⁻¹ de BA) para *Agave salmiana* y el TC4 (5 mg L⁻¹ de 2,4-D y 3 mg L⁻¹ de BA) para *Agave marmorata* Roezl. El mayor peso de callo (1.0870 g) se obtuvo usando la zona meristemática de plántulas *ex vitro* de *Agave marmorata* (Am).

El mejor tratamiento para la regeneración de brotes fue el TC4TO4 (5.0 mg L⁻¹ BA) en *Agave marmorata*, y el TC2TO5 (10.0 mg L⁻¹ BA) en *Agave salmiana* en los explantes E1, E2 y E3, sin embargo, el mayor número de brotes en *Agave salmiana* se obtuvo empleando el explante E2 mediante organogénesis directa siendo de 23.8 brotes/explante, en *Agave marmorata* el mayor número se observó al utilizar el explante E1 pasando por una etapa de organogénesis indirecta obteniendo 24.7 brotes/explante. El mayor desarrollo y porcentaje de supervivencia de las plantas aclimatadas *ex vitro* se logró con la combinación de 25 % de fertilizante

soluble Hydro-Solution (GrowCare®) más Phyto Raizon® Plus.

Financiamiento. Esta investigación es parte del proyecto Clonación de plantas de *Agave angustifolia*, vía organogénesis y embriogénesis somática con clave número 4729/2019CIS, financiado por la Universidad Autónoma del Estado de México.

Conflicto de interés. Los autores declaran que no existe conflicto de intereses asociados con los resultados de esta publicación. Así mismo manifestamos la conformidad con el contenido del escrito y con los procedimientos editoriales de la revista Tropical and Subtropical Agroecosystems.

Cumplimiento de estándares de ética. Los autores declaran que esta investigación fue supervisada por el Comité Interno de Bioética de la Universidad Autónoma del Estado de México, bajo la autorización del proyecto 4729/2019CIS

Disponibilidad de datos. Los datos están disponibles con el Dr. Amaury-M. Arzate-Fernández (autor para correspondencia: amaury1963@yahoo.com.mx), previa solicitud.

REFERENCIAS

- Abreu, E., González, G., Ortiz, R., Rodríguez, P., Domech, R., y Garriga, M. 2007. Evaluación de vitroplantas de Henequen (*Agave fourcroydes* Lem) durante la fase de aclimatización. *Cultivos Tropicales*, 28(1): 5–11.
- Aguilar-Jiménez, D., y Rodríguez-De la O, J. L. 2018. Micropropagación y aclimatación de Maguey Pitzometl (*Agave marmorata* Roezl) en la Mixteca Poblana. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 20(2): 124–131. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v20n2.77084>
- Aguilar-Juárez, B., Enríquez Del Valle, R., Rodríguez-Ortiz, G., Granados Sánchez, D., y Cerero, B. M. 2014. El estado actual de *Agave salmiana* y *Agave mapisaga* del valle de México. *Revista Mexicana de Agroecosistemas*, 2(1): 2007–9559.
- Alfonso-León, C. 2014. El maguey y sus partes. *Arqueología Mexicana*, 57 edn, México, pp:56.
- Álvarez de Zayas, A. 1989. Distribución geográfica y posible origen de las Agaváceas. La Habana, Cuba. *Revista Del Jardín Botánico Nacional.*, 10(3): 25–36.
- Arzate-Fernández, A.M., Nakazaki, T., Okumoto, Y. 1997. Efficient callus induction and plant regeneration from filaments with anther in lily (*Lilium longiflorum* Thunb.). *Plant Cell Reports*, 16: 836–840. <https://doi.org/10.1007/s002990050330>
- Arzate-Fernández, A.-M., y Mejía-Franco, R. 2011. Capacidad embriogénica de callos inducidos en ejes embrionarios cigóticos de *Agave angustifolia* Haw. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 34(2): 101–106. URL: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-73802011000200008&lng=es&tlng=es
- Binh, L. T., Muoi, L. T., Oanh, H. T. K., Thang, T. D., y Phong, D. T. 1990. Rapid propagation of agave by *in vitro* tissue culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 23(1): 67–70. <https://doi.org/10.1007/BF00116091>
- Caraballo, M. G., Oramas, G. G., García, S. A., y Cruz, E. A. 2010. Manejo de la Interacción Auxina-Citoquinina para mejorar el protocolo de micropropagación de Henequén (*Agave fourcroydes* Lem.). *Chilean Journal of Agricultural Research*, 70(4): 545-551.
- Castro-Concha, L., Loyola-Vargas, V. M., Chan, J. L., y Robert, M. L. 1990. Glutamate dehydrogenase activity in normal and vitrified plants of *Agave tequilana* Weber propagated *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 22(2): 147–151. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00043690>
- Das, T. 1992. Micropropagation of *Agave sisalana*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 31(3), 253–255. DOI: 10.1007/BF00036233
- De la Peña, C., Nic-Can, G., Ojeda, G., Herrera-Herrera, J. L., López-Torres, A., Wrobel, K., y Robert-Díaz, M. L. 2012. KNOX1 is expressed and epigenetically regulated during *in vitro* conditions in *Agave* spp. *BMC Plant Biology*, 12(May 2014). DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2229-12-203>
- Domínguez-Rosales, M. S., Alpuche-Solís, Á. G., Vasco-Méndez, N. L., y Molphe-Balch, E. P. 2008. Efecto de citocininas en la propagación *in vitro* de Agaves Mexicanos. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 31(4): 317–322.
- Domínguez Rosales, M. S., González Jiménez, M. D. L. L., Gómez Rosales, C., Valles Quiñones, C., Delgadillo Días de León, S., Mireles Ordaz, S. J., y Pérez Molphe Balch, E. 2008. El cultivo *in vitro* como herramienta para el aprovechamiento, mejoramiento y conservación de especies del género *Agave*. *Investigación y Ciencia de La Universidad Autónoma de Aguascalientes*, 41: 53–62. URL: <https://www.redalyc.org/pdf/674/67404109.pdf>.
- 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 *Agave*

- angustifolia*, Revista Fitotecnia Mexicana, 28: 175–178.
- Flores-Benítez, S., Jiménez-Bremont, J. F., Rosales-Mendoza, S., Argüello-Astorga, G. R., Castillo-Collazo, R., & Alpuche-Solís, Á. G. 2007. Genetic transformation of *Agave salmiana* by *Agrobacterium tumefaciens* and particle bombardment. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 91(3): 215–224. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-007-9287-3>
- Fujii, J. A. A., Slade, D., Olsen, R., Ruzin, S. E., y Redenbaugh, K. 1990. Alfalfa somatic embryo maturation and conversion to plants. Plant Science, 72(1): 93–100. DOI: [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(90\)90190-Y](https://doi.org/10.1016/0168-9452(90)90190-Y)
- George, E. F. 1993. Plant propagation by tissue culture. 2nd ed., London, Exegetics Ltd. pp.89-91.
- Groenewald, E.G., Wessels, D.C.J., Koeleman, A. 1976. Callus formation and Plant Regeneration From Seed Tissue of *Aloe pretoriensis* Pole Evans. Zeitschrift Für Pflanzenphysiologie, 75(3): 270–272. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0044-328X\(75\)80089-4](https://doi.org/10.1016/S0044-328X(75)80089-4)
- Guerrero, B. A. L. M. A. 2010. Inducción de embriogénesis somática en cultivo *in vitro* de *Agave atrovirens* KARW. EX SALMDYCK, México, Instituto Politécnico Nacional.
- Hazra, S. K., Das, S., y Das, A. K. 2002. Sisal plant regeneration via organogenesis. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 70(3): 235–240. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1016517617039>
- Lindsey K., Yeoman M. M. 1983. The relationship between growth rate, differentiation and alkaloid accumulation in cell cultures. Journal of Experimental Botany, 145(34): 1055–1065.
- Malda, B. G., y Luz, R. M. M. D. 2004. Comparación del comportamiento de magueyes pulqueros (*Agave salmiana* Otto Ex. Salm y *Agave mapisaga* Trel) bajo esquemas de propagación *in vitro* y condiciones de invernadero. Biología Scripta, 1: 1–6.
- Martínez-Palacios, A., Ortega-Larrocea, M., Chávez, V. M., y Bye, R. 2003. Somatic embryogenesis and organogenesis of *Agave victoriae-reginae*: Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 74:135–142. URL: <https://doi.org/10.1023/A:1023933123131>.
- Mendoza, A. J. G. 2007. Los agaves de México. Ciencias 87, julio-septiembre, 14–23. URL: <https://www.redalyc.org/pdf/644/64408704.pdf>
- Monja-Mío, K. M., Quiroz-Moreno, A., Herrera-Herrera, G., Montero-Muñoz, J. L., Sánchez-Teyer, F., & Robert, M. L. 2018. Analysis of Two Clonal Lines (Embryogenic and Non-Embryogenic) of *Agave fourcroydes* Using AFLP and MSAP. American Journal of Plant Sciences, 09(04): 745–762. URL: <https://doi.org/10.4236/ajps.2018.94059>
- Murashige T., Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 15: 473–497. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Narváez Suárez, Alberto Ulises, Martínez Saldaña, Tomás, Jiménez Velázquez, M. 2016. El cultivo de maguey pulquero: opción para el desarrollo de comunidades rurales del altiplano mexicano. Revista de Geografía Agrícola, (56): 33–44. URL: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=75749287005>
- Nieto, R., Vargas, J., Rodríguez, A., y Jiménez, V. 2018. El cultivo de maguey pulquero (*Agave salmiana*) en el valle del mezquital. Polibotánica, 45: 205–222.
- Picca, B., Helguera, M., Salomón, N., y Carrera, A. 2004. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. In, G. Levitus, V. Echenique, C. Rubinstein, E. Hopp, y L. Mroginski, Eds. Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología. Buenos Aires, Argentina, INTA
- Powers, D. E., & Backhaus, R. a. 1989. *In vitro* propagation of *Agave arizonica* Gentry & Weber. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 16(1): 57–60. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00044072>
- Puente-Garza, C. A., Gutiérrez-Mora, A., & García-Lara, S. 2015. Micropropagation of *Agave salmiana*: Means to Production of Antioxidant and Bioactive Principles. Frontiers in Plant Science, 6. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01026>
- Ramírez-Malagón, R., Borodanenko, A., Pérez-Moreno, L., Salas-Araiza, M. D., Nuñez-Palenius, H. G., y Ochoa-Alejo, N. 2008. *In vitro* propagation of three *Agave* species used for liquor distillation and three for landscape. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 94(2): 201–207. <https://doi.org/10.1007/s11240-008-9405-x>
- Raven, P. H.; Evert, R. F. and Eichhorn, S. E. 1999. Biology of plants. 6th ed. New York, U.S.A: Freedman, W. H. and company worth Publishers.
- Reinchenbacher, F. 1985. Conservation of Southwestern Agaves. Desert Plant, 7(88): 103–106.
- Robert, M. L., Herrera, J. L., Contreras, F., & Scorer, K. N. 1987. *In vitro* propagation of *Agave fourcroydes* Lem. (Henequen). Plant Cell, Tissue and Organ

- Culture, 8(1): 37–48.
DOI:<https://doi.org/10.1007/BF00040731>
- Romero, H. T. 2005. Comportamiento de explantes de *Agave pulquero* (*Agave atrovirens*) en la interacción de dos reguladores de crecimiento. México, Instituto Politécnico Nacional.
- Salazar, E., Gonzalez, P., y Hernandez, C. 2009. Multiplicación *in vitro* de *Agave cocui* trelease a través de yemas axilares. *Agronomía Tropical*, 59(2): 129–135. URL: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0002192X2009000200002
- Santacruz-Ruvalcaba, F., Gutiérrez-Pulido, H., y Rodríguez-Garay, B. 1999. Efficient *in vitro* propagation of *Agave parrasana* Berger. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 56(3): 163–167. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1006232911778>
- Silos-Espino, H., González-Cortés, N., Carrillo-López, A., Guevara-Lara, F., Valverde-González, M. E., y Paredes-López, O. 2007. Chemical composition and *in vitro* propagation of *Agave salmiana* “Gentry.” *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 82(3): 355–359. DOI: <https://doi.org/10.1080/14620316.2007.11512242>
- Tadeo, F. 2000. Fisiología de las plantas y el estrés. In M.- Hill (Ed.), *Fundamento de Fisiología Vegetal*, México, Interamericana, pp. 481–497.
- Tantasawat, P., Chaowiset, W Sorntip, A Kativat, C Wannajindaporn, A. 2010. The effects of proline and coconut water on callus induction of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Acta Horticulturae*, 871: 589-598. DOI:https://www.researchgate.net/publication/284974760_The_effects_of_proline_and_coconut_water_on_callus_induction_of_cucumber_Cucumis_sativus_L
- Uvalle, B. J. X. y Vélez, G. C. 2007. Conocimiento y prácticas agronómicas para la producción de *Agave tequilana* Weber en la zona de denominación de origen del tequila. In F. Rulfo, V. F. O.; Pérez, D. J. F.; del Real Laborde, J. I.; Byerly, M. and Keir, ed., México, Centro de Investigación Regional del Pacífico Centro. Instituto Nacional de Investigaciones forestales, agrícolas y pecuarias, pp. 69–88.
- Valenzuela Sánchez, K. K. 2006. Plant Regeneration of *Agave tequilana* by indirect Organogenesis. *In vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 42: 336-340.
- Yépez, E., De Garcia, E., V. 2002. Notas preliminares sobre la Propagación *in vitro* de *Agave cocui* trelease. *Croizatia* 2(3): 187-194.
- Yescas-Arreola, E., V. Campos-Ángeles, G., Enríquez del Valle, J. R., Velasco-Velasco, V. A., Rodríguez-Ortíz, G., y Ruiz-Luna. 2016. Aclimatación de *Agave americana* var. *Oaxacensis* obtenidas *in vitro*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 7(4): 911–922.