

**EVALUACION DE UNA ALTERNATIVA DE PROPAGACIÓN DE MAGUEY PULQUERO
(*Agave salmiana*) VARIEDAD PÚA LARGA**

**[EVALUATION OF AN ALTERNATIVE PROPAGATION OF MAGUEY PULQUERO
(*Agave salmiana*) PÚA LARGA VARIETY]**

Areli Flores-Morales¹, Víctor Manuel Chávez-Avila², Manuel Jiménez-Estrada³

¹Tecnológico Nacional de México. Campus Instituto Tecnológico del Altiplano de Tlaxcala. Km. 7.5 Carretera Fed. San Martín Texmelucan-Tlax. 90122. Tlaxcala. ²Laboratorio CTV, Jardín Botánico, Instituto de Biología, UNAM. ³Instituto de Química, UNAM. Circuito exterior, Ciudad Universitaria, 04510. México. §Autor para correspondencia: (floresafm@hotmail.com).

RESUMEN

En la segunda mitad de siglo XX, *A. salmiana* empezó a desaparecer, los métodos convencionales de propagación (hijuelos) no aseguran la sobrevivencia de la especie y no satisfacen la demanda que requieren los productores. El objetivo fue establecer las condiciones de cultivo *in vitro* vía organogénesis directa e indirecta, de *A. salmiana* var. Púa Larga, utilizando plantas de 2 y 5 años y semillas, en medio de cultivo MS, adicionado con reguladores de crecimiento K y 2,4-D (0.1, 0.5, 1.0 y 2.0 g L⁻¹), de ANA, BAP: K (1:1, 1:2 y 2:1 g L⁻¹) y 2-iP (0.5, 1.0 y 1.5 mg L⁻¹). El 82% de semillas de agave germinaron en medio MS (50% de sales minerales). Explantes de tallo, cotiledones y hojas generaron plántulas en medio MS con 0.5:1, 1:3 mg L⁻¹ de K y 2,4-D. 1030 plántulas obtenidas *in vitro* sobrevivieron en condiciones de invernadero (sustrato: tepojal, arena y tierra negra (1:1:2; %), obteniendo 713 plantas en maceta. La inducción vía organogénesis directa en las condiciones establecidas con medio MS, adicionado con ANA, BAP, K y 2-iP, los cultivos iniciaron la diferenciación celular, en 2 meses se presentó oxidación en el tejido y presencia de microorganismos, lo que dio origen a la pérdida total de los cultivos. Los resultados contribuyen al conocimiento científico del maguey pulquero para un aprovechamiento sustentable.

Palabras clave: agaves, cultivo *in vitro*, organogénesis directa e indirecta.

ABSTRACT

In the second half of the twentieth century, *A. salmiana* began to disappear, conventional methods of propagation (hijuelos) do not ensure the survival of the species and do not meet the demand required by field workers. The objective was to establish the conditions of *in vitro* culture direct and indirect organogenesis of *A. salmiana* var. Púa Larga, using plants of 2 and 5 years and seeds, in MS culture medium, added with growth regulators K and 2,4-D (0.1, 0.5, 1.0 and 2.0 g L⁻¹), ANA, BAP: K (1:1, 1:2 and 2:1 g L⁻¹) and 2-iP (0.5, 1.0 and 1.5 mg L⁻¹). 82% of agave seeds germinated in MS medium (50% of mineral salts). Explants of stem, cotyledons and leaves generated seedlings in MS medium with 0.5:1, 1:3 mg L⁻¹ of K and 2,4-D. 1030 seedlings obtained *in vitro* survived in greenhouse conditions (substrate: tepojal, sand and black earth (1:1:2; %), obtaining 713 potted plants. Induction direct organogenesis under the conditions established with MS medium, added with ANA, BAP, K and 2-iP, the cultures initiated cell differentiation, in 2 months oxidation was presented in the tissue and presence of microorganisms, which gave rise to the total loss of the cultures. The results contribute to the scientific knowledge of the maguey pulquero for a sustainable use.

Index words: agaves, *in vitro* culture, direct and indirect organogenesis.

INTRODUCCIÓN

Los agaves en México, han sido el soporte de importantes actividades socio-económicas generadoras de riqueza para la industria tequilera, mezcalera y pulquera, de ellos, se han obtenido bebidas alcohólicas, fibras naturales, carbohidratos, metabolitos secundarios como saponinas y sapogeninas, precursores de la síntesis de corticoides, de interés para la industria química, de alimentos y farmacéutica (López-Romero *et al.*, 2018). El *Agave salmiana* solo es aprovechado para la obtención de aguamiel para la producción de pulque. Investigaciones muestran interés sobre la composición de la planta (Chávez Romero *et al.*, 2018), aguamiel (Romero-López *et al.*, 2015) y el conocimiento de la flora microbiana del pulque (Escalante *et al.*, 2008), sobre sus propiedades curativas, así como la identificación de carbohidratos (Castillo-Andrade *et al.*, 2019, Sánchez-Madrigal *et al.*, 2019). La presencia en aguamiel de fructooligosacáridos y fructanos, indican las aplicaciones potenciales que presenta para la industria de los alimentos como prebióticos (Peralta-García *et al.*, 2020, López-Romero *et al.*, 2018). Sin embargo, las poblaciones magueyeras de esta especie se ven amenazadas, el principal problema que enfrenta es la falta de impulso de desarrollo tecnológico y económico para la especie, así como; la sobreexplotación de poblaciones existentes, el saqueo ilegal de la cutícula, la destrucción de su hábitat, su crecimiento lento, la baja tasa de reproducción asexual y reproducción sexual limitada por problemas de polinización y viabilidad de las semillas (Narváez-Suárez *et al.*, 2016).

La propagación tradicional de agave pulquero es por semillas o mecuates. La primera ha caído en desuso y en la actualidad pocos productores la llevan a cabo debido a que el tiempo de obtención de plantas es mayor. La importancia de este método de propagación radica en la enorme cantidad de semillas que produce un solo quiote, por lo que se puede obtener un gran número de plantas en un tiempo dado, el problema principal, es que se necesitan alrededor de 12 años para que las plantas lleguen a ser productivas, además del cuidado que se debe practicar para evitar los problemas de destrucción. La segunda forma de propagar el maguey, es la más utilizada por los productores con el inconveniente del bajo número de hijuelos obtenidos, no se asegura la calidad productiva de las plantas, el tiempo de madurez y explotación es de ocho a 10 años (Narváez-Suárez *et al.*, 2016, Álvarez-Duarte *et al.*, 2018 y NOM-059-Ecol- 2001). Una alternativa prometedora para apoyar a solucionar estos problemas; es la aplicación de las técnicas de propagación y mejoramiento a través de las técnicas derivadas de la biotecnología vegetal. La importancia del presente trabajo con *A. salmiana*, es contribuir al conocimiento de la regeneración *in vitro*, a fin de fomentar el cultivo de la variedad púa larga, la cual presenta características de tener una cutícula más delgada, que otras variedades, pencas alargadas que terminan en punta y un ciclo de seis años para producción.

METODOLOGÍA

Las semillas (tres capsulas) y plantas de agave (variedad púa larga) inmaduros (dos y cinco años de edad fisiológica) fueron donadas por el Sr. Rodolfo del Razo, propietario del Rancho San Isidro, municipio de Nanacamilpa, Tlaxcala.

Desinfección y germinación de las semillas

Se realizó la prueba de viabilidad de semillas con Tetrazolio. Las semillas viables se colocaron en una solución detergente (5 min en agitación). Después se pasaron a una solución de etanol al 70% v/v., 30 seg. Posteriormente se pasaron en una solución de hipoclorito de sodio al 30% v/v, 30 min en agitación. Se colocaron en condiciones asépticas en una campana de flujo laminar, fueron enjuagadas con agua destilada estéril y posteriormente se depositaron en los frascos conteniendo medio de cultivo (MS) al 50% de sales minerales. Cinco semillas se sembraron por frasco con un total de 40 semillas. Las variables evaluadas en la germinación de las semillas fueron: 1. Porcentaje de germinación (número de semillas germinadas/total de semillas sembradas) x 100. 2. Periodo de germinación en medio MS al 50% de sales minerales por cinco

semanas. Las evaluaciones para los experimentos de multiplicación se efectuaron de forma continua durante un periodo entre 60 a 90 días de inducción. El proceso de desinfestación y rompimiento de latencia de yemas axilares para los magueyes de 2 y 5 años, se realizó con Benomil comercial, en una concentración de 4 g L^{-1} , se asperjó sobre las plantas diariamente en un periodo de tres semanas, a su vez se aplicó Benzil Amino Purina (BAP) 3 g L^{-1} cada tercer día, para estimular la división celular y romper la latencia de las yemas axilares haciéndolas brotar. La desinfección de los explantes; tallo, yemas axilares y partes de hojas inmaduras centrales se les realizó un lavado con jabón antibacterial (Dial®).

Los explantes se introdujeron en una solución de etanol al 96% v/v por 30 seg, se enjuagó y se adicionó Agrimicin 4 mg L^{-1} , 30 min en agitación continua. Posteriormente se introdujeron en solución de hipoclorito de sodio al 30% v/v (Cloralex blanqueador doméstico) por 30 min. Se realizaron tres enjuagues con los antioxidantes; ácido ascórbico (150 mg L^{-1}) y ácido cítrico 150 mg L^{-1} . Se introdujeron los explantes en solución de hipoclorito de sodio en una concentración de 10% v/v por 10 min y nuevamente se realizaron tres enjuagues con los antioxidantes. Se obtuvieron un total de 138 explantes (tallos y yemas) para el agave de 2 años de edad y 273 para el de 5 años. El cultivo *in vitro* de los explantes se realizó en medio Murashige y Skoog (1962), al 50% de compuestos inorgánicos y 100% de compuestos orgánicos, adicionado con sacarosa (30 g L^{-1}) (Figura 1).



Figura 1. Obtención de explantes a partir de plantas de agave inmaduro (2 y 5 años).

El pH se ajustó a 5.7 ± 0.2 , se agregó carbón activado y gelificante (Gel rite®) 3.5 g L^{-1} . Se emplearon los reguladores de crecimiento; ácido naftalén acético (ANA) con bencil aminopurina (BAP) y con cinetina (K), concentraciones de 1 y 2 mg L^{-1} en combinaciones de 1:1, 1:2 y 2:1. También se utilizó 6- γ , γ -dimetilalilamino purina (2-iP) en concentración de 0.5, 1.0 y 1.5 g L^{-1} . Se emplearon cinco frascos por cada tratamiento hormonal y por cada frasco se sembró tres y seis explantes de $1 \pm 0.3 \text{ cm}$ (unidades experimentales), un total de 411. El Porcentaje de respuesta: Número de explantes con respuesta/Número de explantes totales.

Cultivo de explantes (tallo, cotiledón y hoja) de plántulas generadas de semillas germinadas

Las plántulas obtenidas *in vitro* provenientes de las semillas germinadas, se disectaron en pequeñas secciones explantes de tallo, cotiledón y hoja, los cuales fueron sembrados en medio MS, suplementado con los reguladores de crecimiento (K y 2,4-D), en diferentes concentraciones y combinaciones (0.5 hasta 3.0 mg L^{-1}) (Cuadro 1). Se emplearon 5 frascos por tratamiento, con 5 explantes, un total de 400 explantes. Las condiciones de incubación fueron a $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, fotoperiodo 16 h, a una intensidad luminosa entre 1,500-2000 luxes proporcionada por lámparas fluorescentes. Los cultivos se mantuvieron durante dos meses en el medio de inducción, estos se monitorearon continuamente hasta la formación de callos y órganos. Las plántulas germinadas *in vitro* después de dos meses de incubación, se les realizó un corte transversal para remover

una parte del tallo unido a callo y la raíz. Nuevamente, cultivados e incubados por un periodo de 4 meses hasta la generación de plantas completas que posteriormente fueron aclimatizadas.

Cuadro 1. Combinación de los reguladores de crecimiento 2,4-D/K (mg L⁻¹).

2,4-D/K (mg L ⁻¹)	0.0	1.0	2.0	3.0
0.0	T0	T1	T2	T3
0.1	T4	T5	T6	T7
0.5	T8	T9	T10	T11
1.0	T12	T13	T14	T15

Aclimatación de plántulas

Se seleccionaron plántulas de tamaño entre 5 a 8 cm con raíz, estas fueron sacadas de los frascos y lavadas con agua destilada para retirar los restos de medio de cultivo. Las plantas obtenidas *in vitro* fueron adaptadas en condiciones de invernadero por 90 días, sembradas en charolas con tapa transparente de 30 x 30 cm, con sustrato de tepojal y tierra negra (1:1), posteriormente expuestas a condiciones ambientales, plantadas en macetas con sustrato (sustrato: tepojal, arena y tierra negra (1:1:2; %), en macetas con un tamaño de 15 cm.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los hijuelos de agaves se seleccionaron de plantas con características fenotípicas como altura de la base de las pencas centrales (2.8 a 3.5 m), color (verde intenso), longitud de las hojas (2.5 a 2.8 m), porte, edad (ocho años) y producción de aguamiel, en promedio 18±2 L día⁻¹.

Regeneración de agave de 2 y 5 años de edad, vía organogénesis directa

Los explantes de tallo y yemas axilares cultivados en medio de cultivo MS, adicionado de los reguladores de crecimiento (ANA y BAP, en concentraciones de 1 a 2 mg L⁻¹), los tratamientos con una combinación hormonal de 1:1 mg L⁻¹, el 90% de explantes formaron callo. En la combinación 1:2 mg L⁻¹, el 60% y en la de 2:1 mg L⁻¹, el 50%, en 30 días de cultivo. Para la combinación de ANA:K mg L⁻¹, el 88, 64 y 50 % respectivamente por tratamiento, sin la formación de brotes, en algunos casos el callo era de apariencia friable-cristalina y de forma globular (Figura 2).

Una respuesta similar se observó para explantes (tallos y yemas axilares) de maguey de 5 años edad. El % de respuesta de formación de callo en los tratamientos fue igual, solo en el sistema de cultivo donde se emplearon los reguladores de crecimiento ANA y K (1:2 mg L⁻¹), el 55% de explantes de tallo genero callo en un mes, y el 40% para explantes de yemas. En comparación del proceso de micropropagación de *A. letonae*, *A. fourcroydes*, *A. americana* y *A. tequilana* se emplearon hojas maduras y rizomas, cultivados en medio MS (50 y 100%), adicionado con 2,4-D y BA, obteniendo una buena cantidad de brotes y raíces (Robert *et al.*, 2006; Luna-Luna *et al.*, 2017). Aguilar y Rodríguez (2018), describen que la presencia de AIA es indispensable para la formación de nuevos brotes en el cultivo *in vitro* de tallo de *A. marmorata*. Indican que la concentración de reguladores de crecimiento influye en la respuesta morfogénica. Martínez-Palacios *et al.* (2003), mencionan que la concentración de reguladores de crecimiento determina el éxito en el cultivo *in vitro*. BA, 2,4-D, K, AIA, fueron empleados para la propagación *in vitro* de *A. victoriae-reginae*, empleando semillas, hojas y yemas axilares de plántulas *in vitro*.

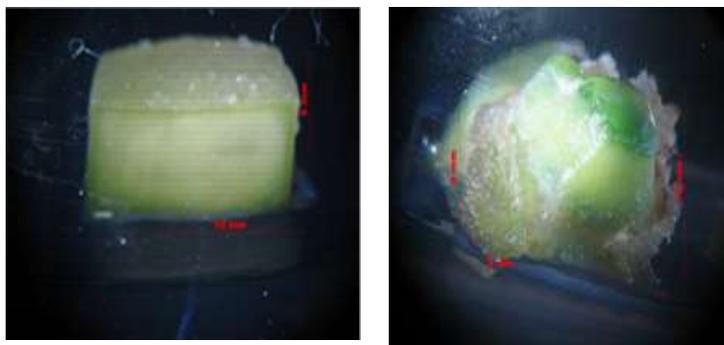


Figura 2. Desarrollo de callo a partir de los explantes (tallo) de maguey de 2 (a) y 5 (b) años de edad, en medio MS (50% de sales minerales) adicionado de la combinación de los reguladores de crecimiento ANA:BAP, 1:1 mg.L⁻¹.

Hazra *et al.* (2002) señalan que un factor determinante para la formación de callo para *A. sisalana* es la presencia de luz durante la inducción, ya que los explantes incubados en oscuridad afecta la aparición de callo, en el caso de *A. salmiana* var. Púa Larga, la formación de callo también estuvo relacionada con la presencia de luz e igual de la adición exógena de los reguladores de crecimiento.

En estas condiciones, el 65% del total de este material, presentó oxidación en la periferia del explante y callo formado en un tiempo de 2 meses. El subcultivo periódico en las mismas condiciones de cultivo con una menor intensidad luminosa disminuyó el efecto de oxidación, así como el uso del antioxidante (ácido ascórbico, 150 mg L⁻¹) y carbón activado (Azofeifa., 2009). Sin embargo, no fue lo suficiente para evitar la oxidación del tejido, además, los cultivos presentaron contaminación microbiana que afectó su desarrollo, por lo tanto, se realizaron subcultivos en el medio base agregando ampicilina 2 mg L⁻¹ (antibiótico). Este método ha tenido su mayor aplicación en la propagación de plantas ornamentales donde la ocurrencia de plantas fuera de tipo no es un problema (Sudha y Ravishankar, 2002). También, se recomienda una selección adecuada del material vegetal que evite la producción de compuestos fenólicos durante los estadios iniciales del cultivo *in vitro* para lograr el éxito del cultivo (Concepción *et al.*, 2005).

Por otra parte, Silos *et al.* (2011) lograron obtener plantas completas con 2 mg L⁻¹BA más 0.25 mg L⁻¹IAA a partir de brotes obtenidos de hojas de *A. salmiana* Gentry (var. Manso) de 2 y 3 años de edad. En el caso de la propagación *in vitro* vía organogénesis directa de maguey bruto (*A. inaequidens* Koch), especie amenazada de interés económico, en seis meses las secciones de tallo formaron 72 brotes, con los reguladores BA, K y 2ip en concentraciones de 3 y 10 mg L⁻¹ se logró obtener una mayor altura de la planta, mayor número de hojas y brotes nuevos además hubo presencia de estructuras globulares y raíces (Aureoles-Rodríguez *et al.*, 2008). Para la propagación vía organogénesis directa en *A. angustifolia*, en tres meses se obtuvieron 586 explantes a partir de tallo de 20 plantas, en el que 202 plantas estaban asépticas, viables, con pigmentación verde e inicios de respuesta de organogénesis (Aguilar *et al.*, 2018).

Para los explantes de tallo y yemas axilares inmaduras sembrados en medio MS (50% de sales) adicionado de la concentración 0.5, 1.0 y 1.5 mg L⁻¹ de 2iP, la mayor parte de los explantes se oxidaron, hubo desarrollo de fenoles, tiñendo de un color café-rojizo al medio de cultivo, una gran parte de explantes fueron subcultivados en medio MS adicionado de carbón activado y los reguladores de crecimiento ANA y BAP (1:1 mg L⁻¹), para evitar la pérdida del material vegetal. En un mes del subcultivo, se logró observar la regeneración de brotes a partir de yemas preformadas (apicales y axilares). Se formaron órganos (hojas) en explantes procedentes de la parte del ápice del tallo con las concentraciones hormonales de ANA:BAP (mg.L⁻¹) 1:1 y 1:2, esta formación de órganos se presentó después de las nueve semanas de iniciados los subcultivos (Figura 3).



Figura 3. Formación de brotes vía organogénesis directa (hoja), medio de cultivo MS, adicionado de los reguladores de crecimiento ANA:BAP, 1:1 mg L⁻¹.

Para *A. salmiana*, var. Púa Larga, todo el material vegetal obtenido *in vitro*, proveniente de los explantes tallo y yemas axilares presentó oxidación en un tiempo de dos meses. Después de ese periodo de tiempo, el crecimiento de callo fue lento (1 mes), por lo tanto, todos los explantes que mostraron callo fueron cultivados en medio MS (50% de sales), adicionado de carbón activado, antibiótico y la combinación de los reguladores de crecimiento ANA y BAP (1:1 y 1:2, mg L⁻¹).

Al cabo de ocho semanas de realizar el subcultivo, el callo oxidado se deterioró en su totalidad. La contaminación posiblemente se debió a que el tratamiento tanto de desinfección como desinfección de las plantas provenientes de campo, no fue lo suficiente para eliminar microorganismos, pero igual incide en daño a las plantas y por consecuencia a los explantes. En el caso de la oxidación de los tejidos, a pesar de que el callo fue expuesto a diferentes tratamientos para disminuir el proceso, no se logró rescatar. Azofeifa (2009), mencionan que en algunas especies de plantas entre ellas las leñosas, el establecimiento de cultivo *in vitro* se ve limitado por la ocurrencia de oscurecimiento que se vuelve letal para los explantes, durante su inicio o mantenimiento el cual está relacionado al estrés oxidativo que sufren las células del explante que se cultiva, así como para el medio de cultivo. Esto a pesar del uso de estrategias para recuperar. Las condiciones de cultivo *in vitro*, la combinación y concentración de reguladores de crecimiento, los explantes empleados, no influye de forma directa en el éxito de la micropropagación vía organogénesis directa o indirecta, sino también de la variedad, especie o familia vegetal. Por lo tanto, se hace necesario integrar los diferentes factores que intervienen en la regeneración vía organogénesis directa de *A. salmiana* var. Púa Larga para estudios posteriores.

Micropropagación de *A. salmiana* var. Púa Larga a partir de plántulas obtenidas de semillas germinadas

Los agaves en fructificación son escasos, encontrarlos reveló evidentemente la realidad de que los agaves maduros que inician su floración son utilizados para la producción de aguamiel y pulque, lo que implica el corte de la inflorescencia y la cancelación de la posibilidad de obtener semillas. Las semillas utilizadas presentaban en promedio 4.0±0.5 mm de largo y 3.0±0.5 mm de ancho, con un peso de 0.108±0.03 g. El cultivo *in vitro* a partir de semillas de *A. salmiana*, var Púa Larga, se logró en un corto tiempo la formación de plántulas a partir de tallos, hojas y cotiledones. La germinación *in vitro* de las semillas viables de *A. salmiana* (40 semillas) se observó a los cinco días en medio basal MS sólido al 50% de sales minerales. Esta ocurrió de manera asincrónica, en la primera semana germinó solo una y a la tercera semana germinaron cuatro, a la cuarta semana cinco semillas, hasta la semana cinco germinaron las semillas restantes (23), siete semillas no germinaron a pesar de que se mantuvieron en la cámara y en condiciones *in vitro* hasta la semana 13. El porcentaje de germinación obtenido fue de 82.5% (33 semillas germinadas), lo que indica que la

mayor parte de las semillas sembradas generaron respuesta (Figura 4). Se observó que, para la inducción de la germinación no se requiere de la adición de reguladores de crecimiento.

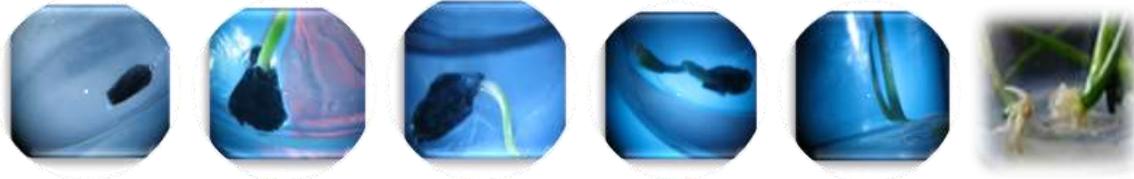


Figura 4. Germinación de semillas de *Agave* var. Púa Larga, en un periodo de 6 semanas (1-6).

Las semillas que no germinaron posiblemente los embriones presentaban daños o heridas en la testa. Los resultados del porcentaje de germinación concuerdan con los datos reportados por Martínez-Palacios *et al.* (2003) para *A. victoriae-reginae* en los que las semillas iniciaron el proceso de germinación después de cuatro días y en dos semanas, con un porcentaje de 90%, en medio MS sólido. Rodríguez *et al.* (2007), obtuvieron el 90% de germinación de semillas en un tiempo de 5 días. Sánchez-Urbina *et al.* (2008), obtuvieron un 24% de germinación de semillas de *A. grijalvensis*. Tejavathi *et al.* (2007) observaron la germinación de semillas de *A. vera-cruz* después de siete días, sin mencionar el porcentaje total de semillas germinadas *in vitro*, al igual que Santacruz-Ruvalcaba *et al.* (1999). Gutiérrez *et al.* (2020), indican que diferentes parámetros afectan la germinación de semillas.

Efecto de los reguladores de crecimiento en la inducción morfogénica de plántulas a partir de tallos, cotiledones y hojas

Cultivo de tallos

Las secciones de tallo cultivados en medio MS, adicionado de los reguladores de crecimiento de 2,4-D y K en concentraciones de 0.1, 0.5 y 1.0, 0.5, 1.0, 2.0 y 3 mg L⁻¹ respectivamente (Cuadro 1). En el tratamiento sin hormonas lograron la formación de brotes no definidos y vitrificados, en dos meses, posteriormente se deshidrataron hasta la pérdida del material en dos meses. En los cultivos desarrollados en el medio de cultivo MS con las concentraciones de hormonas 2,4-D y K 1:3 mg L⁻¹ los brotes presentaron diferenciación para dar origen a la formación de una planta completa (Figura 5).

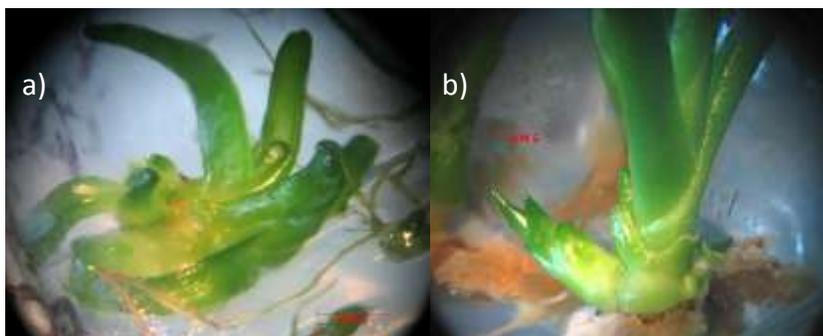


Figura 5. Comparación de brotes formados por los tallos a 60 días de inducción. a) Cultivos desarrollados en medio MS sin hormonas brotación vitrificada en muy pocos explantes. b) Brotes obtenidos en medio MS con las concentraciones de 2,4-D y K 1:3, mgL⁻¹.

A diferencia de los trabajos realizados por Robert *et al.* (2006) las hormonas utilizadas para la formación de brotes fueron 2,4-D y BAP entre ocho y 12 semanas en un medio MS al 50% de sales minerales modificando el contenido de nitrógeno para generar plantas. Los trabajos realizados por Martínez *et al.* (2003) en tallos de *A. victoriae-reginae* formaron callos en todos los casos con medio MS y 2,4-D sin BAP, excepto en el 40% de los tallos cultivados con 4.52 μM de 2,4-D que sufrió una severa necrosis por oxidación y aproximadamente el 50% de los callos generados con 0.45 y 4.52 μM de 2,4-D formaron una gran cantidad de embriones, algunos de ellos diferenciaron en embriones somáticos.

Aureoles-Rodríguez *et al.* (2008) obtuvieron la morfogénesis en explantes de *A. inaequidens* Koch con los reguladores de crecimiento 6-benciladenina (BA) y cinetina (K) produjo mayor número de brotes de tallo, mientras que con 6- γ,γ -dimetilallilamino purina (2ip) produjeron una amplia variedad de respuestas. En el presente trabajo, se puede indicar que para *A. salmiana* var Púa Larga con los reguladores 2,4-D y K en 1:3, mg L^{-1} , fue el tratamiento que mejor presentó diferenciación para la formación de plantas completas (23), representa el 92 %. los demás tratamientos generaron entre el 84 a 88 % de plántulas, con un total de 364 plantas.

Cultivo de cotiledones

El cultivo de cotiledones realizado en medio de cultivo sin la adición de hormonas a los 90 días se observó que los cultivos no se desarrollaron, mientras que en todos los cultivos adicionados de las concentraciones de reguladores de crecimiento de 2,4-D y K, específicamente en la concentración de 1:1 mg L^{-1} se presentó la formación de células bien diferenciadas, similares a estructuras globulares (“callos embriogénicos”). Este callo denominado “embriogénico” en un tiempo aproximadamente de 60 días generó la formación de plántulas completas con raíces definidas, 87%), (Figura 6), (348 plantas en total en todos los tratamientos).

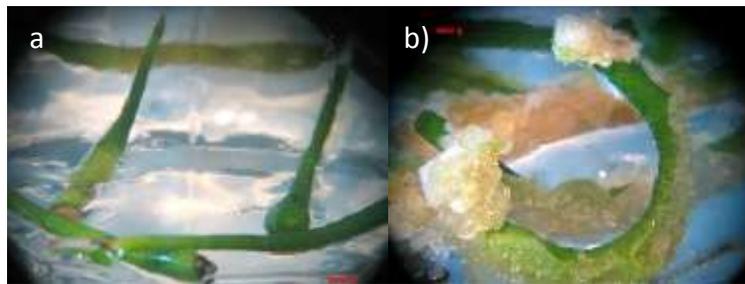


Figura 6. Respuesta observada en cultivos de cotiledones. a) Cultivo de cotiledones sin hormonas presenta necrosis en 90 días. b) Formación de callo embriogénico en concentraciones de 2,4-D y K, 1:1 mg L^{-1} .

En el presente trabajo, solo se describen las estructuras globulares del callo embriogénico, para su identificación generalmente se verifica con estudios histológicos desde su origen hasta la obtención de germinación de plantas. El proceso embriogénico para agaves ha sido estudiado con excelentes resultados. Nikan *et al* 2003, desarrollaron cultivos de callo embriogénico de *A. sisalana* con diferentes concentraciones (0.2 a 1.0 mg L^{-1}) de reguladores de crecimiento BAP, K, ANA y 2,4-D, para la obtención de plantas las cuales fueron monitoreadas hasta su viabilidad en campo. Estudios similares han sido reportados para *Agave victoria-reginae* (Martínez *et al.*, 2003), *A. tequilana* weber (Portillo *et al.*, 2007) y *A. angustifolia* Haw (Arzate *et al.*, 2016). Recientes trabajos sobre el desarrollo de embriones somáticos de *A. tequilana* es con la finalidad de preservar a través de técnicas de criogénesis (Delgado-Aceves *et al.*, 2021).

Cultivo de hojas

El cultivo de hojas sin la presencia de hormonas presentó una deshidratación del tejido durante el periodo de inducción; mientras que en los otros tratamientos presentaron la formación de raíces y callo embriónico (Figura 7), en el tratamiento con la concentración de 2,4-D y K 1:3 mg L⁻¹, se obtuvo un porcentaje de respuesta del 81%, 20 plántulas, en los demás tratamientos el porcentaje fue entre 75 y 78%, con un total de 324 plántulas.

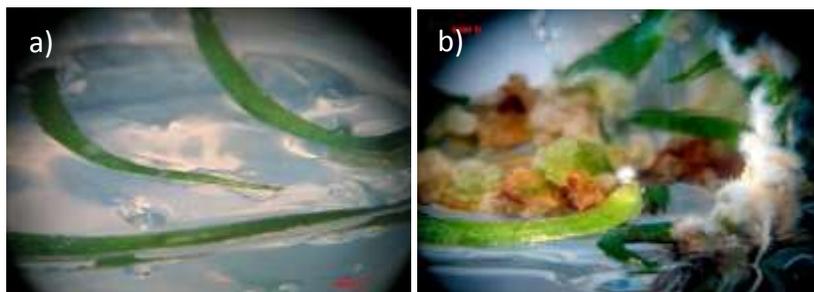


Figura 7. Cultivo de hojas. a) Explantes de hojas cultivadas en medio de cultivo sin hormonas, no presentó respuesta. b) Explantes de hojas cultivados en medio MS con 2,4-D y K 1:3 mg L⁻¹ presenta formación de callo “embrionario” y raíces para posteriormente formar plántulas de *A. salmiana* var Púa Larga.

El “callo embriónico” generó plántulas completas en un tiempo de dos meses. Robert *et al.* (2006), en la inducción de plántulas trabajaron con tejido meristemático localizado en la parte derecha baja de los primordios de las hojas obteniendo brotes adventicios por organogénesis directa. Martínez (2003) trabajó con segmentos de hojas de *A. victoriae-reginae* y distintas concentraciones de hormonas 2,4-D y BAP en donde en algunos explantes con 2,4-D solo o en combinación con BAP indujeron la formación de callos, y en la mitad de estos tratamientos ocurrió la formación de estructuras nodulares, sus mejores respuestas se obtuvieron con 2.26 y 4.52 μM 2,4-D sin BAP, al parecer BAP impide la formación de estructuras nodulares. Las plántulas obtenidas del cultivo de explantes de cotiledones, tallo y hojas se subcultivaron en las mismas condiciones de cultivo, medio MS (50%) adicionado de los reguladores de crecimiento con las concentraciones que les dieron origen, con el objeto de que continuaran su crecimiento. En un periodo de dos meses después del subcultivo, se obtuvieron plántulas completas (314), bien diferenciadas con hojas y raíces. El callo friable formado también se subcultivo en las condiciones de cultivo que le dieron origen, solo se modificó la concentración de 2,4-D (1.25 mg L⁻¹) para apoyar el crecimiento.

Aclimatización de las plántulas

La técnica de micropropagación se ha aplicado a diversas especies de agaves con fines de conservación, multiplicación y rescate de especies, entre otras, para lo cual se han aplicado diversos procedimientos para la obtención de plantas *in vitro*, que se han transferido a condiciones *ex vitro*, proceso de interés e impacto en el logro la aclimatación e introducir las plantas en campo (Enríquez-del Valle *et al.*, 2016b y Bautista-Castellanos *et al.*, 2020). Estos autores mencionan los diversos sustratos utilizados para adaptación de las plantas micropropagadas con un porcentaje de sobrevivencia superior al 90%. En esta investigación no fue necesario el estudio de la fase de enraizamiento *in vitro* porque la planta tuvo la capacidad de emitir sus propias raíces en los dos medios de cultivo propuestos. Varios autores concuerdan con el hecho de que algunas especies de plantas no necesitan pasar por la etapa de enraizamiento *in vitro* porque emiten sus propias raíces en el mismo medio de cultivo donde desarrollan yemas nuevas, por lo tanto, el proceso de multiplicación y enraizamiento trascurren en forma simultánea (Castillo, 2008). Sin embargo, hay reportes que mencionan que se hace necesario apoyar las condiciones de cultivo externas para un mejor éxito de

aclimatación de las plantas, trabajos realizados por Martínez *et al.* (2003) con *A. victoriae-reginae*; una vez obtenidas las plántulas, lavan las raíces con agua corriente para eliminar los residuos de agar y posteriormente son sumergidos en una solución al 0.2% con Benlate por 10 min para prevenir una contaminación fúngica, obteniendo un 80% de plantas aclimatizadas. Para *Agave potatorum* Zucc, las plantas micropropagadas y aclimatadas en sustrato turba-perlita (1:2), fueron fertirrigadas con una solución nutritiva Steiner (25 y 50%) para mejorar el crecimiento y otros parámetros en la planta, obteniendo plantas aclimatizadas en un 84 a 90% respectivamente (Bautista-Castellanos *et al.*, 2020). Cabe destacar que, para esta variable no se analizó la cantidad, ni la calidad de raíz, únicamente se cuantificó la presencia de raíz en los explantes. Estadísticamente se reportaron diferencias significativas ($P \leq 0.01$) entre los tratamientos aplicados para la variable porcentaje de presencia de raíz. En el trabajo, en todos los medios de cultivo adicionado de los reguladores de crecimiento (2,4-D y K; 0.1, 0.5 y 1.0 /1.0, 2.0 y 3 mg L⁻¹) se desarrollaron raíces con un promedio general de enraizamiento del 68%; sin embargo, la relación de citocinina (K) en el porcentaje de enraizamiento fue inversamente proporcional; es decir, mientras menos K tenía el medio de cultivo mayor presencia de raíces se manifestaba. Las plantas obtenidas *in vitro* se trasladaron en una mezcla de sustrato: tepojal y tierra negra (1:1; %) previamente se eliminó los residuos de gel-rite de las raíces con agua destilada. Estas fueron adaptadas en condiciones de invernadero por 90 días sembradas en charolas con tapa transparente de 30 x 30 cm y posteriormente expuestas a condiciones ambientales en macetas con un tamaño de 12 cm en promedio (Figura 8).



Figura 8. Aclimatación de plántulas de maguey en condiciones de invernadero, tiempo 90 días y ocho meses en maceta.

La mezcla del sustrato utilizado es esterilizada previamente y consiste básicamente en tierra negra-perlita-arena (1:1:1) en condiciones de invernadero con alta humedad relativa durante cuatro semanas. En este caso, la sobrevivencia de plantas desarrolladas fue 96% a partir de los explantes en condiciones de invernadero, obteniendo un total de 1030 plántulas, en maceta solo sobrevivieron 713 plantas (69%).

CONCLUSIONES

Se logró el 82.5% de germinación de semillas *in vitro* de *A. salmiana* var Púa Larga, la regeneración de múltiples plántulas (1030) a partir de secciones de hojas, cotiledones y tallos en la presencia de la combinación de los reguladores de crecimiento de 2,4-D y K; en concentración de 0.5-1 y 1-3 mg L⁻¹ en medio MS. En un tiempo de seis meses se obtuvieron plantas completas, que se trasladaron en condiciones de invernadero en una mezcla de sustrato tepojal, arena y tierra negra (1:1:2; %), obteniendo 1030 plántulas en invernadero y 713 plantas en maceta. La micropropagación vía organogénesis directa no fue posible debido a la presencia de oxidación y microorganismos en el material. El presente trabajo es apoyo a la investigación y su aplicación tecnológica para el maguey pulquero que puede generar desarrollo social y conservar las tradiciones culturales a través de un aprovechamiento sustentable sin agotar los recursos naturales.

LITERATURA CITADA

- Aguilar, D. y L. Rodríguez. 2018. Micropropagación y aclimatación de maguey Pitzometl (*Agave marmorata* Roezl) en la Mixteca poblana. *Colomb. Biotec.* 20(2), 124-131.
- Álvarez-Duarte, M.C.; E. García-Moya, J. Suárez-Espinosa, M. Luna-Cavazos, y M. Rodríguez-Acosta. 2018. Conocimiento tradicional, cultivo y aprovechamiento del maguey pulquero en los municipios de Puebla y Tlaxcala. *Polibotánica.* 45: 205-222. DOI: 10.18387/polibotanica.45.15.
- Álvarez-Aragón C., A.M. Arzate-Fernández, S. Martínez-Martínez and I. Martínez-Velasco. 2020. Regeneración de plantas de *Agave marmorata* Roezl, vía embriogénesis somática. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 23: 36, 1-13.
- Arzate-Fernández, A.; Piña-Escutia, J.L.; Norman-Mondragón, T.H.; Reyes-Díaz, J.I.; Guevara-Suárez, K.L.; Vázquez-García, L.M. 2016. Regeneration of agave (*Agave angustifolia* Haw) from encapsulated somatic embryos. *Rev. Fitotec. Mex.*, 39, 359-366.
- Aureoles-Rodríguez, F., J.L. Rodríguez-de la O., 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.
- Azofeifa, Á. 2009. Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. *Agronomía mesoamericana* 20(1): 153-175.
- Bautista-Castellanos, A.I., J.R. Enríquez-del Valle, V.A. Velasco-Velasco y G. Rodríguez-Ortiz. 2020. Enraizado de brotes *in vitro* y aclimatación de plantas de *Agave potatorum* Zucc. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios* 7(3): e2618. <http://dx.doi.org/10.19136/era.a7n3.2618>.
- Castillo-Andrade, A.I., C. Rivera Bautista., M.A. Ruiz Cabrera, R.E. Soria Guerra, E. García-Chávez, C. Fuentes-Ahumada y A. Grajales-Lagunes. 2019. *Agave salmiana* fructans as gut health promoters: Prebiotic activity and inflammatory response in Wistar healthy rats. *International Journal of Biological Macromolecules.* 136, 1,785-795. doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.06.045.
- Castillo, A. 2008. Propagación de plantas por cultivo *in vitro*: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. *FAO-Agris. INIA.* 382. 8 p.
- Chávez-Romero, R., A. Flores-Morales, H.T. Yee-Madeira, J.C. García-Zebadúa, M. González-Montoya and R. Mora-Escobedo. 2018. Disintegration treatments of *Agave Salmiana* waste: Lignocellulose characterization by physicochemical, thermogravimetric and spectroscopic studies. *Revista Bio Ciencias* 5, e500. <http://dx.doi.org/10.15741/revbio.05.e500>.
- Concepción, O., L. Nápoles, A.T. Pérez, N. Peralta, M. Hernández y R. Trujillo. 2005. Efecto de tres antioxidantes en el cultivo *in vitro* de ápices de guayaba (*Psidium guajava* L.). Relación entre el origen del explante y el contenido de compuestos fenólicos. *Cultivos Tropicales*, 26(1),33-39. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=193215916005>.
- Delgado-Aceves, L.; M.T. González-Arno, F. Santacruz-Ruvalcaba, R. Folgado y L. Portillo. 2021. Indirect Somatic Embryogenesis and Cryopreservation of *Agave tequilana* Weber Cultivar 'Chato'. *Plants*, 10, 249. <https://doi.org/10.3390/plants10020249>.
- Enríquez-Del Valle, J.R., G. Carrillo-Castañeda y J.L. Rodríguez de la O. 2005a. Sales inorgánicas y ácido indolbutírico en el enraizado *in vitro* de brotes de *Agave angustifolia*. *Revista Fitotecnia Mexicana.* 28, 175-178.
- Enríquez-Del Valle, J.R., K.H. Antonio-Luis, G. Rodríguez-Ortiz and G.V. Campos-Ángeles. 2016b. Effect of culture medium and incubation on the characteristics of micropropagated agave plants. *Cien. Inv. Agr.* 43(2): 263- 272. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-16202016000200009>.
- Enríquez-Del Valle, J.R., S.A. Alcara-Vázquez, G. Rodríguez-Ortiz, M.E. Miguel-Luna, and C. Manuel-Vázquez. 2016c. Fertirriego en vivero a plantas de *Agave potatorum* Zucc micropropagadas-aclimatizadas. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 7(5): 1167-1177. <https://doi.org/10.29312/remexca.v7i5.240>.
- Escalante, A., M. Giles-Gómez, G. Hernández, M.S. Córdova-Aguilar, A. López-Munguía, G. Gosset and F. Bolívar. 2008. Analysis of bacterial community during the fermentation of pulque, a traditional

- Mexican alcoholic beverage, using a polyphasic approach. *International Journal of Food Microbiology*. 124, 126-134. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.03.003>.
- Gutiérrez-Hernández, G.F., Y.D. Ortiz-Hernández, L.J. Corzo-Ríos y T. Aquino-Bolaños. 2020. Composición química y germinación de semillas de tobalá (*Agave potatorum*). *Interciencia* 45, 5, 223-228.
- Hazra, S. H.; S. Das and A.K. Das. 2002. Sisal plant regeneration via organogenesis. *Plant Cell, Tissue Organ Cult.* 70:235–240
- López-Romero, J.C., J.F. Ayala-Zavala, G.A. González-Aguilar, E.A. Peña-Ramos and H. González-Ríos. 2018. Biological activities of agave by-products and their possible applications in food and pharmaceuticals. *J. Sci Food Agric* 98: 2461-2474. <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.8738>.
- Luna, M.E.M., Enríquez-del Valle, J.R; Velasco-Velasco, V.A; Y. Villegas-Aparicio y Carrillo-Rodríguez, J.C. 2014. Concentración de benciladenina, tipo y dosis de carbohidratos en el medio de cultivo para proliferación de brotes de *Agave Americana*. *Rev. FCA UNCUIYO*, 46(1), 97-107.
- Martínez-Palacios, A.; M.P. Ortega-Larrocea, V.M. Chávez and R. Bye. 2003. Somatic embryogenesis and organogenesis of *Agave victoria-reginae*: considerations for its conservation. *Plant Cell, Tissue Organ Cult.* 74:135–142.
- Monja-Mio, K. and M.L. Robert. 2013. Direct somatic embryogenesis of *Agave fourcroydes* Lem. through thin cell layer culture. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant.* 49:541–549. <http://doi.org/10.1007/s11627-013-9535-7>.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growy and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, 15: 473-497. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.
- Narváez, A., T. Martínez y M. Jiménez. 2016. El cultivo de maguey pulquero: opción para el desarrollo de comunidades rurales del altiplano mexicano. *Revista de Geografía Agrícola*. 56. 44-50.
- Narváez-Suárez, A.U., T. Martínez-Saldaña and M.A. Jiménez-Velázquez. 2016. El cultivo de maguey pulquero: opción para el desarrollo de comunidades rurales del altiplano mexicano. *Revista de Geografía Agrícola*, (56), 33-44. [Fecha de Consulta 23 de junio de 2021]. ISSN: 0186-4394. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=75749287005>.
- Nikam, T.D.; G.M. Bansude and K.C. Aneesh-Kumar. 2003. Somatic embryogenesis in sisal (*Agave sisalana* Perr. Ex. Engelm). *Plant Cell Rep.* 22, 188–194.
- Norma Oficial Mexicana. Protección ambiental-especies nativas de México de flora y fauna silvestres-categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión o cambio-lista de especies en riesgo. NOM-059-Ecol-2002. Diario Oficial, miércoles 6 de marzo de 2002. México, D.F. 2001. pp. 158-169.
- Peralta-García, I., F. González-Muñoz, E. R-AM, A. Sánchez-Flores and A. López-Munguía. 2020. Evolution of fructans in aguamiel (*Agave Sap*) during the plant production lifetime. *Front. Nutr.* 7:566950. <http://doi.org/10.3389/fnut.2020.566950>.
- Portillo, L.; F. Santacruz-Ruvalcaba, A. Gutiérrez-Mora and B. Rodríguez-Garay. 2007. Somatic embryogenesis in *Agave tequilana* Weber cultivar azul. *Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 43, 569–575. <https://doi.org/10.1007/s11627-007-9046-5>.
- Rodríguez-Hernández, G., F. Morales-Domínguez, R. Gutiérrez-Campos, S. Aguilar-Espinosa y E. Pérez-Molphe-Balch. 2007. Generación de raíces transformadas de *Agave salmiana* Otto y su colonización por *Glomus intraradices*. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 30, 215-222.
- Robert, M y A. García. 1985. El cultivo de tejidos vegetales y su posible aplicación en el mejoramiento genético de las Agavaceas. In: Cruz C, Castillo L del, Robert M, Ondarza RN (eds) Simposio sobre biología y aprovechamiento integral del henequén y otros Agaves. CICY, México. pp. 83-89.
- Robert, M.L., J.L. Herrera-Herrera, E. Castillo, G. Ojeda and M.Á. Herrera-Alamillo. 2006. An efficient method for the micropropagation of agave species. *Methods in Molecular Biology*. Vol. 318: *Plant Cell Culture Protocols*, Second Edition, Totowa, NJ: Humana Press Inc.

- Romero-López, MR., P. Osorio-Díaz, A. Flores-Morales, N. Robledo and R. Mora-Escobedo. 2015. Chemical composition, antioxidant capacity and prebiotic effect of aguamiel (*Agave atrovirens*) during *in vitro* fermentation. *Rev Ing Mex.* 14:281–92.
- Sánchez-Madrigal, M.Á., A. Quintero-Ramos, C.A. Amaya-Guerra, C.O. Meléndez-Pizarro, S.L. Castillo-Hernández and C.J. Aguilera-González. 2019. Effect of agave fructans as carrier on the encapsulation of blue corn anthocyanins by spray drying. *Foods*, 8, 0268. <http://dx.doi.org/10.3390/foods8070268>.
- Sánchez-Urbina., L.M.C., T.R. Ventura-Canseco, M. Ayora-Talavera, M.A. Abud-Archila, I. Pérez-Farrerdendooven and F.A. Gutierrez-Miceli. 2008. Seed germination and *in vitro* propagation of *Agave grijalvensis* an endemic endangered Mexican species. *Asian Journal of Plant Sciences* 7: 752-756.
- Santacruz-Rubalcaba, F., H. Gutiérrez-Pulido and B. Rodríguez-Garay. 1999. Efficient *in vitro* propagation of *Agave parrasana* Berger. *Plant Cell Tissue and Organ Cult.* 56, 163-167.
- Silos-Espino, H., C.L. Tovar-Robles, N. González-Cortés, S.J. Méndez-Gallegos y D. Rossel-Kipping. 2011. Estudio integral del maguey (*Agave salmiana*): propagación y valor nutricional. *RESPYN Revista Salud Pública y Nutrición. Edición Especial No. 5* 2011. pp. 75-82.
- Sudha, G. and G.A Ravishankar. 2002. Involvement and interaction of various signaling compounds on the plant metabolic events during defense response, resistance to stress factors, formation of secondary metabolites and their molecular aspects. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 71, 3. 181-212.
- Tejavathi, H., M.D. Rajanna, R. Sowmya and K. Gayathamma. 2007. Induction of somatic embryos from cultures of *Agave vera-cruz* Mill. *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant* 43, 423–428.