



CENTRO DE CIENCIA BÁSICAS

DEPARTAMENTO DE QUIMICA

Desarrollo de un sistema para la multiplicación de *Agave shawii* a partir de cultivo *in vitro*

Tesis que presenta

ITZE BERENICE MORENO MENDOZA

Para obtener el Grado de

Maestra en Ciencias en Biotecnología Vegetal

TUTOR: Dr. Eugenio Pérez Molphe Balch

COMITÉ TUTORAL: Dra. Yenny Adriana Gómez Aguirre

Dra. Lucía Isabel Chávez Ortiz

Aguascalientes, Ags. enero del 2021.

AUTORIZACIONES



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES
CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
Departamento de Química

FORMATO DE CARTA DE VOTO APROBATORIO

M. en C. Jorge Martín Alférez Chávez
Decano del Centro de Ciencias Básicas
PRESENTE

Por medio de la presente, como tutor designado de la estudiante Itze **Berenice Moreno Mendoza**, con ID **249470**, quien realizó la tesis titulada: **“Desarrollo de un sistema de para la multiplicación de *Agave shawii* a partir de cultivo *in vitro*”,** y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirla, así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
“Se Lumen Proferre”

Aguascalientes, Ags., a 17 de diciembre de 2020.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'EMPB'.

Dr. Eugenio Martín Pérez Molphe Balch
Tutor de Tesis

c.c.p.- Interesado
c.c.p.- Secretaría de Investigación y Posgrado
c.c.p.- Jefatura del Depto. de Química
c.c.p.- Consejero Académico
c.c.p.- Minuta Secretario Técnico



UNIVERSIDAD AUTONOMA
DE AGUASCALIENTES

FORMATO DE CARTA DE VOTO APROBATORIO

M. en C. Jorge Martín Alférez Chávez
Decano del Centro de Ciencias Básicas
P R E S E N T E

Por medio de la presente, como cotutor designado de la estudiante **ITZE BERENICE MORENO MENDOZA**, con **ID 249470**, quien realizó la tesis titulada: **"DESARROLLO DE UN SISTEMA PARA LA MULTIPLICACION DE *Agave shawii* A PARTIR DE CULTIVO *IN VITRO*"**, y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirla, así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 17 de diciembre de 2020.

Dra. Lucía Isabel Chávez Ortiz
Asesora de Tesis

c.c.p.- Interesado
c.c.p.- Secretaría de Investigación y Posgrado
c.c.p.- Jefatura del Depto. de Química
c.c.p.- Consejero Académico
c.c.p.- Minuta Secretario Técnico

M. EN C. JORGE MARTIN ALFAREZ CHAVEZ
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

P R E S E N T E

Por medio del presente como **Miembro del Comité Tutorial** designado del estudiante **ITZE BERENICE MORENO MENDOZA** con ID 249470 quien realizó la tesis titulado: **DESARROLLO DE UN SISTEMA DE PARA LA MULTIPLICACIÓN DE *Agave shawii* A PARTIR DE CULTIVO *in vitro***, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia damos nuestro consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que nos permitimos emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirla así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, le envío un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E

“Se Lumen Proferre”

Aguascalientes, Ags., a 18 de diciembre de 2020.


Dra. Yenny Adriana Gómez Aguirre
Asesor de tesis

c.c.p.- Interesado
c.c.p.- Secretaría Técnica del Programa de Posgrado

Fecha de dictaminación dd/mm/aaaa: 1/5/21

NOMBRE: ITZE BERENICE MORENO MENDOZA ID 249470

PROGRAMA: Maestría en Ciencias, área Biotecnología Vegetal o Toxicología LGAC (del posgrado): Biotecnología Vegetal

TIPO DE TRABAJO: (X) Tesis () Trabajo Práctico

TÍTULO: Desarrollo de un sistema de para la multiplicación de *Agave shawii* a partir de cultivo *in vitro*.

IMPACTO SOCIAL (señalar el impacto logrado): Se desarrollaron sistemas biotecnológicos para el cultivo y propagación *in vitro* de una especie amenazada de Agave. Esta metodología puede permitir su conservación y explotación racional convirtiendo a esta especie en una fuente sostenible de recursos.

INDICAR SI NO N.A. (NO APLICA) SEGÚN CORRESPONDA:

INDICAR	SI	NO	N.A. (NO APLICA)	SEGÚN CORRESPONDA:
Elementos para la revisión académica del trabajo de tesis o trabajo práctico:				
SI				El trabajo es congruente con las LGAC del programa de posgrado
SI				La problemática fue abordada desde un enfoque multidisciplinario
SI				Existe coherencia, continuidad y orden lógico del tema central con cada apartado
SI				Los resultados del trabajo dan respuesta a las preguntas de investigación o a la problemática que aborda
SI				Los resultados presentados en el trabajo son de gran relevancia científica, tecnológica o profesional según el área
SI				El trabajo demuestra más de una aportación original al conocimiento de su área
SI				Las aportaciones responden a los problemas prioritarios del país
N.A.				Generó transferencia del conocimiento o tecnológica
SI				Cumple con la ética para la investigación (reporte de la herramienta antiplagio)
El egresado cumple con lo siguiente:				
SI				Cumple con lo señalado por el Reglamento General de Docencia
SI				Cumple con los requisitos señalados en el plan de estudios (créditos curriculares, optativos, actividades complementarias, estancia, predoctoral, etc)
SI				Cuenta con los votos aprobatorios del comité tutorial, en caso de los posgrados profesionales si tiene solo tutor podrá liberar solo el tutor
N.A.				Cuenta con la carta de satisfacción del Usuario
SI				Coincide con el título y objetivo registrado
SI				Tiene congruencia con cuerpos académicos
SI				Tiene el CVU del Conacyt actualizado
N.A.				Tiene el artículo aceptado o publicado y cumple con los requisitos institucionales (en caso que proceda)
En caso de Tesis por artículos científicos publicados				
				Aceptación o Publicación de los artículos según el nivel del programa
				El estudiante es el primer autor
				El autor de correspondencia es el Tutor del Núcleo Académico Básico
				En los artículos se ven reflejados los objetivos de la tesis, ya que son producto de este trabajo de investigación.
				Los artículos integran los capítulos de la tesis y se presentan en el idioma en que fueron publicados
				La aceptación o publicación de los artículos en revistas indexadas de alto impacto

Con base a estos criterios, se autoriza se continúen con los trámites de titulación y programación del examen de grado:

SI X

No

FIRMAS

Elaboró:

* NOMBRE Y FIRMA DEL CONSEJERO SEGÚN LA LGAC DE ADSCRIPCIÓN:

Yenny Adriana Gómez A
Dra. Yenny Adriana Gómez Aguirre

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO TÉCNICO:

Eugenio Pérez Molphe Balch
Dr. Eugenio Pérez Molphe Balch

* En caso de conflicto de intereses, firmará un revisor miembro del NAB de la LGAC correspondiente distinto al tutor o miembro del comité tutorial, asignado por el Decano

Revisó:

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO:

Haydee Martínez Ruvalcaba
Dra. Haydee Martínez Ruvalcaba

Autorizó:

NOMBRE Y FIRMA DEL DECANO:

M. en C. Jorge Martín Alférez Chávez

Nota: procede el trámite para el Depto. de Apoyo al Posgrado

En cumplimiento con el Art. 105C del Reglamento General de Docencia que a la letra señala entre las funciones del Consejo Académico: ... Cuidar la eficiencia terminal del programa de posgrado y el Art. 105F las funciones del Secretario Técnico, llevar el seguimiento de los alumnos.

AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT por mi beca con núm. de apoyo 716818, continuar con programas de apoyo al posgrado que otorguen sostén económico para la continuación de nuestros estudios, sin los cuales muchos no podríamos lograrlo.

A la Universidad Autónoma de Aguascalientes por brindarme la oportunidad de formarme en sus aulas con excelentes maestros, así como las facilidades otorgadas para el buen desarrollo y termino de mi maestría.

Al Dr. Eugenio Martín Pérez Molphe Balch por permitirme aprender de su amplio conocimiento y experiencia, la confianza otorgada y su siempre amable apoyo para la culminación de mi maestría, una de mis mas anheladas metas. Así como las facilidades otorgadas para la realización de mi Tesis.

A la Dra. Lucía Isabel Chávez Ortiz por su gran disposición, paciencia y asesoría para la realización de mi trabajo de Tesis.

A la Dra. Yenny Adriana Gómez Aguirre por sus consejos para la culminación de mi trabajo.

Al M. en C. Isaac Reyes Silva por su siempre amable disposición para enseñar y ayudar.

DEDICATORIAS

A Dios

A mi esposo Froylan por siempre creer en mi, apoyarme en perseguir y pelear por mis sueños.

A mis hijas Hazel y Karol por ser mis catalizadores de vida, ustedes mejoran todo mi mundo. Gracias por su paciencia y espera para que terminara mi posgrado.

A mis papis Alicia y Alfonso que hicieron su mejor esfuerzo por darme amor, educación y valores.

A todos los profesores del Posgrado por compartir sus conocimiento y pasión por la Biotecnología Vegetal como herramienta para mejorar la vida.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS

ÍNDICE DE FIGURAS

RESUMEN

ABSTRACT

1. INTRODUCCIÓN	10
2. ANTECEDENTES	12
2.1 GENERALIDADES DEL GÉNERO <i>AGAVE</i>	12
2.2 CLASIFICACIÓN Y DESCRIPCIÓN DEL AGAVE COSTERO (<i>Agave shawii</i>) ENGELMANN	14
2.3 DIFERENCIAS ENTRE SUBESPECIES DEL A. SHAWII	17
2.3.1 Subespecie <i>A. shawii shawii</i> E.	18
2.3.2 Subespecie <i>A. shawii goldmaniana</i> T.	19
2.4 SINONIMIA	20
2.5 TAXONOMÍA DEL AGAVE <i>SHAWII</i>	20
2.6 ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN <i>A. SHAWII</i>	21
2.7 ESTADO ACTUAL DE CONSERVACIÓN	24
2.8 PROPAGACIÓN DEL AGAVE <i>SHAWII</i>	25
2.8.1 Reproducción sexual	25

2.8.2 Reproducción asexual	25
2.9 SISTEMAS DE PROPAGACIÓN <i>IN VITRO</i> DE PLANTAS	26
2.9.1 Descripción general y bases del cultivo de tejidos vegetales	26
2.9.2 Micropropagación	27
2.9.3 Explante	28
2.9.4 Asepsia	28
2.9.5 Medio de cultivo	29
2.9.6 Gelificante	30
2.9.7 pH del medio de cultivo	30
2.9.8 Reguladores de crecimiento vegetal	31
2.9.9 Aislamiento e incubación	34
2.9.10 Etapas de micropropagación	34
2.9.11 Cultivo de tejidos vegetales en agaves	36
3. JUSTIFICACIÓN	40
4. HIPÓTESIS	41
5. OBJETIVOS	41
5.1 OBJETO GENERAL	41
5.2 OBJETIVOS PARTICULARES	41
6. METODOLOGÍA	42
6.1 MULTIPLICACIÓN DE BROTES EN MEDIO MS Y DIFERENTES CONCENTRACIONES DE CITOCININA	42
6.1.1 Material vegetal	43
6.1.2 Medio de cultivo	43
6.1.3 Obtención de explantes	44
6.1.4 Inoculación	45
6.1.5 Mantenimiento	46

6.2. RESPUESTAS MORFOGÉNICAS DE LOS EXPLANES <i>IN VITRO</i> AL UTILIZAR CITOCININA EN COMBINACIÓN CON AUXINA EN EL MEDIO MS	46
6.2.1. Medio de cultivo	46
6.2.2. Obtención de explantes	47
6.2.3. Inoculación	47
6.2.4. Mantenimiento	48
6.3 ACLIMATACIÓN Y TRANSFERENCIA A SUELO	48
7. RESULTADOS Y DISCUSIONES	
7.1. MULTIPLICACIÓN DE BROTES EN MEDIO CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE CITOCININA	50
7.2. RESPUESTAS ORGANOGÉNICAS DE LOS EXPLANES <i>IN VITRO</i> AL UTILIZAR CITOCINA EN CONJUGACIÓN CON AUXINA EN EL MEDIO.	58
7.3. ACLIMATACIÓN Y TRASPLANTE DE PLÁNTULAS OBTENIDAS <i>IN VITRO</i> PARA SU VIDA <i>EX VITRO</i>	67
8. CONCLUSIÓN	71
9. BIBLIOGRAFÍA	72

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Jerarquía taxonómica <i>Agave shawii</i> Engelm. Sistema Integrado de Información Taxonómica (SIIT).	23
Tabla 2. Auxinas utilizadas en Cultivo de Tejidos Vegetales.	34
Tabla 3. Citocininas utilizadas en Cultivo de Tejidos Vegetales.	36
Tabla 4. Estudios sobre la propagación de Agaves por medio de multiplicación de meristemos y organogénesis directa.	41
Tabla 5. Solución salina madre de Murashige & Skoog, 1962.	45
Tabla 6. Dosis de Benciladenina añadida al medio para estimular brotación en meristemos de tallo.	49
Tabla 7. Cuadro de combinaciones de auxina (BA) y citocinina (2,4-D) añadidas al medio MS.	49
Tabla 8. Promedio y desviación estándar del número de brotes por explante obtenidos en los tres tratamientos con citocinina 6-Bencilaminopurina (BA) realizadas en <i>Agave shawii</i> , n=25.	54
Tabla 9. Efecto de las diferentes combinaciones de MS + RCV (mg L ⁻¹) en la formación de callo, brote único y brote múltiple, sobre diferentes tipos de explantes de <i>A. shawii goldmaniana</i> .	60
Tabla 10. Datos y formula utilizados para graficar los resultados de la combinación de citocinina (BA) con auxina (2,4-D) en diferentes tipos de explante.	64
Tabla 11. Porcentaje de sobrevivencia de plantas de <i>A. shawii goldmaniana</i> después de 6 semanas de aclimatación.	69

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Principales características morfológicas de un agave. Ilustración de Elvira	
---	--

Romano Grande, Revista Oikos UNAM 2017.	16
Figura 2. Ilustración botánica del <i>Agave shawii</i> . Derechos Universidad de California EUA.	18
Figura 3. Agave de la costa <i>Agave shawii</i> Engelm. Inflorescencia viva (a); Roseta múltiple (b); Espinas (c).	19
Figura 4. Diferencias entre subespecies de <i>A. shawii</i> . Inflorescencia de <i>A. shawii goldmaniana</i> (a); Inflorescencia de <i>A. shawii goldmaniana</i> (b).	20
Figura 5. Inflorescencia de <i>A. shawii shawii</i> E. (Vanderplank, 2007).	21
Figura 6. Inflorescencia de <i>A. shawii goldmaniana</i> T. (Tomada de sitio web Conabio, 2019).	22
Figura 7. Distribución de <i>A. shawii</i> subespecies <i>shawii</i> E. y <i>goldmaniana</i> T. (Webb & Starr, 2015).	25
Figura 8. Distribución de <i>A. shawii goldmaniana</i> Trelease (Webb & Starr, 2015).	26
Figura 9. Parte basal de la roseta del cual se obtiene el explante de tallo.	47
Figura 10. Respuesta de explantes de meristemo de tallo de <i>A. shawii</i> al ser cultivado en medio MS + 1.0 mg L ⁻¹ .	52
Figura 11. Gráfica de la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis evidencia la significancia en formación de botes del tratamiento 2 (2.0 mg L ⁻¹ de BA).	55
Figura 12. Generación de brotes de explantes basales de <i>A. shawii shawii</i> cultivados en medio MS + 1.0 mg L ⁻¹ a los 50 días de incubación.	56
Figura 13. Crecimiento celular indiferenciado (Callo) de explantes meristemáticos de tallo al inocularse en medio MS añadido con auxinas y citocininas.	57
Figura 14. Brotación múltiple sobre explantes basales de tallo cultivados en medios con 2.0 mg L ⁻¹ de BA a los 90 días.	58

Figura 15. Brotación única del explante de meristemo de tallo de <i>A. shawii</i> (regeneración) con la adición de citocinina (Benciladenina) en 3.0 mg L ⁻¹ al medio MS comparado con el testigo.	59
Figura 16. Análisis de frecuencia de la respuesta obtenida en la combinación de los reguladores vegetales BA / 2,4-D en los tres diferentes tipos de explantes.	61
Figura 17. Respuesta según el tipo de tratamiento aplicado al medio de cultivo, estos contienen BA y 2,4-D a diferentes concentraciones en mg L ⁻¹ .	63
Figura 18. Respuestas obtenidas los diferentes tratamientos con la combinación de citocinina (BA) con auxina (2,4-D), con la fórmula CBA-CB2HD.	65
Figura 19. Generación y crecimiento de tejido caloso celular en explantes de hoja al inocularse en medio MS añadido con auxinas y citocininas en mg L ⁻¹ .	66
Figura 20. Producción de tejido caloso en explantes provenientes de hoja, cultivados en medio MS con auxinas más citocininas en mg L ⁻¹ .	67
Figura 21. Generación y crecimiento de callo en explantes provenientes de raíz, inoculados en medio MS con auxinas y citocinina mg L ⁻¹ .	68
Figura 22. Plántulas después de la aclimatación en proceso de trasplante.	71
Figura 23. Trasplante de complejo de brotes (a), en macetas son sustrato de turba y perlita en una relación de 1:1.	72

RESUMEN

Desarrollo de un sistema para la multiplicación de *Agave shawii* a partir de cultivo *in vitro*.

Para la micropropagación de plantas de las subespecies de *A. shawii*, se utilizaron explantes provenientes de plántulas germinadas *in vitro* y conservadas en condiciones axénicas. El estudio se dividió en dos experimentos, primero se evaluó la proliferación de brotes *in vitro* sobre explantes de meristemos de tallo inoculados en tres diferentes dosis de bencilaminopurina (BA) 1.0 mg L⁻¹ en *A. shawii shawii* y 2.0 y 3.0 mg L⁻¹ de BA en *A. shawii goldmaniana*, durante 80 días. En el segundo experimento se evaluaron las respuestas morfológicas de diferentes tipos de explantes (hoja, tallo y raíz) provenientes de *A. shawii goldmaniana*, que fueron inoculados en medios de cultivo que contenían diferentes concentraciones de citocinina más auxina en mg L⁻¹ (BA y 2,4-D) respectivamente (0 + 0), (3.0 + 0), (0 + 3.0), (2.0 + 2.0), (0 + 1.0). En la etapa de aclimatación las plántulas propagadas fueron trasplantadas en dos grupos, el primero de estos eran plántulas sembradas de manera individual y las segundas fueron sembrados en conjuntos de brotes sin separar, ambos grupos fueron sembrados en un sustrato de perlita más turba 1:1 y conservadas en invernadero a 26° C, aquí se evaluó el porcentaje de sobrevivencia según el grupo o las condiciones de siembra.

Para los resultados del primer experimento se hizo un análisis estadístico con la prueba de Kruskal-Wallis confirmando la significancia del tratamiento 2 (2.0 mg L⁻¹ de BA) en la producción de brotes múltiples respecto al resto de tratamientos. En el segundo experimento se evaluaron los resultados de manera cuantitativa, tomando en cuenta la magnitud de respuesta morfológica respecto al testigo, resultando que el explante proveniente del meristemo del tallo era el mejor para la formación de brotes y se relacionaba positivamente con la sinergia de los RCV (BA y 2,4-D) en cantidades equilibradas; los explantes tomados de tejido de hoja y raíz solo presentaron formación de tejido calloso y no resultaron aptos para la organogénesis directa, mientras que los explantes provenientes de tejido meristemático de tallo tuvieron cambios morfológicos en todas las concentraciones incluyendo brotación

múltiple. El porcentaje de sobrevivencia de plántulas sembradas individualmente fue de 70% y el de plantas sembradas en conjunto de brotes fue de 65% por la probable condición de falta de desarrollo total del sistema radicular.

ABSTRACT

System development for *Agave shawii* multiplication from *in vitro* culture

For the micropropagation of plants from the *A. shawii* subspecies, *in vitro* explants from germinated seedlings whose were preserved under axenic conditions were used. The study was divided into two experiments, first the *in vitro* buds proliferation was evaluated on stem explants from inoculated meristems in three different doses of benzylaminopurine (BA) 1.0 mg L⁻¹ in *A. shawii shawii* and 2.0 and 3.0 mg L⁻¹ BA in *A. shawii goldmaniana*, for 80 days. In the second experiment, an evaluation was also made, this time about the morphogenic responses from different explants types (leaf, stem and root) from *A. shawii goldmaniana*, which were inoculated in culture medium containing different concentrations of cytokinin plus auxin (BA and 2,4-D mg L⁻¹) respectively (0 + 0), (3.0 + 0), (0 + 3.0), (2.0 + 2.0), (0 + 1.0). In the acclimatization stage, the propagated seedlings were transplanted into two groups, in the first one, the seedlings were planted individually and for the second they were planted in buds sets; both groups were planted in perlite substrate plus 1: 1 peat and were preserved in a greenhouse at 26° C, where the survival percentage was evaluated according to the group or the sowing conditions.

Concerning the results of the first experiment, a statistical analysis was made with the Kruskal-Wallis test, confirming the significance of treatment 2 (2.0 mg L⁻¹ of BA) in the production of multiple buds compared to the rest of the treatments. In the second experiment, the results were evaluated quantitatively, taking into account the magnitude of the morphogenic response as to the control, resulting that the explant from the stem meristem was the best for the bud formation and was positively related

to the synergy of the RCV (BA and 2,4-D) in balanced amounts; the explants taken from leaf and root tissue only presented callus tissue formation and were not suitable for direct organogenesis, while explants from stem meristematic tissue had morphogenic changes at all concentrations including multiple sprouting. The survival percentage of seedlings planted individually was 70% and those that were planted in sets was 65% due to the probable lack condition of the total root system development.

1. INTRODUCCIÓN

En México los agaves o magueyes son de gran importancia económica y cultural debido a los múltiples beneficios que ofrecen al hombre y al medio ambiente en el que se desarrollan. Estas plantas xerofitas están adaptadas a diversos ecosistemas del territorio mexicano donde se encuentra la mayor diversidad de especies del mundo (García-Mendoza, 2007). En la actualidad un grupo específico de agaves destaca debido a su alto valor comercial, relegando a los agaves silvestres, nativos y endémicos, que son piezas claves en el desarrollo de los ecosistemas donde están insertos. En la gran diversidad del género se encuentran viejas especies que han evolucionado y conservado características únicas, tal es el caso del *Agave shawii* Engelmann, planta perenne arrosetada que produce numerosos hijuelos aglomerados entre sí, de hojas suculentas color verde brillante y espinas marginales color rojo y amarillo. Por su naturaleza monocárpica la planta solo florece una vez después de 20-30 años para después morir; su inflorescencia es amarilla con brácteas rojas que termina por coronar un largo tallo de hasta 240 cm de altura (Gentry, 1982).

La especie *A. shawii* se divide en dos subespecies con una sola disimilitud entre ellas que radica en la inflorescencia, que es de forma alta y abierta en *A. shawii goldmaniana*, a diferencia de la de *A. shawii shawii* que es compacta y cerrada; ambas subespecies se distribuyen en la zona de clima mediterráneo del país, crecen en las orillas y acantilados de la costa del Pacífico Norte, así como en del desierto de niebla de Baja California en México y hacia el norte de nuestro país su hábitat continua conectado con en el chaparral costero del extremo sur de California EUA. Su habitad ha sido fuertemente impactado por construcciones fronterizas, el crecimiento urbano y la sobreexplotación (Vanderplank, 2014). Actualmente las poblaciones de *A. shawii* se encuentran muy distanciadas unas de otras, generando un problema para su polinización cruzada que además depende de polinizadores naturales específicos que también han ido mermando (Vanderplank, 2017). Es imperativo conocer, estudiar y divulgar el valor de todas y cada una de las especies de Agaves de nuestro país, conocer y conservar la variabilidad genética de especies

dentro del género ya que está se traduce en diversidad de características, de gran importancia para una futura adaptación a cambios climáticos, la resistencia a plagas, enfermedades y mejoramiento genético (García-Mendoza, 2017). Para la conservación específica de este *Agave* se sugiere el uso de cultivo de tejidos vegetales que permita la propagación masiva de planta sanas en un corto tiempo.

En la presente investigación se pretende generar un sistema de propagación *in vitro* de plantas de *A. shawii shawii* y *A.shawii goldmaniana* para su estudio y conservación en el banco de germoplasma de la Universidad Autónoma de Aguascalientes, para ello se inicio con plántulas sanas procedentes de semillas, que fueron desinfectadas y germinadas de manera *in vitro*, para obtener los explantes a las plántulas se les separó la raíz y las hojas hasta dejar el tejido del tallo o meristemo que fueron cultivados en medio de cultivo Murashige & Skoog (MS) al 100% con 3% de sacarosa, 0.8% de agar, adicionado con 1.0, 2.0 y 3.0 mg L⁻¹ de benciladenina (BA) para la generación de brotes. Las hojas y las raíces también fueron cortadas en pequeños trozos para obtener explantes de 3-5 mm aproximadamente, que fueron inoculados en diferentes concentraciones y combinaciones de auxina en combinación con citocinina para observar su respuesta morfogénica. Las plántulas obtenidas de este procedimiento *in vitro* después fueron aclimatadas y trasferidas a suelo.

2. ANTECEDENTES

2.1. Generalidades del género *Agave*

Los agaves pertenecen a la familia Asparagaceae, subfamilia Agavoideae, son plantas nativas de América; México es considerado su centro de distribución y mayor diversidad (García-Mendoza, 2007) por contar con 159 especies de las 220 actualmente descritas que incluyen 129 endemismos (García-Mendoza, 2017). Es el 8vo. género con mayor riqueza en el país, diversidad atribuida en gran parte a la heterogeneidad de hábitats del país y amplia variación climática (García-Mendoza, 2019).

García-Mendoza (2017) describe la morfología de los agaves como plantas perennes, suculentas, monocotiledóneas, con raíces duras, fibrosas y superficiales; hojas suculentas dispuestas en forma de roseta con una hilera continua de espinas que termina en una espina principal en la punta. Las hojas nacen del ápice del tallo que es grueso y corto, capaz de almacenar agua y nutriente, su cutícula es gruesa cerosa para evita la rápida pérdida de agua. La inflorescencia es grande con apariencia espigada en el subgénero *Littae* y racimosa o paniculada en el subgénero *Agave*, esta es catalogada como una de las inflorescencias más grande del reino vegetal, se encuentra en la punta de un largo tallo que nace del meristemo apical llamado quiote, con un tamaño desproporcionado respecto al tamaño de la planta (García-Mendoza, 2007); su fruto en una cápsula seca, trilocular con semillas de color negro, aplanadas y rodeadas por un ala corta y dispuestas en hilera (Gentry, 1978); su reproducción puede ser sexual a través de semillas y asexual a través brotes adventicios basales, brotes del rizoma y los bulbillos que surgen en las inflorescencias. Presenta un tipo de metabolismo MAC (metabolismo ácido de las Crasuláceas) que le permite fijar CO₂ en la noche con la ventaja de no perder humedad en la apertura de sus estomas, esta característica como toda su morfología en general son adaptaciones a los diversos ambientes que permitieron su amplia dispersión incluyendo zonas de climas estresantes (García-Mendoza, 2007).

La importancia cultural y económica de este género ha trascendido a través de los siglos, por los múltiples beneficios que la planta brinda al ser humano, ya sea como alimento (botones florales, bases de hoja, quites), bebidas (agua miel, pulque y mezcal), material de construcción (quites, hojas), cerco vivo (plantas), medicinas (hojas, jugos), fibra (hojas) o producción de biocombustibles (hojas, tallo y quiote) como una alternativa al uso de combustibles derivados del carbón y el petróleo. Los diversos usos socioculturales del agave en México han derivado en una gran riqueza del grupo taxonómicos (García-Mendoza, 2007). Los miembros de este género se desarrollan en diferentes hábitats (desde el nivel del mar hasta los 3400 msnm) por su gran plasticidad genética, tolerancia ecológica y capacidad de dispersión (García-Mendoza, 2002). Muchas de las especies de agaves nativas o endémicas suelen ser sumamente sensibles a los cambios o perturbaciones de su habitat natural, por lo que se debe poner atención al uso, manejo y conservación de estos, ya que son parte de la historia evolutiva y de domesticación de los importantes Agaves. Nuestros recursos son actualmente amenazados por el desequilibrio ecológico que genera la pérdida de una sola especie de la cual dependían muchas otras más, convirtiéndose la pérdida de biodiversidad en una constante de los últimos años, pese a esto solo algunas especies han sido catalogadas en riesgo o peligro de extinción, con base en los criterios de la NOM059-SEMARNAT-2010, dejando todavía mucho por estudiar y sostener.

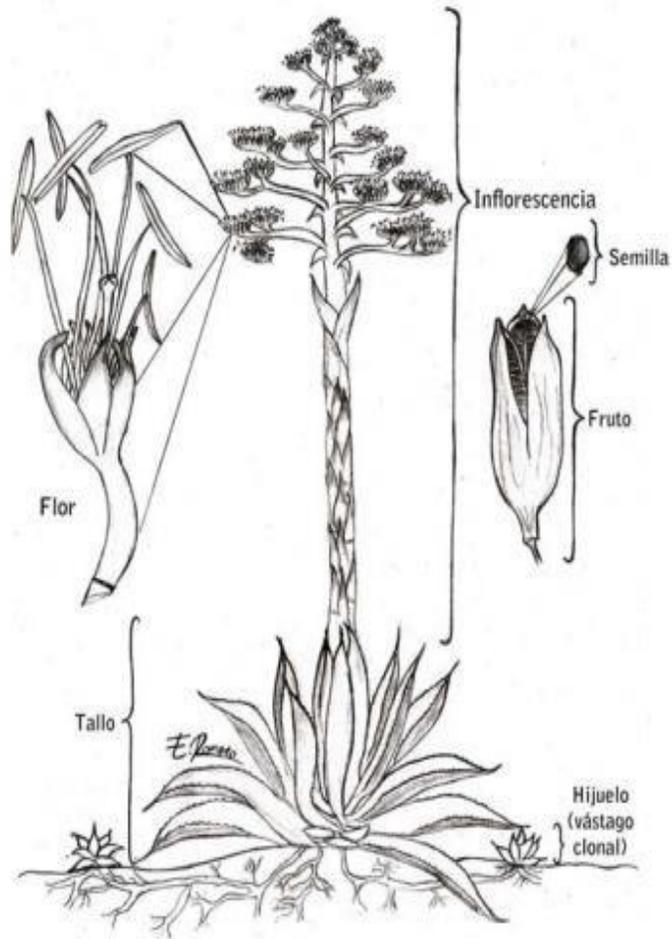


Figura 1. Principales características morfológicas de un agave. Ilustración de Elvira Romano Grande, artículo Trejo, 2017, Revista Oikos UNAM.

2.2 Clasificación y descripción del *Agave costero (Agave shawii Engelman)*.

El *A. shawii* subespecie *shawii* es una planta monocotiledónea perenne, perteneciente a la sección Umbelliflorae, nombre que se atribuye a la forma de la inflorescencia de umbela (racimosa); los miembros de esta sección se ubican en la costa occidental de Baja California que se caracteriza por su clima árido con lluvias invernales, este clima seco está fuertemente influenciado por la niebla que proporciona humedad adicional y reduce la temperatura del aire principalmente en verano (Peinado *et. al.*, 2011).

Este taxón nativo detenta dos subespecies con sutiles diferencias vegetativas, pero bien definidas en su inflorescencia, en el *A. shawii shawii* las rosetas son medianas de 240 cm de área total a diferencia de *A. shawii goldmaniana* que apenas alcanza los 150 cm aproximadamente (Gentry, 1982); aunque estas rosetas pueden encontrarse de manera individual, generalmente crece prolíferamente en grupo de varias rosetas erectas o inclinadas (Vanderplank, 2014). Ambas subespecies tienen un tallo corto de donde brotan las hojas que suelen ramificarse hasta arrastrar al suelo, las hojas son de color verde brillante gruesas, anchas y ascendentes de 2030 cm de ancho y de 40-60 cm de longitud en *A. shawii shawii* y de 10-18 cm de ancho y 40-70 cm de largo para *A. shawii goldmaniana*, a menudo la superficie adaxial es ligeramente hueca (al menos hacia el ápice) y abaxialmente convexas (Web & Starr, 2015), las hojas tienen hilera de espinas individuales continuas bien definidas de color marrón rojizo a gris oscuro 5 a 6 mm de longitud que se separan 10-20 mm una de la otra, su espina terminal de color gris o marrón de 2-4 cm de largo.

Las inflorescencias paniculada de 2-4 m de altura con un eje robusto y succulento, 8-10 ramas mide 65-96 mm de largo y 65-96 mm de largo, cm largo, aplanados adaxialmente, insertados a la mitad o en el tercer cuarto superior del pedúnculo color verde y púrpura, las brácteas del este pedúnculo son lanceoladas y triangulares de 10-25 cm de largo, flores carnosas, con un tubo polínico ancho y estambres divergentes, crecen de manera lateral y horizontal ascendente, la panícula con 35-75 flores sésiles en racimos erectos contiene botones florales de color rojo púrpura, que abren desde la base de la inflorescencia y cada flor mide 610 cm de largo, su perianto es amarillo y se torna rojizo especialmente al marchitarse, el tubo es erecto amarillo y en forma de embudo de aproximadamente 12-19 x 15-22 mm, lóbulos erectos desiguales de 17-40 mm de largo con tépalo externo más largo, estambres de 20-35 mm de largo unidos desde el centro del perianto, anteras amarilla de 20-35 mm de largo, ovario ínfero de 30-50 mm de largo y 6-15 mm de ancho. Su fruto tiene forma de cápsula pediculadas corta de ovoide a oblongas de 5-7 cm de largo, triloculares con semillas blancas (vanas) y negras en su madurez de haber sido polinizadas (viables), suelen ser aplanadas rodeadas con un ala corta de 4-7 mm largo y con disposición en hilera (Vanderplank, 2017).

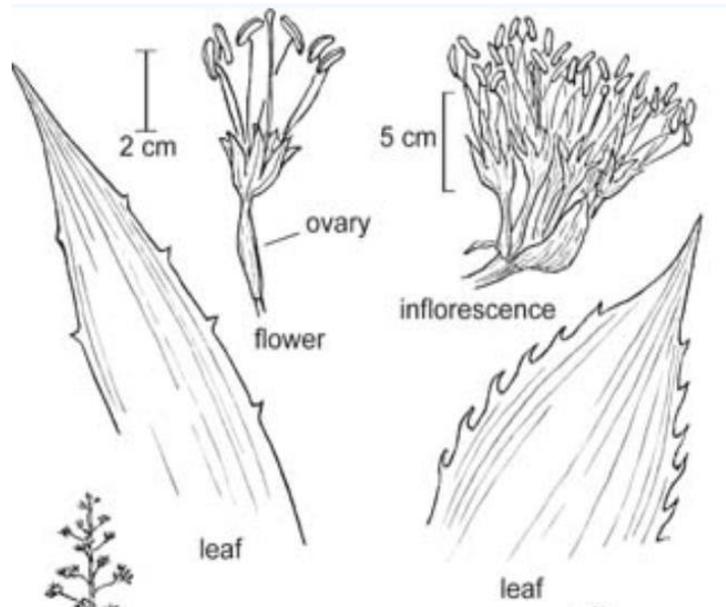


Figura 2. Ilustración botánica del *Agave shawii*. Derechos Universidad de California EUA.

Su floración en EUA se registra a finales de verano principios de invierno y veranootoño en Baja California, México, esta floración se presenta una sola vez en su vida y sucede entre los 20-30 años, para ello la planta requiere de un alto gasto de energético, elongación de tallo y producción de inflorescencia, por lo que después de la planta muere (monocárpia) (Gentry, 1978).



Figura 3. Agave de la costa *Agave shawii* Engelm. Inflorescencia viva (a); Roseta múltiple (b); Espinas (c).

2.3. Diferencias entre subespecies *shawii*.

A. shawii shawii se desarrolla en el ambiente costero del Noroeste del Pacífico de Baja California que cuenta con nieblas matutinas, temperaturas altas y corrientes de aire fresco, a diferencia del hábitat árido en que se desarrolla *A. shawii goldmaniana* adentrado al desierto donde los vientos que entran de la costa ya han elevado su temperatura, bajado la presión y evaporado la humedad. Esto ha estimulado la modificación de su morfología como respuesta a las presiones ambientales, marcando así diferencias en forma y tamaño de su inflorescencia y roseta (Vanderplank, 2014). En campo es común confundir las subespecies por su gran parecido vegetativo, más aún en las zonas de transición entre poblaciones, donde es muy probables que existan hibridaciones. Esto deja claro que la única manera de clasificarlas certeramente siempre será a través de su inflorescencia viva o seca (Vanderplank, 2017).



Figura 4. Diferencias entre subespecies de *A. shawii*. Inflorescencia de *A. shawii goldmaniana* (a); Inflorescencia de *A. shawii goldmaniana* (b).

2.3.1. Subespecie *A. shawii shawii* E.

Posee una panícula tan alta como ancha, laterales de 8 a 15, hojas cortas de 20-40 cm de corto acuminado, relación largo-ancho de 2.5:1 a 3.5:1, la cual tiene forma de corona redondeada con brácteas subyacentes, succulentas y grandes, de color rojo a púrpura (Webb & Starr, 2015) (Figura 4). La característica clave para diferenciar las inflorescencias de estas subespecies es la parte superior redondea, igual o más ancha que alta y compacta, de aspecto cuadrado como respuesta adaptativa a los fuertes vientos costeros (Vanderplank, 2017).



Figura 5. Inflorescencia de *A. shawii shawii* E. de forma cerrada y compacta (Vanderplank, 2007).

2.3.2 Subespecie *A. shawii golmaniana* T.

Cuenta con una panícula más alta que ancha, laterales de 20-30; hojas más largas de 40-60 cm de longitud, con un acuminado largo, relación largo-ancho 4:1 (Figura 5). Gentry en 1978 reportó una considerable variabilidad en las hojas lanceoladas, describiendo hasta cinco formas de ellas para esta subespecie, lo que indica un rango de variación vegetativa, estas son de color verde brillante y verde grisáceo (Webb & Starr, 2015). Su inflorescencia abierta es más alta que ancha con aspecto piramidal que permite un buen crecimiento floral y su fácil polinización (Vanderplank, 2017).



Figura 6. Inflorescencia de *A. shawii golmaniana* T. (Tomada de sitio web Conabio, 2019).

2.4. Sinonimia

Agave orcuttiana Trelease y *Agave pachyacantha* Trelease (Webb & Starr, 2015).

2.5. Taxonomía del *Agave shawii*

Reino	Plantae
Subreino	Viriplantae
Infrareino	Streptophyta
Superdivisión	Embriophyta
Filo	Tracheophyta
Subfilo	Angiospermae
Clase	Liliopsida
Superorden	Lilianaes
Orden	Aspargales
Familia	Aspargaceae

Subfamilia	Agavoideae
Género	Agave
Sección	<i>Agave Umbelliflorae</i> (Gentry, 1978).
Especie	<i>Agave shawi</i> Engelmann
Subespecie	<i>A. shawi</i> subespecie <i>shawii</i> E. <i>A. shawi</i> subespecie <i>goldmaniana</i> Trelease.

Tabla 1. Jerarquía taxonómica *Agave shawii* Engelmann. Sistema Integrado de Información Taxonómica (SIIT).

2.6. Origen y distribución *A. shawii*.

Los especímenes de esta especie prevalecen en clima mediterráneo con veranos secos y calurosos, inviernos fríos y húmedos con marcada influencia de lluvias invernales, así como nieblas todo el año (Vanderplank, 2011). Esta zona concentra riqueza y endemismo, posee numerosas especies vegetales nativas y raras (Vanderplank, 2014), cuenta con múltiples microclimas dentro del denominado Desierto Costero de Niebla, ubicados únicamente en Baja California, que sirven de corredor para las corrientes de viento que transportan energía y nutrientes desde el fondo marino. La corriente marina californiana es afamada por su fertilidad de ecosistemas marinos, que contrasta con los desiertos en tierra, debido a que la atmosfera húmeda que acarrear al entrar en la costa se va perdiendo poco a poco en el caluroso desierto, dejando a lo largo solo un poco de humedad oceánica en forma de niebla del que depende la vida del desierto (Vanderplank, 2019). La flora local se desarrollado en la península desde hace 15,000 años, cuando las glaciaciones del norte de América comenzaron a retirarse y la provincia florística comenzó a crecer y la península se separo del continente, todas las especies refugiadas comenzaron a divergir de su tipo ancestral luciendo diferentes a su predecesor en debido a procesos de divergencia y especiación (Stallcup, 2015). La vegetación encontrada en el desierto de niebla es denominada tuna o matorral costero (Castro-Palafox, 2016) matorral xerofito costero (Espejel *et. al.* 2017),

matorral suculento rosetófilo de la costa (Stallcup, 2015), o matorral costero de niebla (Gentry, 1982).

El *A. shawii* es la planta de uso humano más antigua en Baja California y la que más predomina en la costa noreste del mismo estado. Está crece en las estrechas bandas de vegetación a la orilla de la costa, acantilados y adentrándose al desierto. Logra desarrollarse tanto en roca ígnea como sedimentaria, en los rodales densos y los aluviones graníticos profundos de la Sierra Asamblea y Punta Prieta, Baja California (Vanderplank, 2019). *A. shawii shawii* se reporta al Noroeste desde Baja California unos 32 km al sur de San Diego en la frontera entre EUA, su hábitat es puramente costero, dependiente de niebla y con temperaturas frescas por los vientos marinos (Webb & Starr, 2015; Vanderplank, 2014).

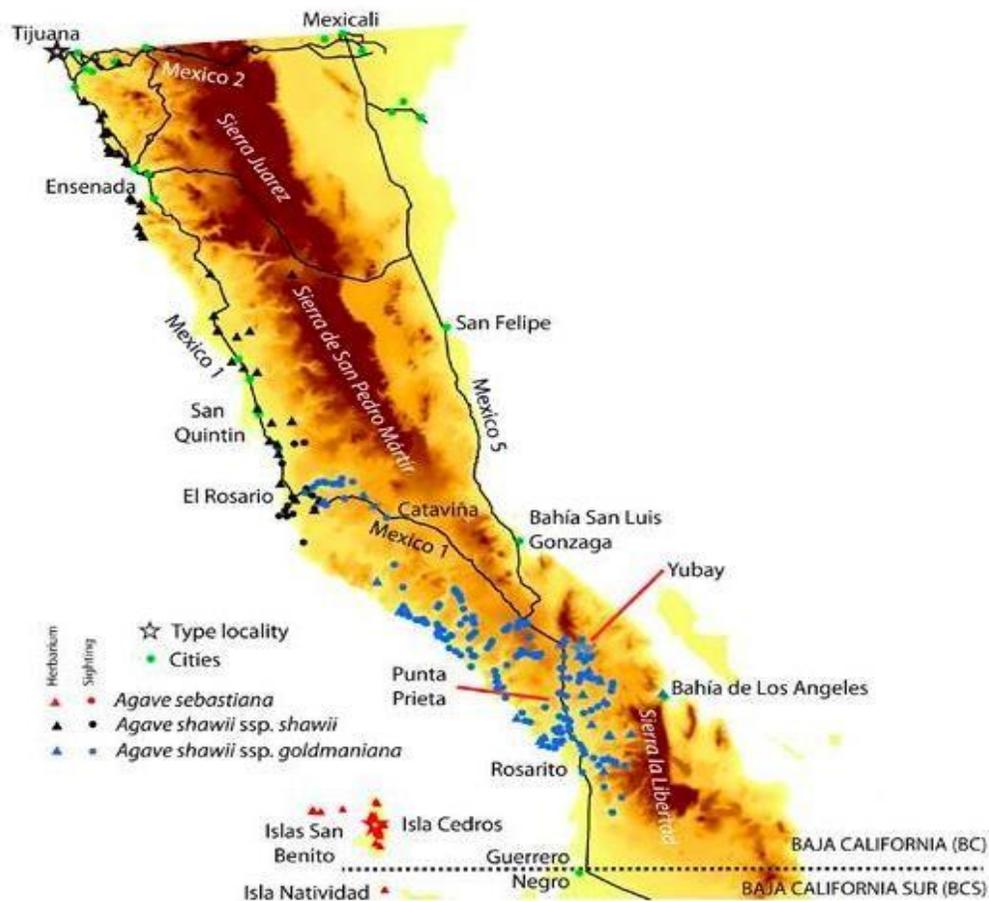


Figura 7. Distribución de *A. shawii* subespecies *shawii* E. y *goldmaniana* T. (Webb & Starr, 2015).

El *A. shawii goldmaniana* habita específicamente al este y el extremo sur de El Rosario, al interior de la península donde es más árido, en centro-norte de la Península de Baja California; al oeste de la división peninsular Tinaja Yubay, B.C.; el Este del Rosario y Punta Prieta, con distribución continua e independiente de la geología y tipo de suelo (Figura 7) (Webb & Starr, 2015).

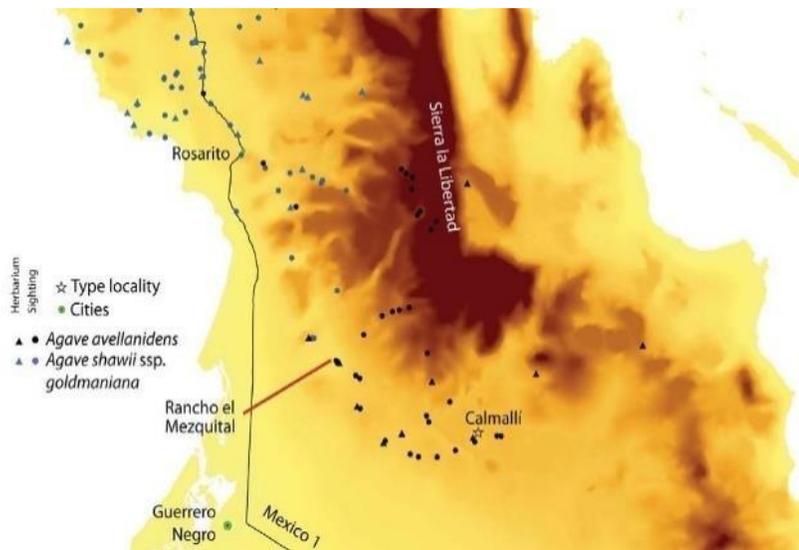


Figura 8. Distribución de *A. shawii goldmaniana* Trelease (Webb & Starr, 2015).

2.7. Estado actual de conservación.

Los ecosistemas mediterráneos de Baja California albergan una gran diversidad biológica y vegetación única de especies esclerófilas, malacófilas-caducifolias, herbáceas, geófilas, algunas especies aromáticas de importancia cultural y una variedad de especies suculentas que le confieren singularidad respecto a las otras zonas mediterráneas del mundo, sin embargo la gran mayoría de trabajos sobre matorral costero pertenecen a Estados Unidos (Castro-Palafox, 2016) ya que en esta región comienza la región fitogeográfica denominada como provincia florística de California (CFP) que se extiende desde el Sur de Oregón hasta el Norte de Baja California, zona de gran importancia ecológica a la que destinan esfuerzos y presupuesto para su cuidado. En México pese a contar por lo menos con 2,612 de

plantas vasculares endémicas (Vanderplank, 2014) no se cuenta con ningún estudio de monitorización o plan de conservación específico para esta zona y mucho menos para la especie de nuestro interés. El *Agave shawii* es la suculenta más grande y representativas de la zona, con registros de uso alimenticio desde hace 14,000 años (Espejel *et al*, 2017). Brindan numerosos servicios ambientales en los ecosistemas en los que habitan, son un recurso alimenticio para la fauna natural, fijan suelos arenosos evitando la erosión y capturan carbono, enriqueciendo los ambientes áridos suelos pobres y alta tolerancia a la sequía (Cervera Herrera *et. al.*, 2018). La región mediterránea ha sido dañada debido al cambio de uso de suelo, el crecimiento urbano, el crecimiento agrícola y el constante desarrollo turístico de la zona (Vanderplank, 2018), y aunque la actual presión humana sobre los ecosistemas de la flora mediterránea es evidente, los programas de conservación actuales se han dirigido principalmente a la zona Sur del Estado, que coincide con la baja densidad poblacional o ausencia de ella (zona Reserva de la Biosfera el Vizcaíno y la reserva de la Biosfera Valle de los Sirios UNESCO) (Castro-Palafox, 2016) dejando fuera de protección la importante zona mediterránea donde habitan los agaves nativos que requieren un alta atención.

2.8. Propagación de *Agave shawii*

2.8.1. Reproducción asexual

A. shawii es fácilmente propagada por vía asexual, formando hijuelos del rizoma o bulbillos que son clones de la planta madre, muchas plantas sobreviven el trasplante y reintroducción a otros sitios, pero requiere de amplios espacios destinados a ello y recursos para el pago de la mano de obra para su laboreo y mantenimiento (Vanderplank, 2014).

2.8.2. Reproducción sexual

En esta especie se han encontrado problemas para su reproducción por vía sexual, debido principalmente a que la planta tarda en florecer aproximadamente de 20 a 30 años y solo lo hará una vez en todo su ciclo biológico (Gentry, 1978). La inflorescencia suele usarse como alimento de ganado lo que representa la muerte del espécimen sin oportunidad de reproducción. Barrón Palomares (2018) refiere la quiropterofilia como una valiosa condición de los agaves desérticos para atraer a los murciélagos y asegurar su polinización, para ello producen abundante polen y néctar diluido, de predominio nocturno; esta característica también es aprovechada por diversas especies de la zona tales como insectos, mariposas nocturnas, pájaros y otros. Los agaves son fundamentales para el desarrollo y equilibrio de los ecosistemas de la región, pero el cambio de uso de suelo ha segmentado su hábitat dejando algunas en aislamiento dificultando la polinización cruzada (Vanderplank, 2017). Aunque la monocárpica en los agaves es posible y sus flores pueden ser auto compatibles (autopolinización), existen estudios que registran problemas como la depresión por endogamia, evidenciada por la pérdida de viabilidad y baja tasa de germinación (Vanderplank, 2014).

2.9. Sistemas de propagación *in vitro* de plantas

2.9.1. Descripción general y bases del Cultivo de Tejidos Vegetales

El Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV) involucra diversas técnicas de cultivo aplicadas a diferentes tipos de tejidos u órganos (hojas, tallos, raíces, etc.) llamados explantes, también se puede usar partes más pequeñas como células y los protoplastos (células desprovistas de su pared celular) (George *et al.*, 2008). De acuerdo con Alcántara- Cortes *et al.* (2017) el cultivo de tejidos es el aislamiento de un órgano o tejido vegetal, en un medio específico que cuenta con los nutrientes necesarios y las condiciones óptimas, estos deben ser estériles y mantenerse en condiciones ambientales controladas, de esta manera se establece un microambiente donde se expresen las características totipotenciales y fenotípicas estables de la especie a trabajar maximizando su desarrollo (Segretín, 2006). La

base del cultivo *in vitro* es la totipotencia celular que permite el desarrollo de un nuevo ser biológico a partir de una célula o varias células, logrando su crecimiento y desarrollo hasta la obtención de un individuo completo biológicamente funcional, sin la interferencia de células sexuales o gametos, esta cualidad está presente en las células jóvenes no diferenciadas o meristemáticas en diversos órganos de la planta que cuentan con capacidad de diferenciarse para cumplir una función específica dentro del organismo del cual forma parte (célula epidérmica, de conducción, etc.) y a su vez los tejidos nuevos se organizan constantemente hasta construir un organismo completo (Segretín 2006), esta capacidad esta latente en cada célula de la planta (George *et al*, 2008).

2.9.2. Micropropagación.

Las técnicas de micropropagación permiten la obtención de un número ilimitado de plantas libres de fitopatógenos (bacterias, hongos, nematodos y virus) en un espacio mínimo y en un tiempo relativamente corto (Domínguez-Rosales *et al.*, 2008). El uso y aplicación de estas técnicas actualmente permiten la propagación masiva de plantas difíciles de propagar por otros medios, propagación masiva de plantas en vías de extinción, clonación de individuos de características agronómicas deseables durante todo el año, obtención de plantas libres de virus, producción de semillas sintéticas, conservación de germoplasma, obtención de metabolitos secundarios, producción de nuevos híbridos, mejora genética de plantas, germinación de semillas, producción de haploides y diversos estudios fisiológicos (Segretín, 2006). De la micropropagación se obtienen microplantas iguales a la planta madre, estas pueden lograrse por tres vías diferentes: a) Partiendo de brotes preexistentes o brotes primordiales (meristemas) que se estimulan para proliferar (brotar); b) Partiendo de callos que se estimulan para formar nuevos brotes y c) A través de la formación de embriones somáticos semejantes a los embriones de semilla que pueden convertirse en plántulas, proceso llamado embriogénesis somática. Estas plantas miniatura después serán inducidas a la producción de raíces para su aclimatación y trasplantadas para su vida *ex vitro*. Aunque teóricamente las células

vegetales o los órganos de cualquier planta pueden clonarse y producir cantidades grandes, donde toda la población tendrá la constitución genética que el progenitor, pero las técnicas actuales de CTV aun no pueden garantizarlo y en ocasiones surgen algunas irregularidades o variantes somaclonales (George *et al.*, 2008).

2.9.3. Explante.

Los pequeños pedazos de tejido que se utilizan o cultivan se llaman explantes, pueden ser de diferentes tipos y de diferentes partes de la planta madre, dependiendo del objetivo de investigación y la especie. La elección correcta del material de explante tiene un efecto importante en el cultivo de tejidos (Bhojwani y Dantu, 2013) por lo que se deben elegir cuidadosamente, ser tratados con productos desinfectantes y manipulados con sumo cuidado antes de establecerse en el medio para contener microorganismos y/o plagas de superficie o algunos sistémicos provenientes de la planta madre (George *et al.*, 2008), cuidar además de hacer cortes precisos que no dejen daño innecesario al tejido para evitar su rápida oxidación.

2.9.4. Asepsia

Es importante la asepsia en todo el proceso de cultivo de tejidos, ya que al manejar medio con nutrientes pueden ser una oportunidad para los patógenos de proliferar y ganar espacio a los explantes que tienen un crecimiento más lento, debido a esto todos los instrumentos, recipientes y superficies donde se trabaje deben ser esterilizados con vapor de agua (Hurtado y Merino, 1997). Para transferir el material vegetal y dejarlo libre de patógenos se necesita un especial cuidado, trabajar en salas especiales con ambientes aislados, sin corrientes de aires y de preferencia que tenga campana de flujo laminar, todo con el fin de excluir a los microorganismos del proceso ya que son altamente competitivos y ponen en riesgo el material vegetal que crece *in vitro* (George, 2008).

2.9.5. Medio de cultivo

El material vegetal en condiciones *in vitro* solo crecerá si se proporciona un medio especializado que provea lo necesario (George *et al*, 2008), gran parte éxito del CTV depende de la elección de un medio nutritivo adecuado, la elección de un tejido viable (explante) y un buen control del medio circundante (Hurtado y Merino, 1997). El medio de cultivo debe ser parecido al suelo en que la planta suele crecer en condiciones naturales y contener los nutrientes necesarios para su crecimiento el medio de cultivo más usado es el Murashige and Skoog (1962) que contiene una solución de componentes esenciales que satisfacen los requerimientos nutricionales básicos, como sales minerales que suministran elementos mayores y menores necesarios para el crecimiento de plantas; una fuente carbono que provee energía (generalmente sacarosa), cumpliendo así con lo necesario para la nutrición del tejido vegetal, a este se pueden añadir otros componentes, llamados opcionales por no ser indispensables para la vida del explante, pero que determinan en gran medida la respuesta del tejido, un ejemplo de estos son las vitaminas y varios aminoácidos. Algunos autores engloban en estos a los Reguladores de Crecimiento Vegetal (RCV). Es importante recalcar que el tipo de medio a utilizar varía de acuerdo con los requerimientos específicos de la especie que se trabajar y el objetivo del experimento (Bhojwani & Dantu, 2013); no existe un medio universal que desarrolle todos los tipos de células o explantes por lo que debe buscarse el ideal para el tipo de tejido y especie a trabajar, de no funcionar deberá desarrollar o adaptar otro basándose en prueba y error, cambiando tantas veces sea necesario los componentes y reguladores de crecimiento hasta obtener la respuesta esperada en el explante, ya sea inducción de callos, embriogénesis somática, cultivo de anteras o raíces (Smith, 2002).

2.9.6. Gelificante.

Para solidificar el medio de cultivo se les agrega gelificantes que lo mantenga estático al largo plazo, que se pueda mantener en frascos pequeños de vidrio y que ocupen poco espacio. La gelificación del medio lo solidifica, sirviendo de anclaje y sostén de los explantes, es el más indicado en el cultivo de callos, órganos vegetales y mantenimiento a largo plazo (George *et al*, 2008). Se puede aplicar en pequeñas cantidades y gelificarlo ligeramente dejando el medio semisólido permitiendo que el explante permanezca aireado. Un gelificante debe ser inerte, resistir la esterilización en autoclave y ser líquido cuando esté caliente para que el medio pueda dispensarse en recipientes de cultivo en las cantidades deseadas (Bhojwani & Dantu, 2013). El material que más se utilizado es el Agar que se obtiene de algas rojas, especialmente *Gelidium amansii*, es un polisacárido de alto peso molecular (construido con moléculas de galactosa) capaces de unir el agua a 45 °C. Se utiliza en concentraciones de 0.8-1.0% (p / v), dependiendo la firmeza que requiera el estudio (George *et al.*, 2008).

2.9.7. pH del medio de cultivo.

El pH del medio influye altamente en la absorción y disponibilidad de los ingredientes del medio para el tejido vegetal, la solubilidad de las sales y la eficacia gelificante del agar. El pH del medio generalmente se establece en 5,8 debido a que en este pH todas las sales se mantienen en una forma casi tamponada (pH estable).

A menudo un pH superior a 6.0 proporciona un medio duro y un pH inferior a 5.0 no permite una gelificación satisfactoria del agar debido a su hidrólisis durante el autoclavado ya que el pH del medio generalmente cae en 0.3-0.5 unidades después de que ser esterilizado en autoclave. El pH a lo largo del período de cultivo ira cambiando por la oxidación y la absorción diferencial de iones como NH_4^+ y NO_3^- además de la secreción de sustancias por el tejido en crecimiento (Bhojwani & Dantu, 2013).

2.9.8. Reguladores de Crecimiento Vegetal.

Al inicio de su descubrimiento fueron llamados fitohormonas, pero actualmente son llamados Reguladores de Crecimiento Vegetal (RCV), estos compuestos orgánicos que a muy baja concentración causan una respuesta fisiológica capaz de modificar el crecimiento o desarrollo de las plantas, se sintetizan en alguna parte de la planta y se traslocan a otra para su utilización (George *et al.*, 2008). Estas sustancias de crecimiento vegetal son consideradas parte integral del medio de cultivo por que su función reguladora y promotora de morfogénesis es indispensable en el cultivo de tejidos (Bhojwani & Dantu, 2013). Estos RCV se clasifican según sus estructura química y efecto fisiológico, clasificándose en 5 grupos: auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico y el etileno, existen otras sustancias que pueden ser consideradas RCV como los jasmonatos, poliaminas, brassinoesteroides, ácido salicílico y estrigolactonas (Pérez-Molphe, *et al.* 2019).

Auxinas viene del griego *auxein* que significa alargamiento o crecimiento, son sustancias orgánicas de bajo peso molecular, pH superior a 6.0 (George *et al* 2008), en su estructura tiene un grupo carboxilo unido a otro grupo carboxilo (por lo general -CH₂-) unido a su vez a un anillo aromático (Salisbury y Ross 1995). Las auxinas son capaces de controlan los procesos básicos celulares como división y elongación celular, las hay de origen natural o sintético dependiendo de si surgen de manera natural en la planta o han son replicadas por el hombre, en forma de un análogo sintético que aún con estructuras diferentes tiene acción similar a nivel celular (George *et al* 2008).

Su importancia radica en su participación del alargamiento de tallos y entrenudos, el tropismo, la dominancia apical, la abscisión y el enraizamiento de la planta, por lo que en CTV se utilizan para inducir la división celular, la citodiferenciación, diferenciación organogénica y embriogénica. Pueden ser utilizadas también en bajas concentraciones para favorecer el inicio de la raíz, mientras que a una alta concentración puede inducir la formación de callo (Bhojwani y Dantu, 2013).

Auxina	Origen
Ácido indol-3-acético (IAA)	Natural
Ácido indol-3-butírico (IBA)	Natural
Ácido a-naftaleneacético (NAA)	Sintética
Ácido 2,4-diclororofenoxiacético (2,4-D)	Sintética
Ácido para-clorofenoxiacético (p-CPA)	Sintética
Ácido nafloxiacético (NOA)	Sintética
2,4,5-triclorofenoxiacético (2,4,5-T)	Sintética
4-amino-ácido 5,6- tricloropiridin-2-carboxílico (picloram)	Sintética
Ácido 3,6-dicloro-o-anisínico (dicamba)	Sintética

Tabla 2. Auxinas utilizadas en Cultivo de Tejidos Vegetales y su origen.

Las auxinas naturales IBA, NAA e IAA usadas individualmente se utilizan para enraizamiento, pero si se unen con una interacción pueden favorecer la proliferación de brotes y en diferenciación traqueal en cultivos de células y callos; las auxinas artificiales como 2,4-D y 2,4,5-T son muy efectivas para la inducción y el crecimiento de callos, así como la inducción de la embriogénesis somática. Se ha reportado el uso de dicamba en plantas monocotiledóneas, mientras que el picloram ha sido eficaz principalmente para las legumbres (Bhojwani y Dantu, 2013). Otras sustancias como el ácido 4-cloroindolacético (4-cloroIAA), el ácido fenilacético (PAA) y el ácido indolbutírico (IBA), con estructura similar, pero sin grupo carboxilo precursoras de las auxinas pueden también inducir procesos similares (Salisbury y Ross 1995).

Citocininas son nombradas así por promover la citogénesis (división celular), también son un grupo importante de hormonas vegetales, las naturales son derivadas de la adenina sustituida con N6. Se encuentra en las plantas como

nucleósidos o nucleótidos y su posible su sitio de síntesis es la raíz (GarrigaCarballo 2010).

Están relacionadas con la división celular, la modificación dominancia apical y la diferencia de brotes (Bhojwani y Dantu, 2013), particularmente estimula la síntesis de proteína y participa en el control del ciclo celular, promueve la maduración del cloroplasto y retrasa la senescencia de las hojas desprendidas (George *et al*, 2008). En cultivo de tejidos se adicionan al medio de cultivo para desencadenar la división celular e inducir la diferenciación de órganos y brotes adventicios, así como la proliferación de brotes de yemas axilares, modificando la dominancia apical (Bhojwani y Dantu, 2013). La citocinina más eficiente y comúnmente utilizada en el cultivo de tejidos vegetales es BA en rangos de 1 a10 M. Una nueva clase de citocininas aromáticas naturales muy activas son las topolinas que tienen un efecto positivo en la alta tasa de multiplicación de brotes, reducción de anomalías fisiológicas, un mejor enraizamiento y aclimatación. Las citocininas más comunes son la zeatina, la isopentiladenina (2iP), el ribósido de zeatina y la meta-topolina (MT), estas citocininas naturales se caracterizan por poseer un esqueleto de adenina con una cadena lateral isoprenoide. Las citocininas sintéticas son la benciladenina (BA) y cinetina, que son muy utilizadas en el cultivo de tejidos vegetales (Garriga Carballo, 2010).

Citocinina	Origen
Cinetina (6-furfurilamino) purina	Sintética
BA [6(bencilamino) purina]	Sintética
2iP [(2isopentenil) -adenina o 6- (c, c-dimetilalilamino) purina]	Natural
Zeatina [6- (4-hidroxi-3metil but-2-enil amino) purina]	Natural
Tidiazurón (TDZ)	Sintéticas
Urea sustituida con difenina ¹	
Meta-topolina o mT [6- (3-hidroxi-bencilamino) -purina] (MT)	Natural

Tabla 3. Citocininas utilizadas en Cultivo de Tejidos Vegetales y su origen.

2.9.9. Aislamiento e incubación.

La sala de incubación debe contener gabinetes para el aislamiento de los cultivos, debe ser libre de corrientes de aire y estar separada del laboratorio en general; esta área debe estar destinada al crecimiento y almacenamiento de los contenedores (*vitro*), para ello debe contar con estantes o anaqueles para mantener los cultivos organizados, en esta sala se controlaran todos los agentes físicos como la iluminación, temperatura y humedad, factores claves para el desarrollo y tasa de crecimiento (Hurtado & Merino, 1997).

2.9.10. Etapas de micropropagación.

Las técnicas de multiplicación mediante cultivo han cambiado y mejorado a través del tiempo gracias a múltiples autores y sus investigaciones, actualmente están bien definidas y organizadas para llevar a cabo la micropropagación en cuatro fases que tiene requerimientos y problemas específicos (Bhojwani y Dantu, 2013). Estos pasos son descritos a continuación según George *et al*, 2008 y Bhojwani y Dantu, 2013.

Etapas 0 Selección y preparación de la planta madre.

Es importante antes de comenzar la micropropagación prever y evitar problemas durante el proceso, teniendo especial cuidado en la selección de la planta, esta debe ser sana y contener las características que deseamos preservar. Después de la selección del mejor material para reproducir, se debe detectar y eliminar enfermedades preexistentes y proveer de tratamientos previos que permitan minimizar el peligro de sufrir contaminación y enfermedades durante las siguientes etapas de la propagación.

Etapas I Establecimiento de cultivo.

En esta parte se establecer de manera aséptica el material seleccionado del que se obtendrá el explante y será transferido a un medio libre de contaminantes, para su

desarrollo. La etapa será exitosa si un número considerable de explante sobrevive y sigue creciendo.

Etapa II Multiplicación de brotes.

El objetivo de esta etapa es la producción, inducir al explante a producir y multiplicar brotes para que estos puedan utilizarse en ciclos posteriores (subcultivos) para aumentar el número de plántulas.

Etapa III Enraizamiento.

Las plántulas obtenidas de etapas anteriores no son capaces de vivir por si mismas es tierra o sustrato, por lo que deben ser preparadas para hacerlo durante esta etapa. Algunas plántulas forman raíces adventicias durante los anteriores procesos, pero generalmente es necesario utilizar tratamientos o métodos de enraizamiento. Trasplantando las plantas a un sustrato nuevo con o sin RCV según el requerimiento de cada especie para que produzcan raíces.

Etapa IV Transferencia y aclimatación de la plántula al medio ambiente.

Los métodos para transferir la planta de un ambiente *in vitro* a uno *ex vitro* deben ser de extremo cuidado ya que se puede tener pérdidas significativas en la transición del material propagado, esto se debe a que las plántulas tenían un ambiente con alta humedad y moderada intensidad luminosa, sin permitir que el epitelio foliar se desarrollara del todo por lo que carece de ceras para proteger a la planta del estrés abiótico, sus estomas que son incapaces de completar el cierre y apertura normal por lo que la pérdida de agua sería rápida; a esto se suman las alteraciones químicas de la planta *in vitro* que no producen metabolitos secundarios de defensa al estrés medio ambiental. Debido a que estas plántulas están habituadas a ser provistas de todo debemos prepararlas para que se habitúen a producir sus propios alimentos. Se deben esperar algunos días para que logren hacerlo, se comienza abriendo los frascos un poco para que se vaya perdiendo la alta humedad del microambiente *in vitro*, hasta eliminarlas por completo, después deben sacarse del medio y lavar las raíces con agua destilada para eliminar por completo el medio de cultivo sólido, luego se siembran individualmente en un contenedor que contenga

un sustrato de turba y perlita estos se mantendrán varios días en una bolsa plástica en invernadero regando diariamente para mantener alta humedad e intensidad luminosa reducida.

2.9.11. Cultivo de Tejidos Vegetales en Agaves

Atendiendo la importancia de los agaves han ido surgiendo diferentes estudios utilizando técnicas especializadas como el CTV dando alentadores resultados, García-Barrón (2017) lo atribuye al aumento de plantaciones comerciales de *Agave* en todo el mundo que a su vez ha incrementado la demanda de plántulas sanas. Si bien las plantas de agave pueden reproducirse sexual y asexualmente de manera natural, puede tardar mucho tiempo antes que las plantas alcancen la madurez reproductiva, además de obtener poca cantidad como en el caso de la reproducción por medio de semilla.

Las técnicas de cultivo de tejidos vegetales han dado una importante alternativa para la producción de plantas sanas y de calidad en gran cantidad y en espacios reducidos en tiempos relativamente cortos (George *et al*, 2008). Además estas técnicas traen diferentes ventajas sobre los métodos convencionales como conservar las características genotípicas del material inicial a las plantas hijas (clones), controlar las condiciones y respuestas en cada etapa durante todo el proceso permitiendo la producción constante sin la afectación de los factores ambientales externos (Delgado-Lemus, 2014).

Algunos estudios realizados sobre *Agave* y propagación *in vitro* de 1997 a 2007, fueron recopilados en una tabla por Domínguez-Rosales *et al.* (2008). Este tipo de cuadro resumen se tomó como base y se le sumaron los trabajos más actuales sobre micropropagación de Agaves (tabla 4). Revisar los diferentes estudios, cuales medios de cultivo utilizaron así como la cantidad de RCV utilizada para la generación de brotes a partir de organogénesis directa en los diferentes especies de agaves, son datos que sin duda nos ayudan a predecir como se comportara *A. shawii*.

Estos estudios son una valiosa plataforma para seguir estudiando este importante género, sin embargo, solo han sido centrados en solo 20 especies que en su gran mayoría son de interés industrial, relegando a más de 100 especies de gran importancia ecológica y cultural que corren riesgo de perderse por diversos factores incluyendo el saqueo y sobreexplotación (Aguilar *et al*, 2018). Y si bien existen ya varios protocolos sobre micropropagación de Agaves todos ellos demuestran que la cada especie tiene un requerimiento diferente a las otras. Por lo que se debe seguir generando conocimiento para el manejo y conservación del género.

Espece de Agave	Respuesta	Medio de cultivo + RCV mgL ⁻¹	Referencia
<i>A. sisalana</i>	Generación de brotes a partir de meristemos basales de tallo.	MS o SH + 5.0 BA	Das, 1992.
<i>A. sisalana</i>	Generación de brotes a partir de meristemos basales de tallo y organogénesis indirecta.	MS / SH / Gamborg y White + BA, CIN, NAA, IAA y 2,4-D solos o combinados.	Nikam, 1997
<i>A. parrasana</i>	Generación de brotes a partir de meristemos basales de tallo y organogénesis indirecta.	MS + 3.0, 6.0, 9.0 y 12.0 BA + 0 y 0.01 2,4-D	Santacruz-Ruvalcaba <i>et al.</i> , 1999
<i>A. angustifolia</i>	Generación de brotes a partir de meristemos basales de tallo	MS + 1.0 BA	Enríquez del Valle <i>et al.</i> , 2005
<i>A. salmiana</i>	Generación de brotes a partir de meristemos basales de tallo	MS + 2.0 BA + 0.25 AIA	Silos-Espino <i>et al.</i> , 2007
<i>A. inaequidens</i>	Generación de brotes a partir de meristemos basales de tallo.	MS + 80.0 Sulfato de Adenina (SA)+3.0 BA	Aureoles- Rodríguez <i>et al.</i> , 2008.
<i>A. potatorum</i>	Semilla germinada y Generación de brotes a partir de meristemos basales de tallo.	MS + 1.5 CIN	Domínguez- Rosales <i>et al.</i> , 2008.
<i>A. obscura</i>		MS + 1.0 MT	
<i>A. karwinskii</i>		MS + 1.0 BA	
<i>A. difformis</i>		MS + 2.0 2iP	
<i>A. cupreata</i>		MS + 2.0 BA	
<i>A. salmiana</i>		MS + 0.1 TDZ	
<i>A. peacockii</i>		MS + 1.0 BA	
<i>A. victoria-reginae</i>		MS + 1.0 2iP	
<i>A. potatorum</i>		MS + 3.0 IN	
<i>A. obscura</i>	MS + 0.2 TDZ		
<i>A. difformis</i>	MS + 0.2 TDZ		

<i>A. karwinskii</i>		MS + 1.0 BA	
<i>A. cupreata</i>		MS + 1.5 BA	
<i>A. grijalvensis</i>	Semilla germinada y Generación de brotes a partir de yemas axilares.	MS + 9.0 BA	Sánchez-Urbina <i>et al.</i> , 2008.
<i>A. victoria-reginae</i>	Generación de brotes a partir de yemas axilares.	MS + 0.5 AIB + 0.5 BA.	Ramírez-Malagón <i>et al.</i> , 2008.
<i>A. pigmea</i>		MS + 0.1 AIB + 3.0 BA.	
<i>A. obscura</i>		MS + 0.5 AIB + 1.0 BA.	
<i>A. duranguensis</i>		MS+ 0.001 AIB + 1.0 BA	
<i>A. salmina sub. crassispina</i>		MS (modificado en KNO ₃ 5 µM, NH ₄ NO ₃) + pulsos temporales previos de 1.5 2,4-D + 0.1 2,4-D + 10.0 BA en multiplicación.	
<i>A. tequilana</i>			
<i>A. fourcroydes</i> Lem.	Generación de brotes a partir de meristemos basales de tallo, acelere en ruptura de dormancia en yemas.	MS + 0.5-0.75 TDZ + 1.0 BA + 1.0 AIB	Garriga <i>et al.</i> , 2010
<i>A. tequilana</i> Weber	Generación de brotes a partir de meristemos basales de tallo.	MS + 0.1 AIB + 10.0 KIN	Ángeles-Espino <i>et al.</i> , 2012
<i>A. americana</i>	Generación de brotes a partir de meristemos basales de tallo	0.66 MS + 0.5-1.0 AIB	Miguel Luna <i>et al.</i> , 2013.
<i>A. americana</i>	Generación de brotes a partir de segmento de hoja	MS + 2.7 ANA + 3.0 BA	Chen <i>et al.</i> , 2014.
	Generación de brotes a partir de segmento de hoja.	MS + 3.0 BA	
<i>A. salmiana</i>	Generación de brotes a partir de meristemos basales de tallo	MS + 0.04 2,4-D + 10.0 BA	Puente-Garza, 2015
<i>A. americana var. Oaxacensis.</i>	Generación de brotes a partir de meristemos basales de tallo	MS (100 myo-inositol + 40 g sacarosa) + 6.0 BA	Miguel-Luna <i>et al.</i> , 2015.
<i>A. marmorata</i>	Generación de brotes a partir de meristemos basales de tallo	MS (35 azúcar de caña + 100 myo-inositol, 0.7 Agar + 0.40 tiamina-HCl) + 10.0 BA + 10.0 AIA inducción de brotes 3-10 AIA	Aguilar y Rodríguez de la O, 2018.

Tabla 4. Estudios sobre la propagación de Agaves por medio de multiplicación de meristemos y organogénesis directa.

3. JUSTIFICACIÓN

Los Agaves forman parte de la identidad cultural y biológica de México, dominan los paisajes mexicanos y son de vital importancia en el desarrollo de las zonas áridas y semiáridas de México. El género *agave* es altamente conocido y apreciado en el mundo, en 2006 la UNESCO reconoció al paisaje agavero como patrimonio de la humanidad. Las especies, silvestres o cultivadas, otorgan grandes beneficios económicos, culturales y ecológicos. Su importancia ha trascendido a través de los siglos por sus múltiples beneficios que otorga al hombre americano, usando la planta en su totalidad, desde su raíz hasta la inflorescencia. Actualmente su propagación es por medio de hijuelos (asexual), que es poco eficiente por dar como resultado cultivos con plantas genéticamente idénticas a la madre que con el tiempo favorece problemas por endogamia, esta depresión genética puede ir limitando cada vez su variación genética, a esto se suma el problema constante pérdida anual de muchos agaves por presiones físico-ambientales, biológicas, y la actividad humana.

Es responsabilidad de México como centro de mayor diversidad estudiar y conservar la riqueza del género. El *A. shawii* tiene una subespecie nativa y otra endémica de Baja California, ambas tienen una distribución limitada y varias amenazas a su hábitat natural, por lo que se sugiere el uso de técnicas de cultivo de tejidos como alternativa para propagar y conservar esta especie. El presente trabajo pretende aportar un sistema *in vitro* de multiplicación masiva de *Agave shawii* que genere plantas que puedan ser incorporadas en las actuales colecciones vivas y bancos de germoplasma nacionales.

4. HPÓTESIS

La técnica de propagación *in vitro* es un sistema adecuado para multiplicar masivamente y aclimatar *Agave shawii shawii* y *Agave shawii goldmaniana*, para ello se requiere el uso de reguladores de crecimiento vegetal que favorezcan la brotación.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Establecer un sistema de micropropagación de *Agave shawii* E. subespecie *shawii* y subespecie *goldmaniana*.

5.2. Objetivos particulares

- Evaluar el efecto de diferentes concentraciones de citocininas en la generación de brotes en meristemas laterales de las dos subespecies de interés.
- Evaluar las respuestas morfogénicas de esta especie con adición de auxinas/citocininas.
- Desarrollar un protocolo para la adaptación y transferencia a suelo de las plántulas obtenidas.

6. METODOLOGÍA

El presente estudio se divide en dos etapas con sus respectivos experimentos y los objetivos particulares anteriormente planteados. 1.- Multiplicación de brotes en medio MS y diferentes concentraciones de citocinina 1.0 mg L⁻¹ de BA en *A. shawii shawii* y *A. shawii goldmaniana*, así como 2.0 y 3.0 mg L⁻¹ en *A. shawii goldmaniana*; 2.- Respuestas morfogénicas de los explantes *in vitro* al utilizar citocinina en combinación con auxina en el medio MS en diferentes tipos de explante de *A. shawii goldmaniana*; finalmente las plántulas obtenidas fueron aclimatadas y trasplantadas para su vida *ex vitro*.

El experimento se estableció bajo un diseño completamente al azar. La unidad experimental fue un frasco con un explante y hubo 9,12 y 4 repeticiones de cada tratamiento, dando el total de 25 frascos. En el análisis estadístico primero se calculó la media o promedio y la mediana para conocer la tendencia general de los datos, así como la desviación estándar que determinó la dispersión de estos. Como el tamaño de las muestras a comparar era diferente para cada tratamiento y contenía valores con distribución sesgada, se optó por la prueba de Kruskal-Wallis que es la alternativa no paramétrica al análisis de varianza para buscar significancia en el promedio de brotes por explante en los tratamientos utilizados. Para validar la aplicación de esta prueba se comprobó primero que las muestras no tenían una distribución normal, después se hizo una corrección de significancia con el método de Holm que terminó de adjudicar la significancia a cada tratamiento para después graficarse. Este análisis de resultados se realizó con la ayuda del programa estadístico R Studio□.

6.1. Multiplicación de brotes en medio MS y diferentes concentraciones de citocinina.

6.1.1. Material vegetal

El material vegetal fue proporcionado por el Banco de germoplasma del laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad Autónoma de Aguascalientes; las dos subespecies proporcionadas fueron *A. shawii shawii* y de *A. shawii goldmaniana*, estas habían sido germinadas *in vitro* sobre un medio de cultivo Murashige & Skoog (1962) y permanecían en condiciones de incubación.

6.1.2 Medio de cultivo

El medio de cultivo utilizado fue la formulación de (Murashige y Skoog 1962) al 100%, medio de cultivo clásico que contiene elementos inorgánicos micro y macronutrientes y que según la literatura ha sido utilizado en Agaves por más de 30 años (tabla 5), este medio fue suplementado con 30 g L⁻¹ de sacarosa, 8 g L⁻¹ de agar como gelificante, además se adicionó con 1.0, 2.0 y 3.0 mg L⁻¹ de [6 (bencilamino) purina] (BA).

A. Nitratos	Mg/L
Nitrato de amonio (NH ₄ NO ₃)	1650
Nitrato de potasio (KNO ₃)	1900
B. Sulfatos	
Sulfato de magnesio (MgSO ₄ .7H ₂ O)	370
Sulfato de manganeso (MnSO ₄ .4H ₂ O)	22.3
Sulfato de zinc (ZnSO ₄ .4H ₂ O)	8.6
Sulfato cúprico (CuSO ₄ .5H ₂ O)	0.025
C. Halógeno	
Cloruro de calcio (CaCl ₂ .2H ₂ O)	440
Yoduro de potasio (KI)	0.83
Cloruro de cobalto (CoCl ₂ .6H ₂ O)	0.025
D. PO₄, BO₃, MoO₄	
Fosfato de potasio (KH ₂ PO ₄)	170
Ácido bórico (H ₃ BO ₃)	6.2
Molibdeno de sodio (Na ₂ MoO ₄ .7H ₂ O)	0.25
E. Na, Fe, EDTA	
Sulfato ferroso (FeSO ₄ .7H ₂ O)	27.81
Ácido etilendiaminotetracético (sal disódica) (Na ₂ EDTA)	37.31

Tabla 5. Medio basal de Murashige & Skoog, 1962.

Para la preparación se utilizó un vaso de precipitado de 1 L al que se le vertió 750 ml de agua destilada, las soluciones de sales Murashige & Skoog, el líquido debe estar en constante agitación en una parrilla magnética para su homogenización, para después añadir 30 g de sacarosa. Los RCV se adiciona antes de tomar el pH ya que estos puede alterarlo, para este experimento se utilizó BA en diferentes dosis, tratamiento 1 (1.0 mg L^{-1}), tratamiento 2 (2.0 mg L^{-1}) y para el tratamiento 3 (3.0 mg L^{-1}), después de ajusto el pH a 5.7 se añadió 8 g L^{-1} de agar para su gelificación mezclando constantemente hasta verse homogéneo, con la ayuda de un horno microondas se calentó en poco a poco hasta disolver el agar por completo y que el medio quedara con una apariencia cristalina, por último, se aforó con agua destilada hasta llegar al volumen exacto de 1 litro.

El medio de cultivo se distribuyó en recipientes de vidrio de 200 ml de capacidad con 50 ml cada uno, después de verter el medio se cerraron con una tapa de polipropileno, para después ser esterilizaron en una autoclave de vapor de agua durante 15 minutos a una temperatura de 121°C y presión de 1.3 kg/cm^3 (15 psi). Después de salir de la esterilizadora se colocaron en estantes para su enfriado y almacenado hasta el día de la siembra.

6.1.3. Obtención de explantes.

Para establecer el cultivo aséptico del material vegetal se trabajó en una campana de flujo laminar, que contenía un calentador eléctrico para la constante esterilización de nuestro material (pinzas de disección regular y el bisturí del n°11) y un vidrio de 20 x 20 cm esterilizado.

El procedimiento de obtención de explante se realizó en colocando las plántulas en una caja de Petri esterilizada a las cuales se les cortaron raíces desde la base y las puntas de las hojas para facilitar la separación de todas estas hasta dejar el tallo desnudo, de tal manera que solo quedo un cilindro de 3 a 5 mm de largo y 2 a 3 mm de ancho, este segmento de tallo es el explante sugerido por varios autores para la

multiplicación de Agaves por contar con células meristemáticas o primarias de rápido crecimiento y alta capacidad totipotente (Figura 9),

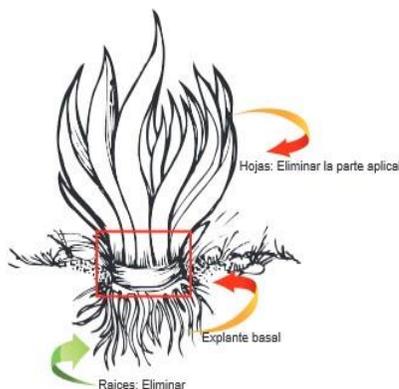


Figura 9. Parte basal de la roseta donde se encuentra el tallo, del que se obtiene el explante del Agave.

6.1.4. Inoculación.

Inmediatamente después de obtener el explante de meristemo se inocularon en el medio de cultivo previamente esterilizados, se sembró solo un explante por frasco, con el cuidado de mantener la polaridad de la planta, es decir hacia arriba la parte de tallo y hacia abajo la de raíz. Una vez sembrado el material vegetal el frasco se selló con cinta plástica para mantener herméticos los cultivos. Los frascos fueron etiquetados antes de llevarse a la sala de incubación para su mejor monitorización.

6.1.5. Mantenimiento.

Los cultivos se mantuvieron en la sala de incubación con instalaciones eléctricas para el control de las condiciones físicas de temperatura de $25^{\circ} \pm 2$ C, fotoperiodo 8 horas. luz, 8 horas de oscuridad, bajo una luz blanca.

6.2. Respuestas morfogénicas de los explantes *in vitro* al utilizar citocinina en combinación con auxina en el medio MS.

6.2.1. Medio de cultivo.

Para este experimento se siguió la misma técnica de preparación del medio de cultivo, sales MS al 100%, pero a estos se les añadió diferentes concentraciones y tipos de RCV. El tipo y dosis de regulador se hizo con las combinaciones auxina más citocinina de un cuadro 4x4 con dosis de 0, 1.0, 2.0 y 3.0 mg L⁻¹ de BA [6 (bencilamino) purina] más 0, 1.0, 2.0 y 3.0 mg L⁻¹ de 2,4-D (ácido 2,4diclororofenoxiacético), obteniendo así 16 tratamientos; esto se preparó por triplicado ya que se utilizaron para tres diferentes tipos de explantes (tabla 6a). Solo se repitieron 5 tratamientos, aquellos que contaban con más cantidad de un regulador y menos del otro, así como el equilibrio de estos (tabla 6b).

	0	1.0
0	TA1 0/0	TA2 1.0/0
1.0	TA5 0/1.0	TA6 1.0/1
2.0	TA9 0/2.0	TA10 1.0/2
3.0	TA13 0/3.0	TA14 1.0/3

a)

T1	0/0
T2	3/0
T3	0/3
T4	2/2
T5	0/1

b)

Tabla 6. Cuadro de combinaciones de auxina (BA) y citocinina (2,4-D) añadidas al medio MS (a), tratamientos T1, T2, T3, T4, T5 para la repetición del experimento.

6.2.2. Obtención de explantes.

Con el fin de aprovechar el material vegetal se utilizaron diferentes tipos de tejidos (hoja, tallo y raíz) para obtener explantes, como lo hicieron Chen *et al.* en 2014 para la especie *Agave americana*, los explantes fueron sembrados en los cinco

tratamientos antes descritos. La obtención de explantes fue bajo el mismo proceso de asepsia anteriormente descrito para explantes de tallo; para los explantes de hoja y de raíz se utilizaron pequeños segmentos equiparables a los obtenidos del meristemo basal, dos explantes por unidad experimental de hoja y uno de raíz.

I	II	III
T1	T5	T4
T2	T1	T2
T3	T2	T5
T4	T3	T1
T5	T4	T3

Tabla 7. Cuadro con los cinco tratamientos de combinación citocinina/auxina (BA/2,4-D) aplicados aleatoriamente a los tres tipos de explantes (tallo, hoja y raíz).

6.2.3. Inoculación

Los tres tipos de explantes fueron sembrados en los cinco diferentes tratamientos de manera completamente al azar. Una vez sembrado el material vegetal, el frasco fue sellado con cinta plástica y etiquetados para después llevarse a la sala de incubación.

6.2.4. Mantenimiento.

Los cultivos se mantuvieron en el mismo anaquel de la sala de incubación que los otros explantes con temperatura $25^{\circ} \pm 2$ C, fotoperiodo 8 horas. luz, 8 horas de oscuridad, bajo una luz blanca.

6.3. Aclimatación y transferencia a suelo.

Después de analizar el grado de enraizamiento de las plántulas de agave según el número de raíces y su tamaño se lograría establecer si existe diferencia significativa en el uso de un medio cultivo con RCV para el enraizamiento o si con un medio basal sin reguladores es suficiente para el desarrollo de raíces.

Las plántulas permanecieron en el mismo recipiente durante 4 meses, durante este tiempo las plántulas desarrollaron raíces adventicias por si solas, lo que facilitó el paso a la siguiente y última etapa de micropropagación.

La aclimatación llevando los frascos a invernadero y permanecieron por 1 semana cerrados herméticamente, después se quitó la cinta plástica que sellaba la tapa y se abrieron los frascos sin retirar las tapas, para la pérdida paulatina de la humedad interna del frasco durante cinco días. La siguiente semana se retiraron las tapas dejando una pequeña gasa en su lugar para evitar la entrada de insectos o vectores, se lavaron las plantas con agua purificada para eliminar los residuos sólidos de medio, estas fueron puestas en papel de estraza para ventilarse y que sellaran pequeñas heridas en las raíces y evitar que se pudrieran al estar en contacto con el sustrato, después de 4 días de secado a temperatura ambiente.

En este apartado se logrará encontrar la cantidad de RCV para obtener la mayor cantidad de raíces en el menor tiempo posible. Posteriormente las plántulas se llevaron a contenedores individuales con un sustrato de vermiculita y turba en una relación de 1:1, los contenedores con las plántulas se cubrieron con bolsas de polietileno negro durante 10 días, retirándose por completo el día 21 después del trasplante.

7. RESULTADOS Y DISCUSIONES

7.1. Multiplicación de brotes en medio MS y diferentes concentraciones de citocinina.

Los resultados del primer experimento en el que se aplicaron diferentes concentraciones de BA al medio MS demuestran que este RCV en *A. shawii shawii* y en *A. shawii goldmaniana* sirvió para estimular la brotación (figura 10), pero en algunos individuos indujo el crecimiento de tejido caloso (figura 13 a). Aunque la gráfica muestra un alto porcentaje de brotación (figura 10) en el tratamiento 1 y 2 se trató de brotación simple (figura 12).

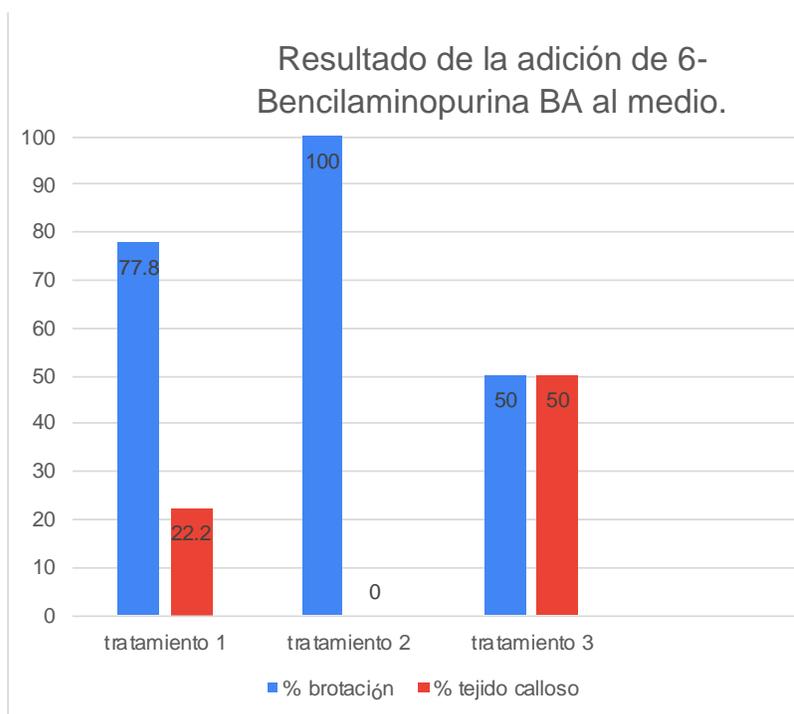


Figura 10. La respuesta de los explantes basales de *A. shawii shawii* en el tratamiento 1 con una cantidad de 1.0 mg L^{-1} de BA fue en su mayoría de brotación y en un 22.2 % producción de tejido caloso; en los explantes basales de *A. shawii goldmaniana* se aplicó el tratamiento 2 con 2.0 mg L^{-1} de BA que presentó brotación múltiple en todos los individuos; en el tratamiento 3 con 3.0 mg L^{-1} de BA se presentó tanto brotación como producción de callo en la misma proporción.

Analizando cada uno de los tratamientos encontramos que la respuesta de los explantes basales inoculados en el tratamiento 1 con 1.0 mg L^{-1} de BA fue únicamente brotación simple (figura 12) debido a que la cantidad de regulador demostró ser insuficiente para la promoción de brotes múltiples a diferencia de otras especies como *A. karwinskii* (Domínguez-Rosales *et al.*, 2008) y en *A. angustifolia* (Enríquez-del Valle, *et al.*, 2016), en donde se obtuvieron hasta 12 brotes por explante con la misma concentración y el mismo regulador de crecimiento vegetal, incluso en *A. victoria-reginae* se obtuvo brotación múltiple con solo 0.5 mg L^{-1} de BA (Ramírez-Malagón *et al.*, 2008). Además, el uso de esta dosis de RCV fue de utilidad experimental al no existir precedente alguno del su uso en *A. shawii goldmaniana* y *A. shawii shawii*.

Bajo las condiciones de este tratamiento (1.0 mg L^{-1} de BA) se llegó a observar en un 22% de las unidades experimentales desarrollo de tejido caloso con apariencia vitrificada, pero con una buena aptitud metabólica caracterizada por rápido crecimiento (figura 13 b). Los callos obtenidos fueron subcultivados bajo el mismo tratamiento y en esta ocasión estimuló una rápida diferenciación celular y consecuente formación de brotes, con un promedio de 11.5 brotes por explante. La formación de brotes consumió la mayoría del medio de cultivo convirtiéndolo en biomasa (figura 13 c). Estos brotes auto limitaron su crecimiento poco antes de terminar con el medio comenzaron la formación de raíces adventicias (figura 13 d). La buena respuesta en el subcultivo de los callos permite sugerir la propagación por organogénesis indirecta como una opción más viable para las dos subespecies.

Por otra parte, los explantes provenientes de meristemo de tallo del *A. shawii goldmaniana* cultivados en el tratamiento 2 con 2.0 mg L^{-1} de BA respondieron favorablemente con una brotación múltiple de 2 a 12 brotes por explante, estos brotes contenían un número considerablemente mayor de hojas respecto al testigo (figura 14 a); este tratamiento presentó en su totalidad brotación y en esta fue en su mayoría brotación múltiple (figura 14 b), para saber si estadísticamente existía significancia en el número de brotes por explante respecto al tratamiento control, se realizó una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, esta comprobó que el tratamiento 2 (2.0 mg L^{-1} de BA) es mejor en la formación de brotes (figura 11). Estos

resultados se presentaron de manera similar en *A. cupreata* y en *A. salmiana* que también con 2.0 mg L⁻¹ de BA respondieron con brotación múltiple (DomínguezRosales *et al.*, 2008). Esto resultados son de gran utilidad ya que el uso de un solo RCV para estimular la brotación múltiple y una eventual formación de raíces adventicias (figura 14 c), permitiría abaratar los costos de la micropropagación.

Respecto al tercer y ultimo tratamiento que contenía 3.0 mg L⁻¹ de BA, se presentaron diferentes respuestas, en un 33% los explantes formaron tejido calloso; en otro 17% se obtuvo brotación simple (figura 15 b), estos brotes destacaban por tener un mejor desarrollo foliar con hojas más vigorosas que las del testigo (figura 15 a); y el restante 33% de explantes resultaron con una brotación múltiple con un promedio de 2.5 brotes con un promedio de 3 hojas angostas y cortas (figura 15 c).

Cabe mencionar que en este primer experimento no se encontró una correlación entre la cantidad de citocinina y el número de brotes por explante (figura 10) como se ha reportado en otros estudios en agaves, tal es el caso de *A. americana* que al aumentar la cantidad de BA y sacarosa al medio se aumentaba el número de brotes (Miguel-Luna *et al.*, 2014), infiriendo que la citocinina en el *A. shawii* no es el único componente que interviene en la inducción de brotación.

Tratamiento BA mg L ⁻¹	Promedio	Mediana	Desviación estándar
1.0	0.78	1.0	0.441
2.0	3.42	2.0	3.605
3.0	1.00	0.5	1.414

Tabla 8. Promedio y desviación estándar del número de brotes por explante obtenidos en los tres tratamientos con citocinina 6-Bencilaminopurina (BA) realizadas en *Agave shawii*, n=25.

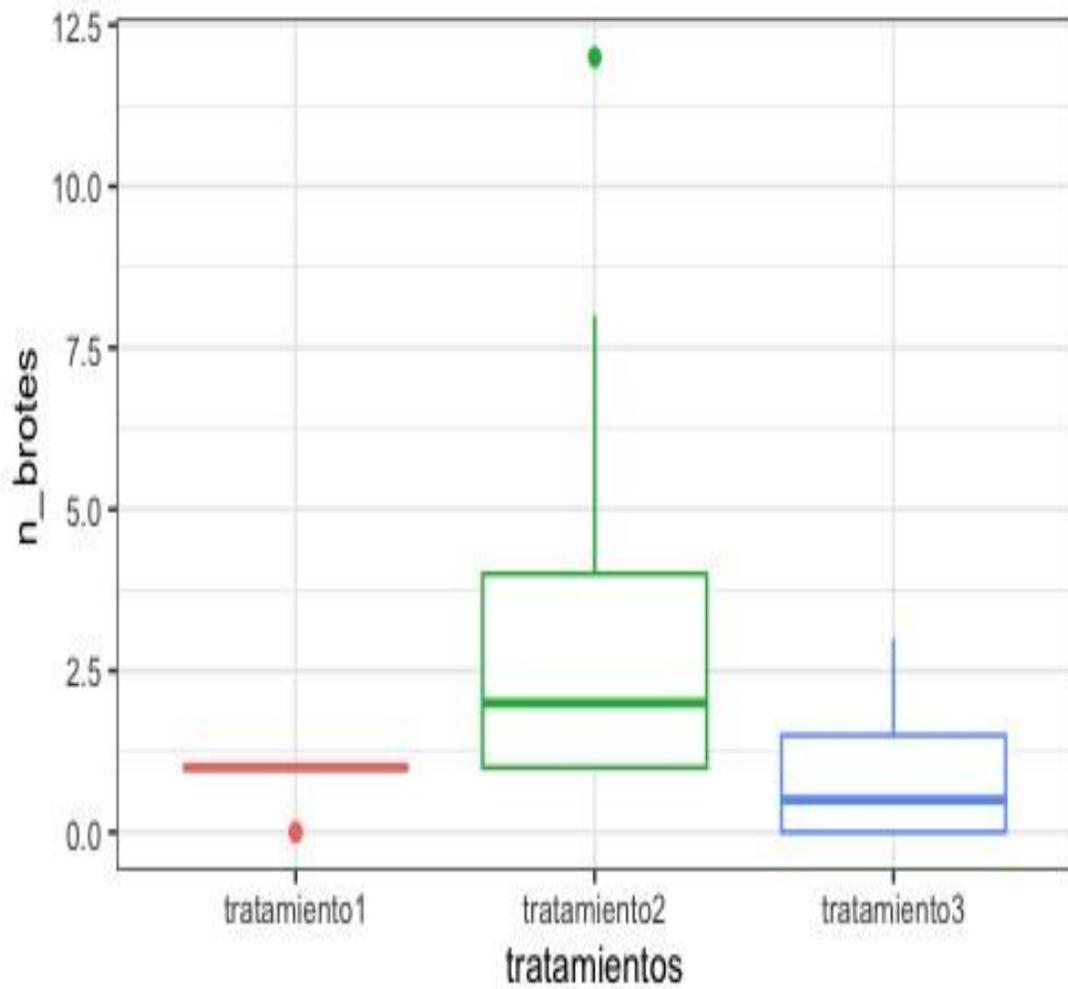


Figura 11. Gráfica de la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis evidencia la significancia en formación de brotes del tratamiento 2 (2.0 mg L^{-1} de BA) respecto al resto de tratamientos, el número de brotes por explante obtenidos fueron de 2 a 12. Mientras que el tratamiento 1 y 3 tiene medias muy parecidas. $n = 25$.

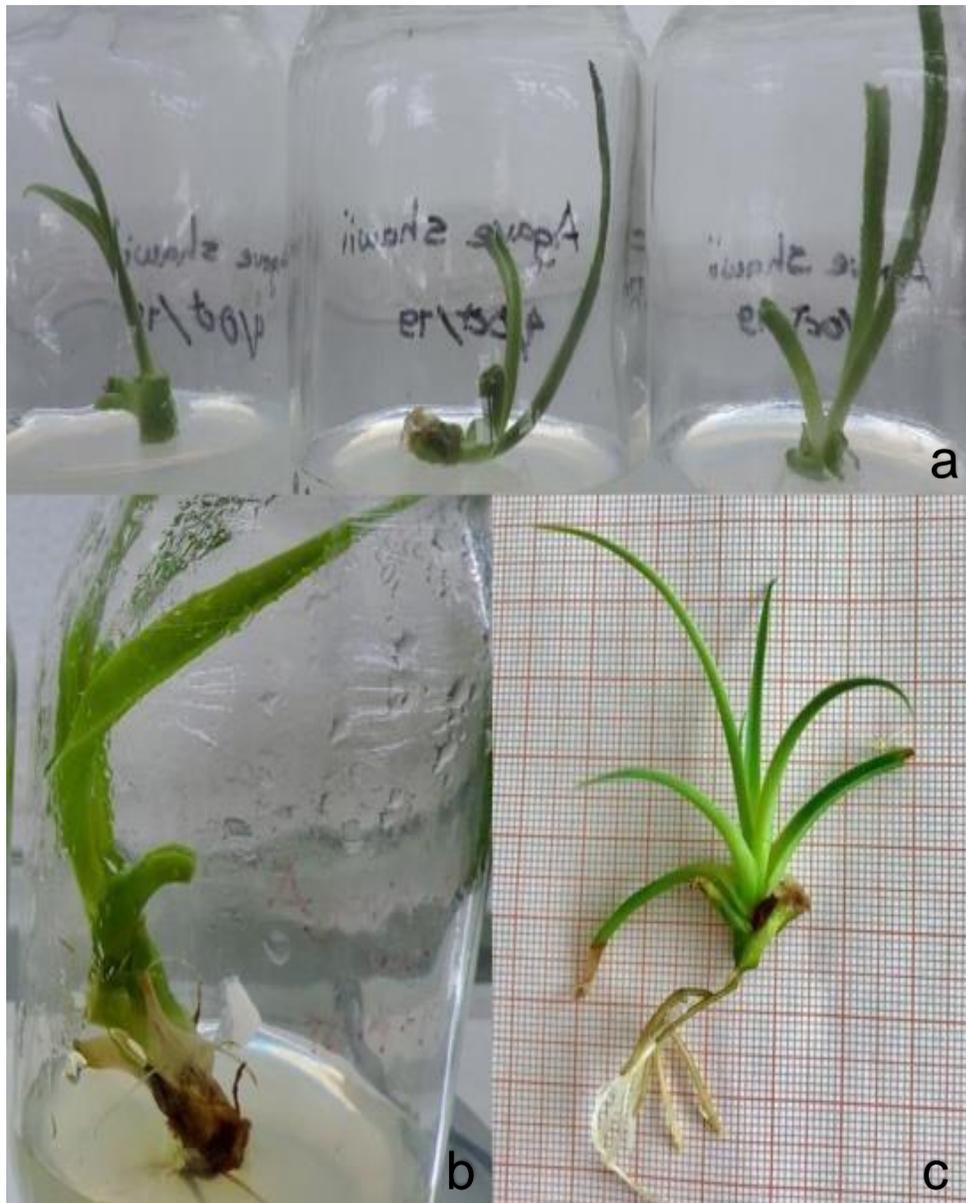


Figura 12. Generación de brotes de explantes basales de *A. shawii shawii* cultivados en medio MS + 1.0 mg L⁻¹ a los 50 días de incubación (a); brote simple proveniente de tejido meristemático a los 120 días con un mejor desarrollo foliar respecto a tratamiento testigo y comienzan a crecer pequeñas raíces adventicias en el tallo (b); brote con crecimiento equilibrado de las estructuras aéreas y subterráneas (c).

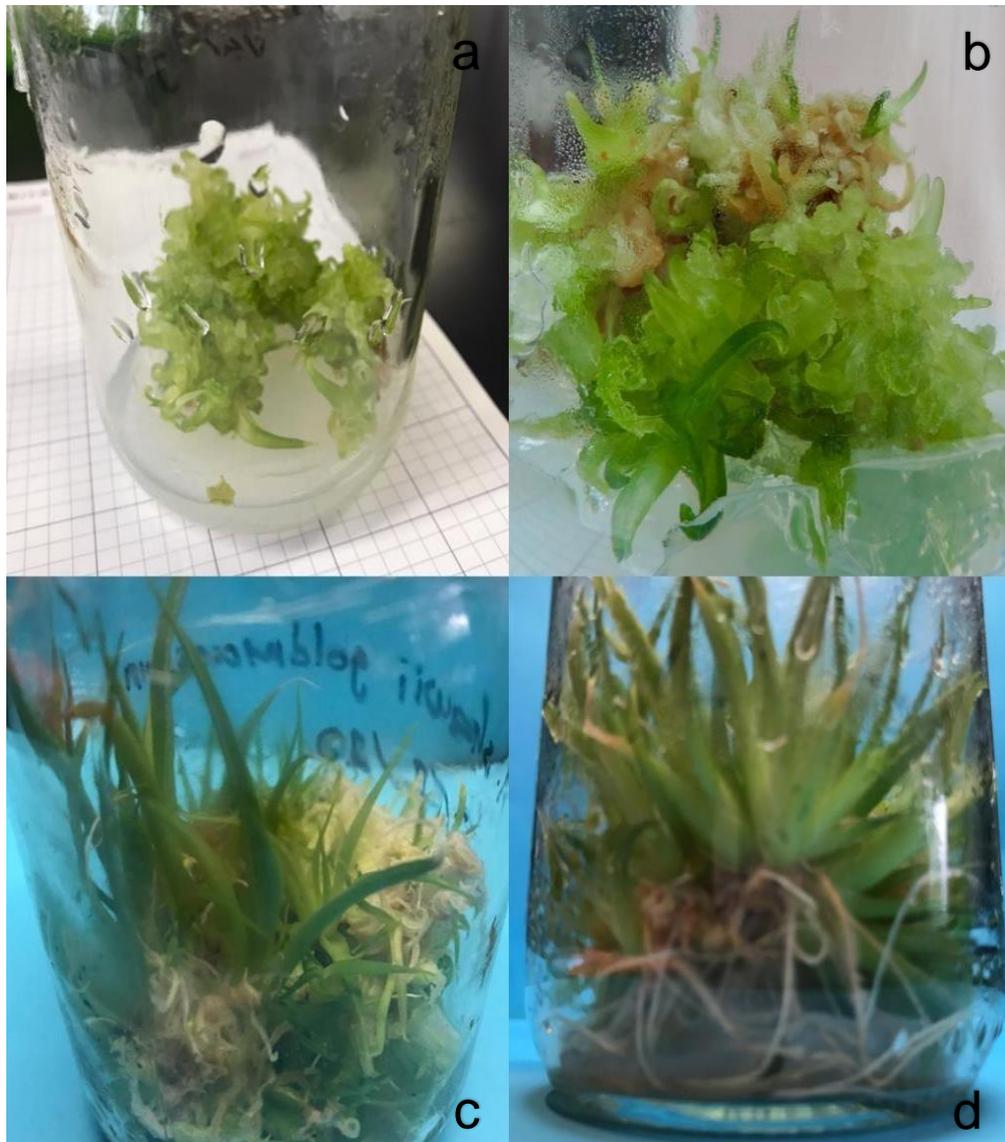


Figura 13. Formación y crecimiento de callo sobre explantes de tallos de *A. shawii goldmaniana* en medio MS y 1.0 mg L^{-1} 6-Bencilaminopurina (BA) (a); Callos subcultivados, en el mismo medio MS con 1.0 mg L^{-1} de BA, algunos vitrificados (b); brotación múltiple proveniente del tejido calloso en constante diferenciación da origen a brotes vía organogénesis indirecta (c); el conjunto de brotes provenientes del tejido calloso para la formación del sistema radical completo absorbió todo el medio y lo transformo en biomasa (d).

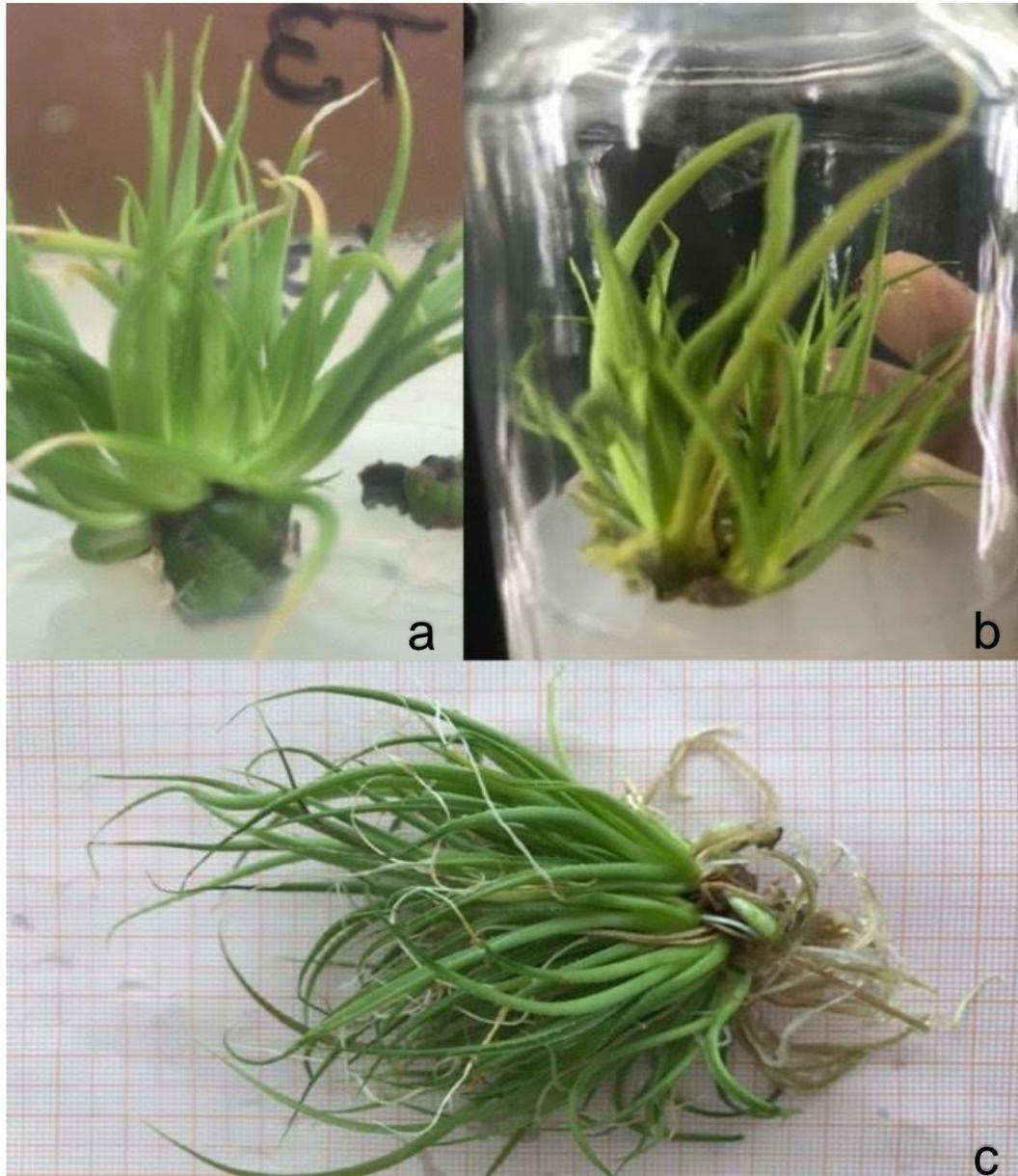


Figura 14. Brotación múltiple sobre explantes basales de tallo de *A. shawii goldmaniana*, cultivados en medios con 2.0 mg L^{-1} de BA a los 90 días (a); brotación múltiple proveniente de explantes de meristemo en medio con de 2.0 mg L^{-1} de BA a los 180 días (b); Conjunto de brotes múltiples a los 300 días con raíces adventicias desarrolladas sobre el mismo medio en el que se inoculo por primera vez.

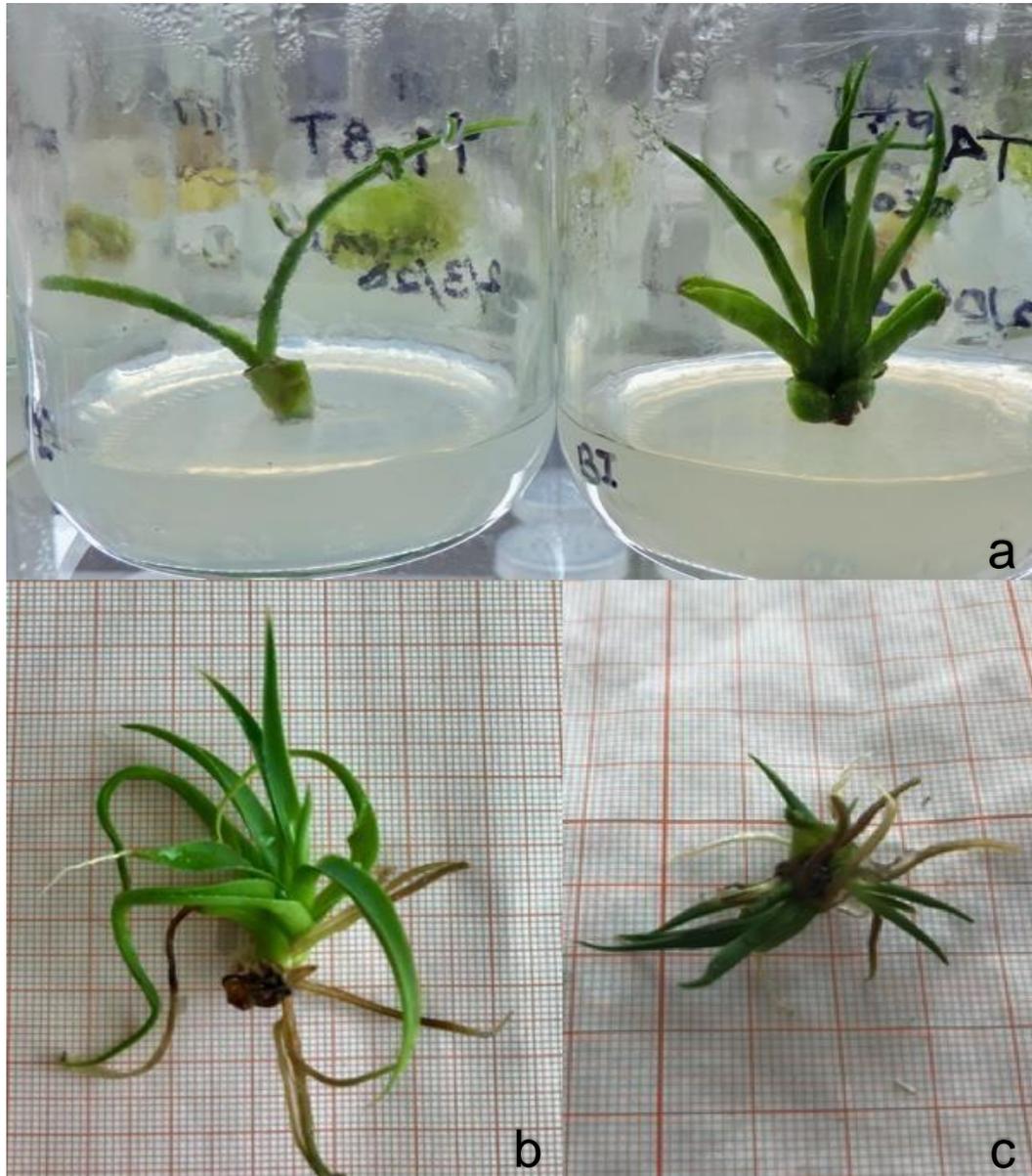


Figura 15. Brotación única del explante de meristemo de tallo de *A. shawii goldmaniana* (regeneración) con la adición de citocinina (Benciladenina) en 3.0 mg L^{-1} al medio MS comparado con el testigo (a); brote de aspecto vigoroso en base al número de hojas producidas respecto al testigo, así como un mayor grosor de la lámina foliar de *A. shawii shawii* (c); Brotación múltiple con plantas pequeñas, con pocas y pequeñas hojas, el brote presenta también formación de raíces adventicia *A. shawii goldmaniana* (d), datos tomados a los 120 días.

7.2. Respuestas organogénicas de los explantes in vitro al utilizar citocinina en conjugación con auxina en el medio MS.

A la citocinina (BA) se sumó un regulador de crecimiento sintético del grupo de las auxinas (2,4-D) con la intención de mejorar la eficacia de la micropropagación, para ello hizo un cuadro 4x4 con concentraciones de 1.0, 2.0 y 3.0 mg L⁻¹ de BA y 1.0, 2.0 y 3.0 mg L⁻¹ 2,4-D. Solo se replicaron 5 tratamientos por los escasos de material vegetal, estos fueron aplicados a tres tipos de tejido vegetal (tallo, hoja y raíz) para aprovechar al máximo dicho material. Diversos autores recomiendan el uso del meristemo de tallo como explante ideal para la micropropagación de *Agaves*, pero el tipo de explante resultó ser útil para conocer el comportamiento de *A. shawii goldmaniana* en el cultivo de tejidos. Los datos obtenidos se analizaron cualitativamente.

Tratamiento BA + 2,4-D		tallo			hoja			raíz		
		callo	Brote simple	Brotos múltiples	callo	Brote simple	Brotos múltiples	callo	Brote simple	Brotos múltiples
1	0 + 0	-	***	-	-	-	-	-	-	-
2	1 + 0	*	***	-	-	-	-	-	-	-
3	2 + 0	-	-	***	-	***	-	-	-	-
4	3 + 0	**	*	**	-	-	-	-	-	-
5	0 + 1	***	*	-	**	-	-	*	-	-
6	1 + 1	**	-	-	**	-	-	*	-	-
7	2 + 1	**	-	-	***	-	-	**	-	-
8	3 + 1	***	-	-	***	-	-	**	-	-
9	0 + 2	*	-	-	*	-	-	-	-	-
10	1 + 2	*	-	-	-	-	-	***	-	-
11	2 + 2	**	-	-	**	-	-	***	-	-
12	3 + 2	***	-	-	***	-	-	-	-	-
13	0 + 3	**	-	-	**	-	-	*	-	-
14	1 + 3	**	-	-	**	-	-	-	-	-
15	2 + 3	***	-	-	***	-	-	**	-	-
16	3 + 3	***	-	-	***	-	-	-	-	-

Tabla 9. Efecto de las diferentes combinaciones de MS + RCV (mg L⁻¹) en la formación de callo, brote único y brote múltiple, sobre diferentes tipos de explantes de *A. shawii goldmaniana*. Escala semi cuantitativa + leve; + + media; + + + alta y – ausente.

Al asociar la auxina con la citocinina las respuestas obtenidas fueron variadas, en los explantes de meristemos de tallo se presentó brotación simple, brotación múltiple y formación de tejido calloso. En los explantes de hoja y raíz predominó la producción de tejido calloso y la necrosis temprana. Los callos de mayor crecimiento y mejor apariencia provenían de explantes meristemáticos seguidos de los derivados de explantes de hoja. La calogénesis le otorga potencial para la producción de brotes vía organogénesis indirecta como el *A. americana* en el que se reportó brotación múltiple derivada de callos que fueron originados en explantes de hoja (Chen *et al.*, 2014).

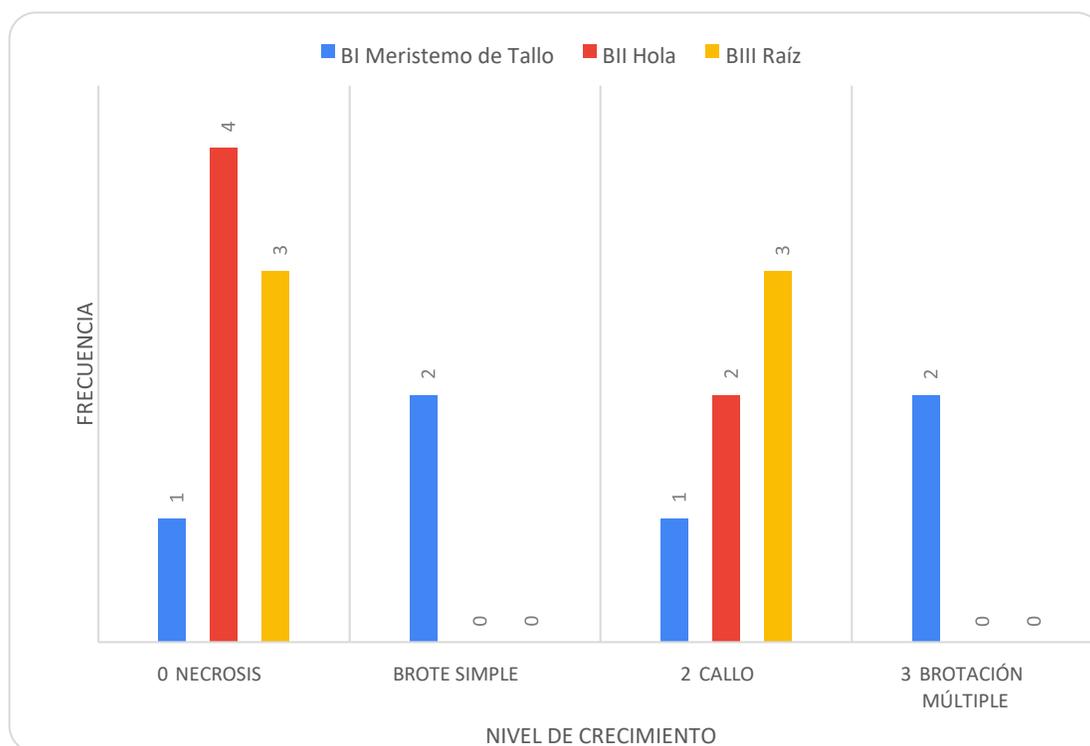


Figura 16. Análisis de frecuencia de la respuesta obtenida en la combinación de los reguladores vegetales BA / 2,4-D en los tres diferentes tipos de explantes. La amplia respuesta se reporta en su totalidad de la siguiente manera: 0 muerte celular, 1= regeneración que no se contó dentro de la brotación por no ser múltiple y tratarse de un solo individuo, 2= callo que se cuenta como crecimiento multicelular y 3= brotación múltiple, respuesta ideal esperada.

La respuesta morfogénica o nivel de crecimiento de los tres tipos de explantes (tallos, hoja y raíz) muestran que los explantes de meristemo (tallos) nunca perdieron su capacidad de auto regeneración y totipotencia, presentando todos los niveles de crecimiento, respaldando lo que la literatura sobre agaves sugiere, sobre que el

tejido ideal para la propagación *in vitro* en *Agave* son los meristemos basales. Estos lograron su desarrollo gracias a que encontraron los nutrientes necesarios y las condiciones que se lo permitieron, pero principalmente se debe a que los meristemos son células indiferenciadas encargadas del constante y permanente crecimiento de la planta, otorgándoles capacidad de división y un alto potencial de diferenciación a diferentes de tipos celulares (Bhojwani & Dantu, 2013). Los explantes provenientes de tallo y raíz no prosperaron en tratamientos que contenían un solo RCV, pero formaron callos en diferentes tratamientos que contenían los dos reguladores, lo que nos permite inferir que los explantes de hoja y tallo de *A. shawii goldmaniana* solo sirven para producir tejido calloso y para ello necesita la interacción de BA y 2,4-D. La buena respuesta de *A. shawii goldmaniana* para la producción de tejido calloso resulta ser muy prometedor para una futura proliferación de brotes por vía organogénesis en segmento de hojas y tallo, como Valenzuela-Sánchez *et. al.*, (2006) que obtuvieron brotes generados a partir de callos sobre los mismos explantes de hoja y tallo con el uso de 0.3 mg L⁻¹ 2,4-D más 10 mg L⁻¹ de BA.

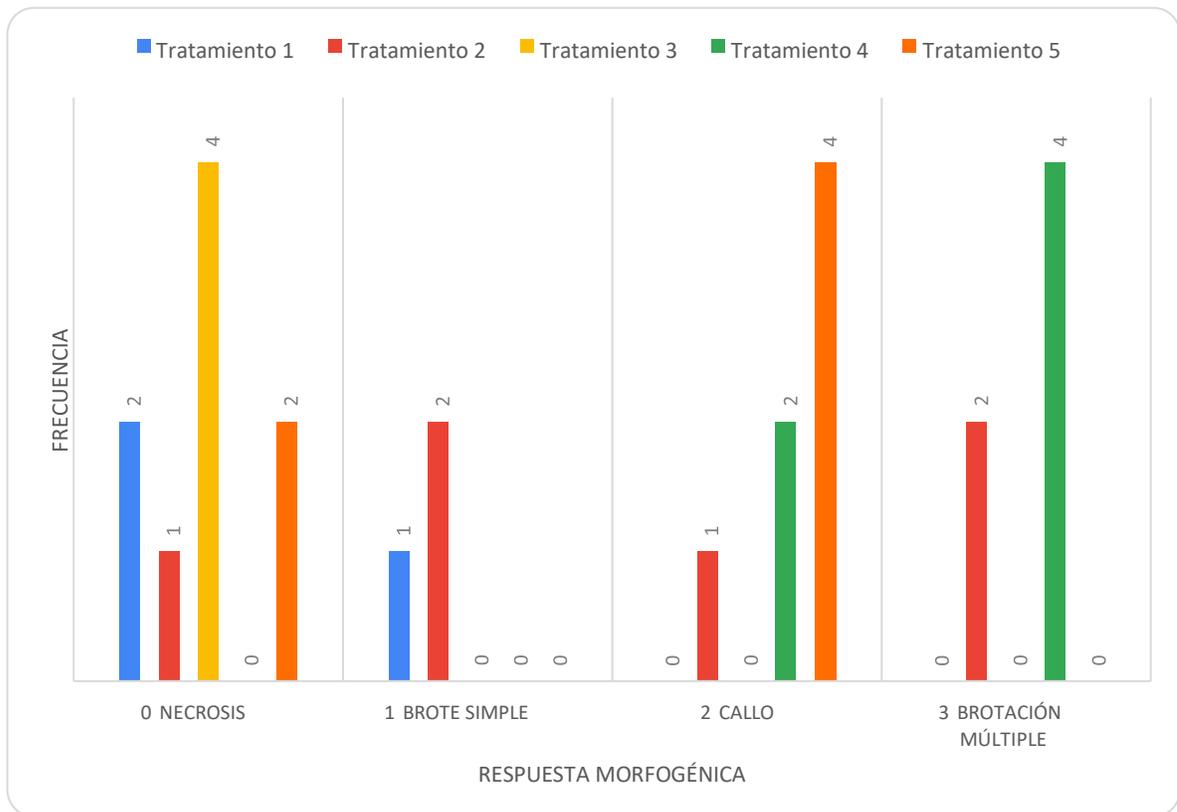


Figura 17. Respuesta según el tipo de tratamiento aplicado al medio de cultivo, estos contienen BA y 2,4-D a diferentes concentraciones en mg L^{-1} , T1 (0/0), T2 (3.0/0), T3 (0/3.0), T4 (2.0/2.0), T5 (0/1.0). Nivel de respuesta 1 Brotación simple, 2 Callo y 3 Brotación múltiple. El tratamiento 4 con 2.0 mg L^{-1} de cada RCV es el que indujo una brotación múltiple, los demás tratamientos solo generaron brotación simple y tejido calloso.

El tratamiento testigo presentó únicamente brotación simple en los explantes provenientes de tallo, a diferencia de los explantes de hoja y raíz que en este mismo medio (sin RCV) presentaron una rápida oxidación provocada muy probablemente por el daño en el manejo humano; los mismos explantes de hoja y tallo se oxidaron rápidamente en los tratamientos que contenían solo un tipo de regulador ya sea BA 2,4-D en solitario y los cambios morfogénicos en explantes de raíz y hoja solo se presentaron en tratamientos donde existía una combinación de los dos RCV, evidenciando que la sinergia de estos dos reguladores de crecimiento estimula en *A. shawii shawii* la formación de callo en explantes de hoja y de raíz.

Los explantes provenientes de raíz tuvieron respuesta más baja a los diferentes tratamientos en general y al igual que en la hoja nunca reaccionaron a la aplicación

de 2,4-D solo. El resultado que destaca es el crecimiento mayor del callo que fue con en el tratamiento de 2.0 mg L⁻¹ BA más 2.0 mg L⁻¹ de 2,4-D, demostrando que la sinergia de estos reguladores mejora los resultados.

Nivel de crecimiento	Tejido	Contenido de BA CBA-CB2HD
0 necrosis	I Meristemo de tallo	negativo CBA<C2HD
1 regeneración	II Hoja	0 CBA=C2HD
2 callo	III Raíz	positivo CBA>C2HD
3 brotación		

Tabla 10. Datos y fórmula utilizados para graficar los resultados de la combinación de citocinina (BA) con auxina (2,4-D) en diferentes tipos de explante.

Para graficar la respuesta obtenida de la combinación de los dos grupos principales reguladores de crecimiento (auxina-citocininas) se utilizó la fórmula CBA-C2,4-D donde CBA es el contenido de Benciladenina y C2,4-D es el contenido de 2,4-D, de esta manera tenemos que los resultados obtenidos cuando la cantidad de citocinina (BA) sea mayor que la cantidad de auxina (2,4-D) serán positivos, cuando la cantidad de auxina (2,4-D) sea mayor que la de citocinina (BA) los resultados obtenidos serán negativos y cuando los RCV estén en la misma cantidad los resultados serán igual a cero (figura 15).

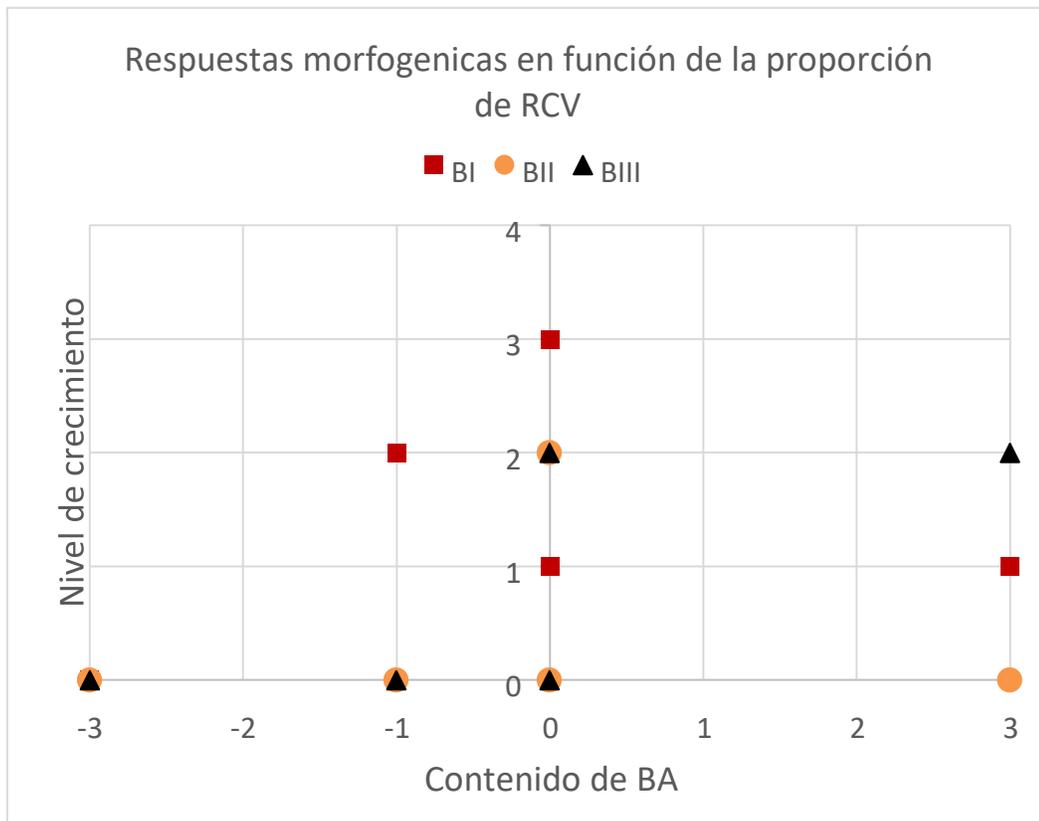


Figura 18. Respuestas obtenidas los diferentes tratamientos con la combinación de citocinina (BA) con auxina (2,4-D), con la fórmula CBA-CB2HD. Los resultados obtenidos cuando la cantidad de citocinina (BA) es mayor que la cantidad de auxina (2,4-D) se grafican en la recta positiva; cuando la cantidad de auxina (2,4-D) es mayor que de citocinina (BA) los resultados se grafican en la recta negativa y cuando los RCV estén en la misma cantidad se graficaran en el eje del cero. El nivel de crecimiento es 0 Necrosis, 1 regeneración, 2 callo y 3 brotación múltiple; BI es el explante de tallo, BII explante de hoja y BIII explante de raíz.

Se puede apreciar de manera general que en este experimento que la mayoría de las respuestas positivas como formación de tejido calloso y brotes se presentan cuando el RCV está en equilibrio, confirmando que la sinergia de estos dos reguladores mejora los resultados en todos los tipos de explantes de (tallos, hojas y raíces) para *A. shawii goldmaniana*.

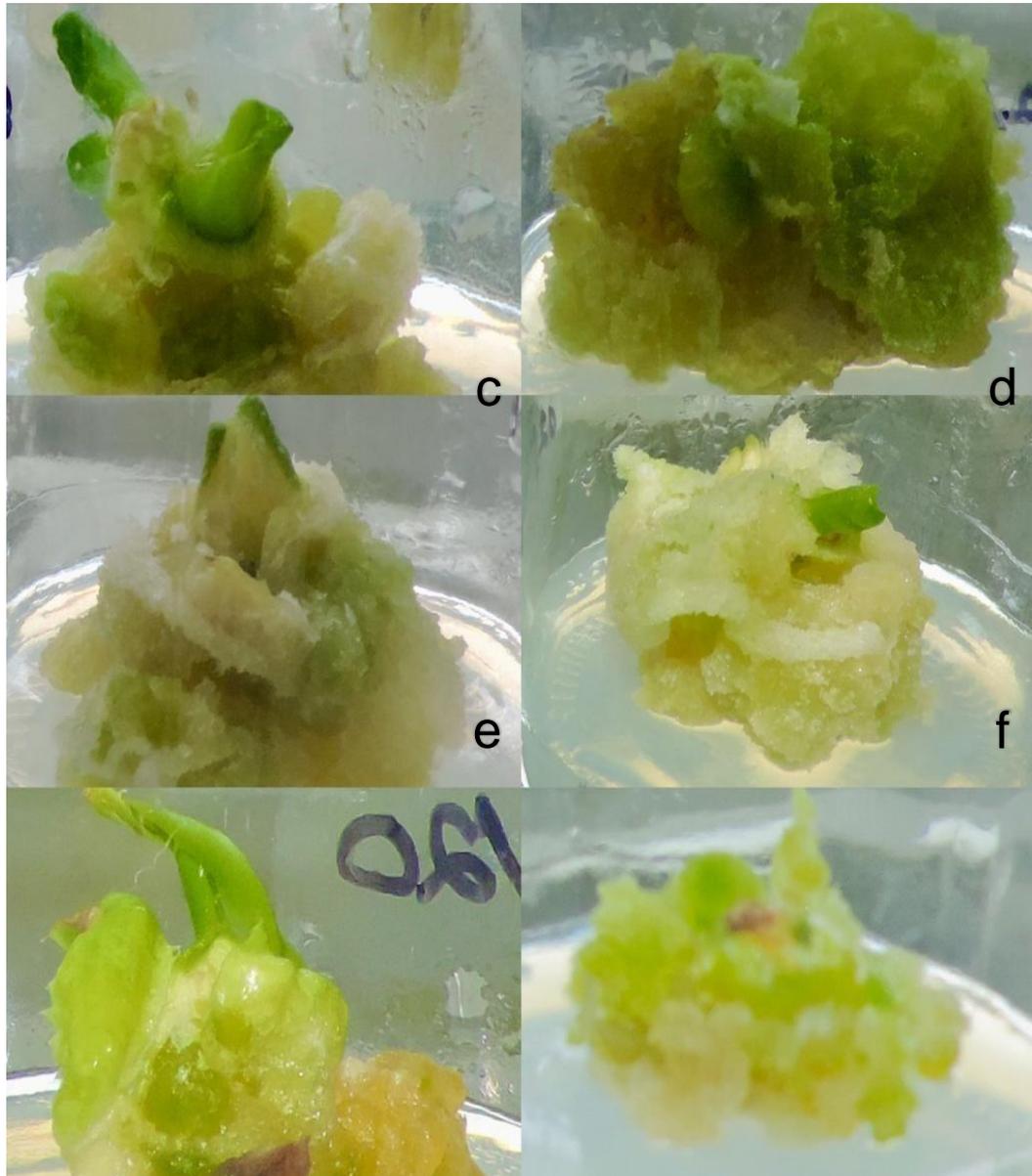


Figura 19. Generación y crecimiento de tejido calloso celular en explantes de hoja al inocularse en medio MS añadido con auxinas y citocininas en mg L^{-1} . Tratamiento 1.0 BA + 1.0 2,4-D (a); tratamiento 3.0 BA + 2.0 2,4-D (b); tratamiento 3.0 BA + 3.0 2,4-D (c); tratamiento 0 BA + 1.0 2,4-D (d); tratamiento 2.0 BA + 3.0 2,4-D (e) y (f).

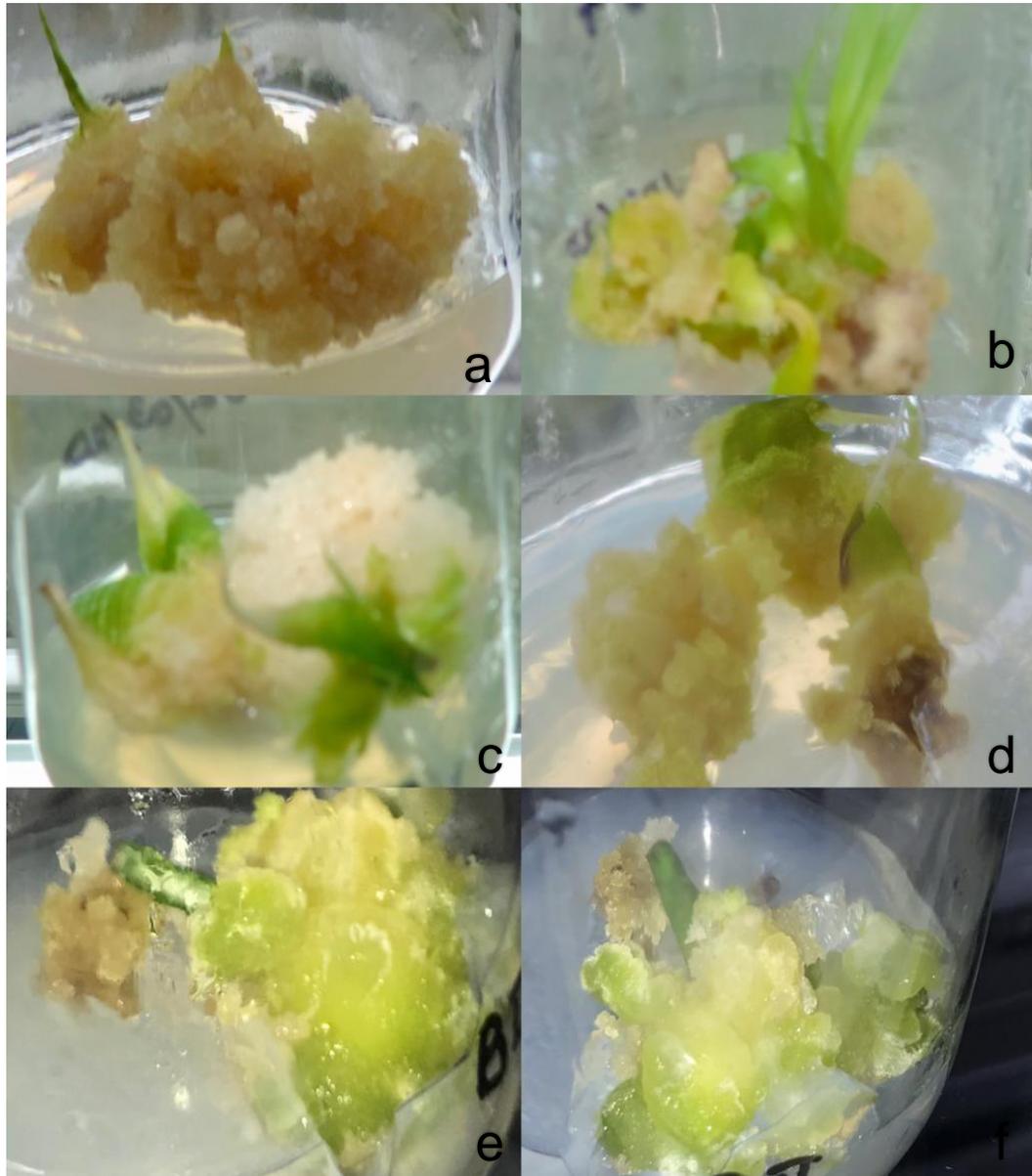


Figura 20. Producción de tejido calloso en explantes provenientes de hoja, cultivados en medio MS con auxinas más citocininas en mg L^{-1} . Tratamiento 2.0 BA + 2.0 2,4-D (a); tratamiento 2.0 BA + 1.0 2,4-D (b); tratamiento 1.0 BA + 1.0 2,4-D (c); tratamiento 0 BA + 1.0 2,4-D (d); tratamiento 2.0 BA + 3.0 2,4-D (e) y (f).

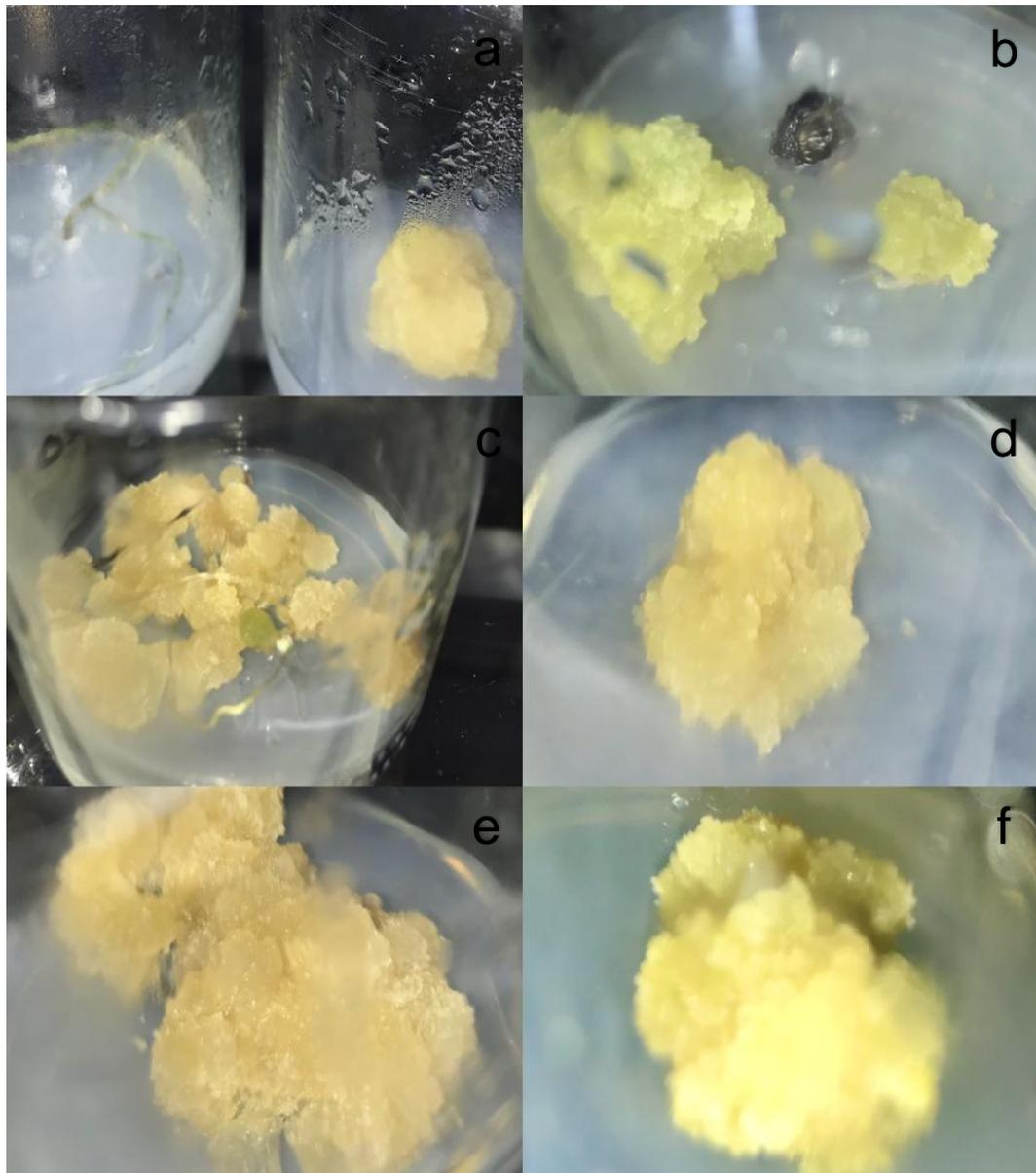


Figura 21. Generación y crecimiento de callo en explantes provenientes de raíz, inoculados en medio MS con auxinas y citocinina mg L^{-1} . Tratamiento control con explantes de raíz de *A. shawii goldmaniana* después de 120 días de incubación en medio MS y 2.0 mg L^{-1} BA + 1.0 de 2,4-D (a); tratamiento 3.0 BA + 1.0 de 2,4-D (b); tratamiento 0 BA + 2.0 2,4-D (c); tratamiento 1.0 BA + 1.0 2,4-D (d); tratamiento 2.0 BA + 2.0 2,4-D (e); tratamiento 3.0 de BA + 3.0 2,4-D (f).

7.3. Aclimatación y trasplante de plántulas obtenidas *in vitro* para su vida *ex vitro*.

Durante las 15 semanas de contingencia sanitaria las plantas que permanecieron en el mismo frasco donde se sembraron formaron raíces primarias y raíces adventicias, también se observó una auto limitación de crecimiento foliar y desarrollo total y parcial del sistema radicular, permitiendo con esto su paso a la aclimatación y posterior trasplante a sustrato. El sustrato utilizado fue de turba y perlita en una relación de 1:1, en condiciones de radiación solar reducida de 70% mediante sombra, temperatura de 24°C, riego somero diario para mantener el sustrato a capacidad de campo. Se utilizó las primeras 2 semanas un domo plástico que mantenía la humedad relativa de 50 a 70% que ayudo a la transición *in vitro* a *ex vitro*.

Composición del Sustrato	Número plantas por maceta	Plantas		
		Pudrición	Enraizada	Sobreviviente
Perlita + turba	uno	29%	70%	70%
Perlita + turba	conjunto	35%	65%	65%

Tabla 11. Porcentaje de sobrevivencia de plantas de *A. shawii goldmaniana* después de 6 semanas de aclimatación, se tomaron como plantas sobrevivientes solo aquellas que tenían formación de hojas nuevas.

Enríquez-del Valle *et al.*, (2013), sugiere que en esta etapa las plántulas deberían ser subcultivadas para su enraizamiento en un medio MS al 100% y una pequeña cantidad de auxina (1.0 mg L⁻¹ de AIB) para estimular el crecimiento de raíces adventicias.

En esta etapa final de la micropropagación las plántulas obtenidas en los experimentos anteriores fueron aclimatadas y transferidas a contenedores con sustrato en condiciones de invernadero, para que logran adaptarse a las futuras condiciones ambientales *ex vitro*. Las plántulas se aclimataron paulatinamente en el invernadero para evitar el estrés de la rápida transferencia de incubación en laboratorio a la zona de aclimatación o invernadero.

Esta última etapa fue posible gracias a que las plántulas desarrollaron raíces adventicias por su mismas después de 4 meses de estar en el mismo frasco y medio en el que fueron inoculadas para su brotación (figura 22 a), el enraizamiento puede

deberse a una síntesis endógena de auxinas en los brotes, como se ha registrado en algunos estudios donde los agaves son sembrados en medios de cultivos sin auxinas y la planta comienza una síntesis endógena de este regulador, induciendo así la formación organogénica de raíces adventicias; estas sustancias son producidas en las hojas y luego se transportan al tallo donde se estimula la formación de raíces (Enríquez-del Valle, *et al.*, 2005).

La figura 22 b muestra como algunos racimos de brotes múltiples tenían desarrollado el sistema radicular de las plántulas de manera independiente y lograron ser separadas para su aclimatación de manera individual (figura 22 d), pero otros conjuntos de brotes presentaban raíces adventicias en solo algunas, por ello se decidió pasar el conjunto de brotes sin ser separados a macetas de mayor tamaño con el fin de evitar mayor daño a las plántulas y aumentar sus posibilidades de sobrevivencia como lo muestra la figura 23 b. Las condiciones en las que se mantuvieron fueron las mismas que en las plántulas trasplantadas individualmente en charolas con cavidades independientes (figura 23 c).

El porcentaje de sobrevivencia fue de 70% de plántulas con formación de raíces independiente y 65% para conjuntos de brotes con raíces compartidas; aunque las plantas habían formado raíces por producción endógena al acabarse las citocinina del medio de cultivos, situación que permitió saltar la etapa de enraizamiento, los resultados indican que muy probablemente el subcultivo de las plantas a tratamientos para su enraizamiento daría a la planta mayor oportunidad de fortalecer su morfología en general pero principalmente ganaría fortaleza su morfología en general pero principalmente en su sistema radical por lo que no se recomienda saltar la tan importante fase. Estas plantas deben permanecer en condiciones de invernadero hasta que tengan de 35 a 50 cm de tamaño para una plantación definitiva a suelo (Binh *et al.*, 1990).

Cabe mencionar que durante la investigación se presentaron acontecimientos extraordinarios como fue la aparición de la pandemia provocada por el SARS-CoV2, que paralizó las actividades en aulas y laboratorios, situación que nos obligó a replantear y adaptar el presente estudio; lo reportado deja líneas de investigación abiertas para su futura mejora.

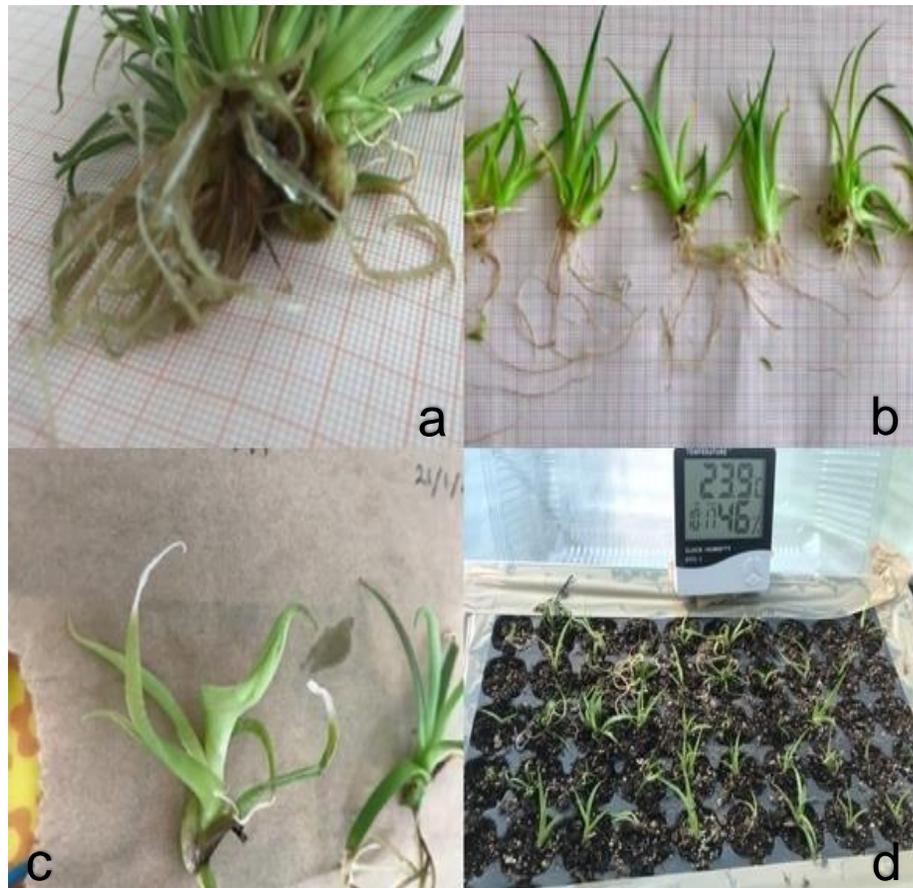


Figura 22. Plántulas después de la aclimatación en proceso de trasplante (a), plántulas después de la remoción de los restos de medio de cultivo (b); plántulas en secado de sistema radical para su trasplante a sustrato (c); siembra individual de plántulas en charolas con sustrato 1:1 de perlita y turba (d).

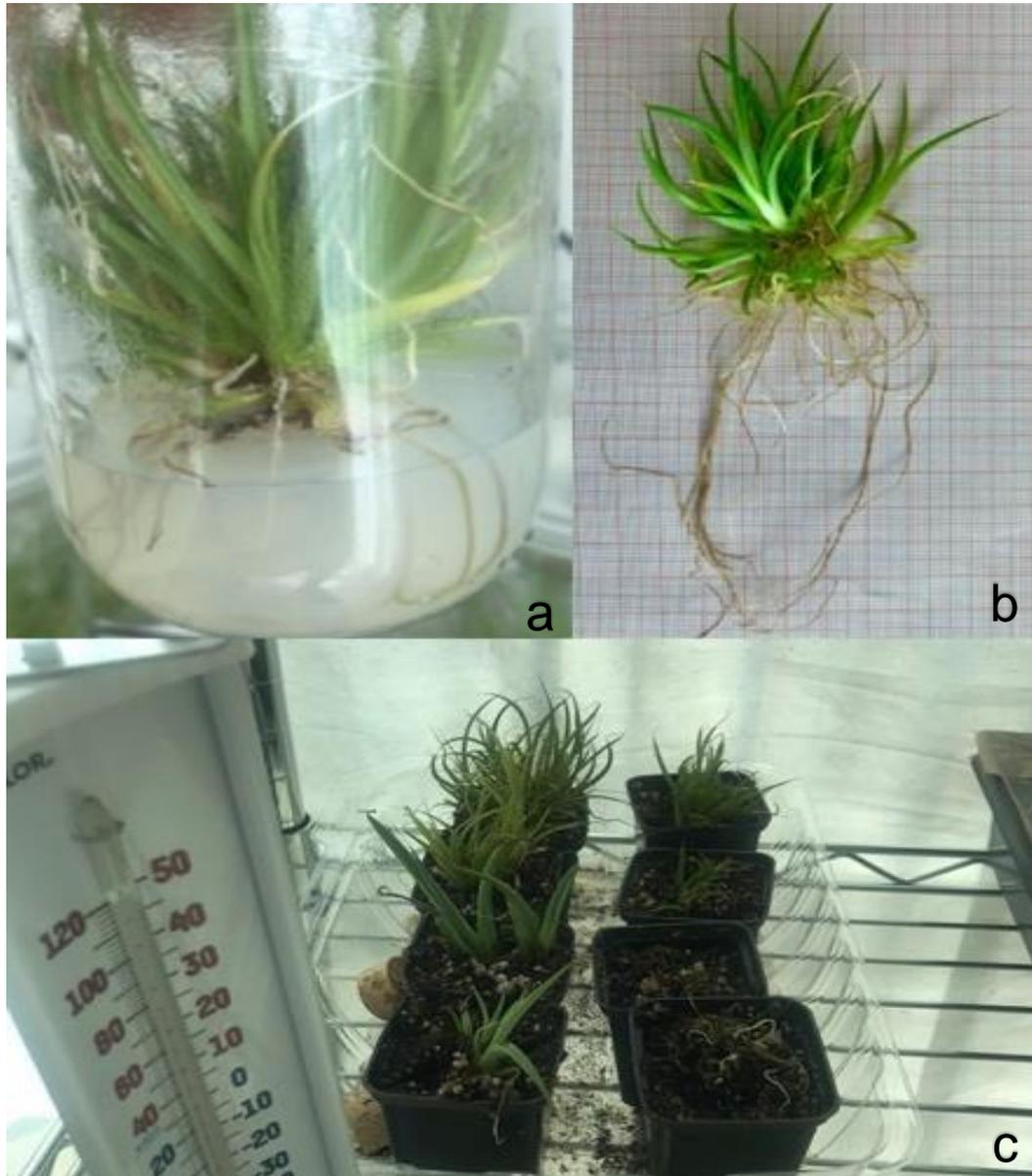


Figura 23. Trasplante de complejo de brotes (a), en macetas son sustrato de turba y perlita en una relación de 1:1; secado de raíces para cicatrización de heridas, se observa el sistema radicular compartido (b); conjunto de brotes sembrados en maceta para evitar el mayor daño posible (c).

8. CONCLUSIÓN

En el presente trabajo se demostró que es posible la propagación *in vitro* de las especies *A. shawii goldmaniana* y *A. shawii shawii*, para las que no existía antecedentes su manejo biotecnológico.

El uso y la concentración de Regulador de crecimiento desempeño un papel importante para la formación de brotes, por favorecer la multiplicación y diferenciación.

El protocolo de micropropagación con la inoculación de meristemos de tallo en un medio de cultivo MS adicionado con 2.0 mg L⁻¹ de BA, del cual se pueden obtener hasta 7 brotes por explante en un lapso de 120 días, como una alternativa para la propagación masiva de *Agave shawii* para su aprovechamiento y conservación.

Aunque la cantidad de brotes múltiple obtenida se considera aceptable, se encontraron individuos que desarrollaron tejido calloso y estos mismos callos presentaron mayor cantidad de brotes resultaron ser mucho mejores por lo que se sugieren que en futuros estudios se trabaje propagación vía organogénesis indirecta.

La utilización de auxina y citocinina (BA y 2,4-D) en el *A. shawii golmaniana* tuvo un efecto de callogénesis en los tres tipos de explante (tallo, hoja y raíz). Los tratamientos con dosis equilibradas de BA y 2,4-D se presentaron brotación múltiple y formación de tejidos callosos de mayor volumen, por lo que se sugiere la asociación de estos dos RCV para estudios de organogénesis indirecta.

Estas plantas lograron ser aclimatadas en un sustrato de 1:1 de perlita y turba, con un riego diario en condiciones de radiación solar reducida de 70% mediante sombra, y a una temperatura de 24°C y riego somero diario.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aguilar J., D., y Rodríguez De la O, J. L. (2018). ***Micropropagation and acclimatization of Maguey Pitzometl (Agave marmorata RoezI) in the poblana Mixteca; Micropropagación y aclimatación de Maguey Pitzometl (Agave marmorata RoezI) en la Mixteca Poblana***; Revista Colombiana de Biotecnología; Vol. 20, Núm. 2; 124-131; 1909-8758; 0123-3475.
<https://doiorg.dibpxy.uaa.mx/10.15446/rev.colomb.biote.v20n2.77084>.
2. Alcántara-Cortes, J. S.; Castilla-Pérez, M. G.; y Sánchez-Mora, R. M. (2017). ***Importancia de los cultivos vegetales In vitro para establecer bancos de germoplasma y su uso en investigación***. Revista digital Núm. 1. <https://hemeroteca.unad.edu.co/index.php/Biociencias/article/view/2222>
3. Ángeles-Espino, A.; Valencia-Botín, A.J.; Virgen-Calleros, G.; RamírezSerrano, C.; Predes-Gutiérrez, L. y Hurtado-de la Peña, S. (2012). ***Micropropagación de agave (Agave tequilana Weber. var. Azul a través de yemas axilares***. Tropical and subtropical Agroecosystems, Vol. 15 (3), pp: 693-698. Universidad Autónoma de Yucatán.
4. Aureoles-Rodríguez, F.; Rodríguez-de la O, J. L.; Legaria-Solano, J. P.; Sahagún-Castellanos, J.; Peña Ortega, M. G. (2008). ***Propagación in vitro del "maguey bruto" (Agave inaequidens Koch), una especie amenazada de interés económico***. Revista Chapingo serie horticultura, vol. 14, núm. 3. Pp: 263-269. Chapingo, México.
5. Barrón-Palomares, D.B.; Lavorin-Silvirian, F.; Tinoco-Ojanguren, C.; Peñalba, C; Reyes-Ortega I. y Molina-Freaner, F. (2018). ***Reproductive ecology of Agave colorata: the importance of nectar-feeding bats and the germination consequences of self-pollination***. Plant ecology, Springer Nature. no. 2019, pp: 927-939.
6. Bhojwani, S.S. y Dantu, P.K. (2013). ***Plant Tissue Culture: An Introductory Text***. Ed. Springer.

7. Binh, L., Muoi, L., Oanh, H., Thang, T., y Phong, D. (1990). ***Rapid propagation of agave by in vitro tissue culture***. Plant Cell, Tissue & Organ Culture, Vol. 23 (1) pp: 67-70.
8. Castro-Palafox, F. de L. (2016). ***El matorral costero de Baja California: un acercamiento a la problemática para su conservación. Retos y oportunidades***. Tesis de maestría en Administración integral del Ambiente. El colegio de la Frontera Norte, A.C. México. pp:123.
9. Chen, Y.; Chen X.; Hu, F.; Yue, I.; Trigiano, N.R.; Cheng, Z-M. (2014). ***Micropropagation of Agave americana***. HortScience, Vol. 52 (7), pp: 320327, American society for Horticultural Science.
10. Das, T. ***Micropropagation of Agave sisalana***. (1992). Plant Cell, Tissue and Organ Culture. Vol. 31, pp: 253-255.
11. Delgado-Lemus, A. y Casas A. (2014). ***Distribution, abundance and traditional management of Agave potatorum in the Tehuacán Valley Mexico: bases for sustainable use of non-timber forest products***. Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine, Vol.10 (1), pp: 63.
12. Domínguez Rosales M. S.; González, J. M. L; Rosales, G. C.; Quiñones, V. C.; Delgadillo, D. de L. S.; Mireles, O. S. J.; Pérez, M. B. E. M. (2008). ***El cultivo in vitro como herramienta para el aprovechamiento, mejoramiento y conservación de especies del género Agave***. Rev. Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes, no. 41, pp: 53-62. México.
13. Enríquez-del Valle, J. R., Estrada Sillas, A., Rodríguez Ortiz, G., Velasco Velasco, V. A., & Campos Ángeles, G. V. (2013). ***Sustrato y dosis de fertirriego en la aclimatización de vitroplantas de Agave americana var. oaxacencis***. Revista de La Facultad de Ciencias Agrarias, Vol. 45, no. 2, pp: 341–348.
14. Enríquez-del Valle, J.R.; Carrillo, C.G; y Rodríguez de la O J.L. (2005), ***Sales inorgánicas y ácido indolbutírico en el enraizado in vitro de brotes de Agave angustifolia***. Revista Fitotecnia Mexicana, Vol. 28, no. 2, pp: 175178. Sociedad mexicana de Fitogenética, A.C. Chapingo, México.
15. Espejel, I.; Jiménez-Orocio, O.; Castillo-Campos, G.; Garcillán, Pedro P.;

- Álvarez, L. ; Castillo-Argüero, S.; Durán, R.; Ferrer, M.: ; Infante-Mata, D.; Iriarte, Silvia; León de la Luz, J.L.; López-Rosas, H.; Medel, N. A.; Monroy, R.; Moreno-Casasola, P.; Rebman, J.P. ; Rodríguez-Revelo, N. ; SánchezEscalante, J.; Vanderplank, S.E. (2017). ***Flora on beaches and coastal sand dunes of México***. Acta botánica mexicana 121, pp:39-81. Instituto de Ecología A.C. Centro Regional del Bajío.
16. García Mendoza, A. J., Franco Martínez, I. S., & Sandoval Gutiérrez, D. (2019). ***Four new species of Agave (Asparagaceae, Agavoideae) from southern Mexico ; Cuatro especies nuevas de Agave (Asparagaceae, Agavoideae) del sur de México***. Acta Botánica Mexicana, no.126. Instituto de Ecología A.C. <https://doi.org.dibpxy.uaa.mx/10.21829/abm126.2019.1461>
17. García-Barrón, S.E., Hernández, J.J., Gutiérrez-Salomón, A.L., EscalonaBuendía, H.B., Villanueva-Rodríguez, S.J. (2017). ***Mezcal y Tequila: análisis conceptual de dos bebidas típicas de México***. Revista Iberoamericana de Viticultura, Agroindustria y Ruralidad, Vol. 4 no.12, pp: 139.
18. García-Mendoza A.J. (2002). ***Distribution of Agave (Agavaceae) in México***. Cactus and succulent Journal, vol. 74 no. 4. Estados Unidos de Norte América.
19. García-Mendoza, A. J.; Cházaro, B. M. J.; Nieto, S. J.; Sánchez, T. L. F.; Tapia, C. E.; Gómez, L. J. F.; Tamayo, O. M.; Narváez, Z. J. A.; Rodríguez, G. B.; Palomino, H. G. A.; Martínez, R. J.; Martínez, R. J. C.; Quiñones, A. EE.; Rincón, E. G.; Beltrán, G. MJ.; Quí, Z. J. A.; Guzmán, M. R.; Mercado, F.Y.; Ragazzo, S. J. A.; Calderón, S. M.; Gutiérrez, M. A. (2017). ***Panorama del aprovechamiento de los Agaves en México***. Ed. Red Temática Mexicana Aprovechamiento Integral sustentable y Biotecnología de los Agaves (AGARED). Jal. México.
20. García-Mendoza, A.J. (2007). ***Los agaves de México***. Rev. Ciencias Vol. 87 no. 87, pp: 14-23. Universidad Autónoma de México. Recuperado en Mayo de 2019 de <https://www.revistaciencias.unam.mx/en/48-revistas/revistaciencias-87/285-los-agaves-de-mexico.html>.
21. Garriga Carballo, M.; González Orama, G.; Alemán García, S.; Abreu Cruz,

- E.; Quiroz, Bravo, K.; Calgary, P.D.S.; García-González, R. (2010). **Management of auxin-cytokinin interaction to improve micropropagation protocol of Henequen (*Agave fourcroydes* Lem.)** Chilenan Journal of Agricultural Research. Vol. 70, no. 4, pp: 545–551, Chile.
22. Gentry, H. S. (1982). **Agaves of Continental North America**. University of Arizona Press. U.S.A.
23. Gentry, H. S. (1978). **The Agaves of Baja California**. Occasional papers of the California Academy of Sciences.
24. George, E. F.; Hall, M. A. & De Klerk G-J. (2008). **Plant propagation by tissue culture**. Vol. 1, ISBN: 978-1-4020-50004-6. Plant cell tissue and organ culture.
25. Herrera, J. C. C., Leirana-Alcocer, J. L., y Alberto, J. A. N. (2018). Factores ambientales relacionados con la cobertura de *Agave angustifolia* (Asparagaceae) en el matorral costero de Yucatán, México. 124, pp: 75–84.
26. Hustado, M. D. V. y Merino, M. M. E. (1997). Cultivo de Tejidos Vegetales. pp: 35-85. Ed. Trillas. México.
27. Integrated Taxonomic Information System, On-line database (2019). https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=182693#null
28. Miguel Luna, M.E.; Enríquez del Valle, J.R.; Velasco, V. V.A; Villegas A. Y.; Carrillo, R. J.C. (2015). **Concentración de Benciladenina, tipo y dosis de carbohidratos en el medio de cultivo para proliferación de brotes de *Agave americana*; Benzyladenine concentration, type and dose of carbohydrates in the culture medium for shoot proliferation of *Agave americana***. Rev. FCA Universidad de CUYO. Vol. 46 no. 1, pp. 97107. Argentina.
29. Murashige, T.; Skoog, F. 1962. **A revised medium for rapid growth and bioassays with Tobacco Tissue cultures**. Physiology Plant. no. 43.15, pp: 473- 497. <http://files.florestal81.webnode.com/200000040-03153040fe/07%20Artigo%20MS%201962.pdf>

30. Nikam, D. T., Bansude, M. G., Aneesh-Kumar, C. K., (2003). **Somatic embryogenesis in sisal (*Agave sisalana* Perr. Ex Engelm)**. Plant Cell Reports vol. 22, pp.:188-194. Germany.
31. Peinado, M., Aguirre, J. L., Macias, M. A., Ocaña-Peinado, F. M., & Delgadillo, J. (2011) **Bioclimates and vegetation along the Pacific basin of Northwestern Mexico**. Plant Ecology, no. 2, pp: 263–281. <https://doi.org.dibpxy.uaa.mx/10.1007/s11258-010-9820-z>.
32. Pérez-Molphe, B. E. M. (2019), **Curso de Cultivo de Tejidos Vegetales, Biotecnología Vegetal**. Material de apoyo. Universidad Autónoma de Aguascalientes.
33. Puente-Garza, C.A.; Gutiérrez-Mora, Antonia; García-Lara, S. (2015) **Micropropagation of *Agave salmiana*: Means to Production of Antioxidant and Bioactive Principles**. Ed. United States, North America: Frontiers Media S.A. Recuperado en enero de 2020 de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4655248/>
34. Ramírez-Malagón, R.; Borodanenko, A.; Pérez-Moreno, L.; Salas-Araíza. 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 Organ Culture, Vol. 94. Pp: 201-207. Springer Science + Business Media B.V.
35. Salisbury, F. B. y Ross, C. W. (1993) **Fisiología Vegetal**. 3 th edicio. Ed. Gupo editorial Iberoamericano.
36. Sánchez-Urbina, A.; Ventura-Canseco, L. M. C.; Ayora-Talavera, T.; AbudArchila, M.; Pérez-Farrera, M.A.; Dendooven, L. y Gutiérrez Miceli, F. A. (2008). **Seed germination and in vitro propagation of *Agave grijalvensis* an endemical endangered Mexican species**. Asian journal of Plant Science. Recuperado en diciembre del 2019: https://www.researchgate.net/publication/26556093_Seed_Germination_and_in_vitro_Propagation_of_Agave_grijalvensis_an_Endemic_Endangered_Mexican_Species/link/5419a7bf0cf203f155ae0bac/download
37. Santacruz-Ruvalcaba, F.; Gutierrez-Pulido, H. y Rodriguez-Garay, B. (1999). **Efficient in vitro propagation of *Agave parrasana* Berger**. Plant cell Tissue

- and Organ Culture vol. 56. Pp 163-167. Kluwer Academy Publishers. Holanda.
38. Segretín, M.E. (2006). **Los cultivos celulares y su aplicación**. Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología. Argentina. http://www.argenbio.org/images/La_biotecnologia/Cap_2/Cultivos celulares II.pdf
39. Silos-Espino, H., et al., (2007). **Chemical composition and in vitro propagation of Agave salmiana Gentry**. The Journal of Horticultural Science and Biotechnology. Vol. 82, pp: 355-359.
40. Smith, G. F. y Steyn, E. M. A. (2002). **The first record of Agave celsii var. albicans (Agavaceae), a Mexican plant, in South Africa**. South African Journal of Botany vol.68, pp: 397-400.
41. Stallcup, J.A., J.M. Randall, T. Smith, B.S. Cohen, C. Guerrero Ávila, M.A. Vargas y S.A. Morrison, (2015). **Iniciativa binacional de conservación de Las Californias: Análisis decenal del Estado de la conservación en la Región fronteriza entre California y Baja California**. Un informe de Conservation Biology Institute, Terra Peninsular, Pronatura Noroeste, y The Nature Conservancy. Pp. 48. Recuperado en Enero de 2020 de: https://d2k78bk4kdhbpr.cloudfront.net/media/content/files/LasCals2report_2015-10-3_SP.pdf
42. Trejo, L. (2017). **De dioses a hipsters: el resurgimiento del pulque, una moda de antigua tradición**. Oikos, Los Agaves del campo, no. 1, pag. 14-19. Instituto de ecología UNAM.
43. Valenzuela-Sánchez, K. K.; Juárez-Hernández, E. R.; Cruz-Hernández, A.; Olalde-Portugal, V.; Valverde, M. E. & Paredes-López, O. (2006). **Plant Regeneration of Agave tequilana by Indirect Organogenesis**. In Vitro Cellular & Developmental Biology. Plant, vol. 42, no. 4, pp:336. <https://journals.ashs.org/hortsci/view/journals/hortsci/52/7/article-p996.xml>
44. Vanderplank S.E. (2011). **La flora del gran San Quintín, Baja California México (2005-2010)**. Aliso: A Journal of Systematic and Evolutionary Botany, vol.29, pp. 65-106. California, E.U.

45. Vanderplank S.E., Rebman J. Y Ezcurrea. E. (2019). **Revised and update vascular plant checklist for the Baja California Northern Pacific Island.** Western North American Naturalist Vol.78 no.4, pp: 674-698.
46. Vanderplank, Sula Elizabeth; Delgadillo, José; Ezcurrea, Exequiel; Mcdade, Lucinda A. (2014). **Vegetation patterns in the Mediterranean-desert ecotone of Baja California, México.** Journal of the Botanical Research Institute of Texas. Vol. 8, Pages 565—581. Texas, E.U.
47. Vanderplank, S. E.; Peralta García A.; Valdez Villavicencio, J. H. y De la Rosa C. (2017). **Botanical Miscellany**, No. 46, Botanical Research of Texas Press, ISBN 13: 978-1-889878-51-5 ISSN: 0833-1475.
48. Vanderplank, S. E.; Rebman, J. y Ezcurrea, E. (2018). **Where to conserve? Plant biodiversity and endemism in Mediterranean Mexico.** Biodiversity and conservation. No.27, pp: 1-14 Springer.
49. Webb R.H y Starr G. (2015). **Gentry Revisited: the agaves of the peninsula of Baja California, México,** Haseltonia 2015 no. 20, pp: 64-108. <https://doi.org/10.2985/026.020.0101>.

