



CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

TESIS

**DESARROLLO DE SISTEMAS DE PROPAGACIÓN *in vitro* PARA
Agave colimana, *A. convallis* y *A. guadalajarana***

PRESENTA

I.A.I. Casandra Díaz Reyna

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS

ÁREA BIOTECNOLOGÍA VEGETAL

TUTOR

Dr. Eugenio Pérez Molphe Balch

COMITÉ TUTORAL

Dra. Yenny Adriana Gómez Aguirre

Dra. Lucía Isabel Chávez Ortiz

Aguascalientes, Ags., 14 de Abril del 2025



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
Departamento de Química

M. en C. Jorge Martín Alférez Chávez
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
PRESENTE

Por medio del presente y como **Miembros del Comité Tutoral** designado de la estudiante de la Maestría en Ciencias área Biotecnología Vegetal **CASANDRA DIAZ REYNA** con ID 195982, quien realizó la tesis titulada: "**DESARROLLO DE SISTEMAS DE PROPAGACIÓN *in vitro* PARA *Agave colimana*, *A. convallis* y *A. guadalupensis***", afirmamos que se trata de un trabajo propio, innovador, relevante e inédito. Asimismo, le informamos que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones hechas se le han incorporado apropiadamente. Por lo anterior, y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes, emitimos este **VOTO APROBATORIO** y damos nuestro consentimiento para que la estudiante pueda imprimir su tesis y realizar el procedimiento administrativo necesario para la programación del examen de grado.

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

ATENTAMENTE
"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 6 de mayo de 2025

Dr. Eugenio Martín Pérez Molphe Balch
Tutor de Tesis

Dra. Yenhy Adriana Gómez Aguirre
Asesora de tesis

Dra. Lucía Isabel Chávez Ortiz
Asesora de Tesis

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

Elaborado por: Depto. Apoyo al Posgrado
Revisado por: Depto. Control Escolar/Depto. Gestión de Calidad
Aprobado por: Depto. Control Escolar/ Depto. Apoyo al Posgrado

Código: 00-521-FO-16
Actualización: 00
Emisión: 17/05/19

CASANDRA DIAZ REYNA
ESTUDIANTE DE LA MAESTRÍA
EN CIENCIAS AREA DE BIOTECNOLOGÍA VEGETAL O TOXICOLOGÍA
P R E S E N T E.

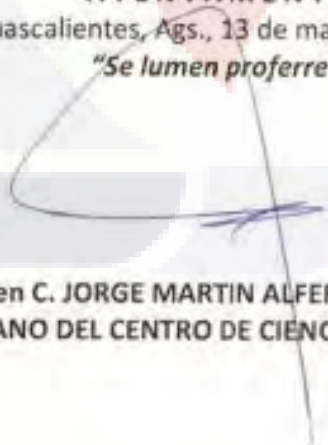
Estimada Alumna:

Por medio de la presente me permito comunicar a Usted que habiendo recibido los votos aprobatorios de los revisores de su trabajo de tesis y/o trabajo práctico titulado: **"DESARROLLO DE SISTEMAS DE PROPAGACIÓN in vitro PARA Agave colimana, A. convallis y A. guadalajarana"**, se autoriza la impresión de la tesis y la continuidad del proceso administrativo para la obtención del grado.

Sin otro particular por el momento, me despido aprovechando la oportunidad para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE

Aguascalientes, Ags., 13 de mayo del 2025
"Se lumen proferre"


M. en C. JORGE MARTIN ALFEREZ CHAVEZ
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

c.c.p.- Secretaría Técnica Del Programa De Posgrado
c.c.p.- Archivo

Fecha de dictaminación dd/mm/aa: 5/6/2025

NOMBRE: Casandra Diaz Reyna ID 195982

PROGRAMA: Maestría en Ciencias área Biotecnología vegetal y Toxicología LGAC (del posgrado): Biotecnología vegetal

TIPO DE TRABAJO: (x) Tesis () Trabajo práctico

TITULO: Desarrollo de sistemas de propagación *in vitro* para *Agave colimana*, *A. convallis* y *A. guadalajara*
La creación de un protocolo de propagación masiva *in vitro* de *A. colimana*, *A. convallis* y *A. guadalajara*, las cuales se encuentran

IMPACTO SOCIAL (señalar el impacto logrado): amenazadas o en peligro de extinción.

INDICAR SI/NO 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
- N/A 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

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:

- N/A Aceptación o Publicación de los artículos según el nivel del programa
- N/A El estudiante es el primer autor
- N/A El autor de correspondencia es el Tutor del Núcleo Académico Básico
- N/A En los artículos se ven reflejados los objetivos de la tesis, ya que son producto de este trabajo de investigación.
- N/A Los artículos integran los capítulos de la tesis y se presentan en el idioma en que fueron publicados
- N/A 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 ADSCRIPCION:

Yenny Adriana Gómez A.
Dra. Yenny Adriana Gómez Aguirre

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO TÉCNICO:

Elsa Marcela Ramírez López
Dra. en C. Elsa Marcela Ramírez López

* 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:

Dr. en C. Alejandro Padilla Díaz

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 CONAHCYT por la beca otorgada 835903 y permitirme continuar con el apoyo durante el posgrado como sostén económico para la continuación de mis estudios.

A la Universidad Autónoma de Aguascalientes por brindarme la oportunidad de ser parte del programa de posgrados, por los excelentes profesores, áreas de trabajo y facilidades en la obtención de herramientas que fuesen necesarias para desarrollar el proyecto de tesis.

Al Dr. Eugenio Pérez Molphe Balch, por su paciencia y confiar en que podía ser capaz de realizar el proyecto de investigación designado para mí.

A la Dra. Lucía Isabel Chávez Ortiz, por su tiempo y asesorías, no solo en el proyecto de tesis, si no en consultas para presentación de seminario, entre otras actividades.

A la Dra. Yenny Adriana Gómez Aguirre, por su tiempo en la meticulosa revisión de cada uno de los avances de tesis y su muy clara manera de explicar cuando se le consulta.

Contenido

1.	INTRODUCCIÓN	8
2.	ANTECEDENTES	10
2.1	Generalidades del género <i>Agave</i>	10
2.1.1	Descripción botánica (morfología)	12
2.1.2	Importancia de los agaves	14
2.1.3	Reproducción de los agaves	16
2.2	Generalidades de <i>Agave colimana</i>	18
2.2.1	Datos Taxonómicos	19
2.2.2	Descripción botánica (morfología).....	19
2.2.3	Origen y distribución.....	21
2.2.4	Estado actual de conservación	22
2.3	Generalidades de <i>Agave convallis</i>	22
2.3.1	Datos Taxonómicos	23
2.3.2	Descripción botánica (morfología).....	24
2.3.3	Origen, distribución u usos	25
2.3.4	Estado actual de conservación	26
2.4	Generalidades de <i>Agave guadalajara</i>	27
2.4.1	Datos Taxonómicos	27
2.4.2	Descripción botánica (morfología).....	28
2.4.3	Origen y distribución.....	29
2.4.4	Estado actual de conservación	30
2.5	Propagación <i>in vitro</i>	31
2.5.1	Cultivo en medio semisólido	31

2.5.2	Etapas de la micropropagación.....	33
2.6	Antecedentes sobre el cultivo y propagación <i>in vitro</i> de agaves.....	35
3	Justificación	39
4	Hipótesis	39
5	Objetivos	40
5.1	Objetivo General	40
5.2	Objetivos específicos	40
6.	Impacto social	41
7.	Metodología	41
7.1	Medio de cultivo	41
7.2	Propagación del material vegetal a partir de explantes basales que contienen meristemos	42
7.3	Evaluación de las respuestas morfogénicas ante tratamientos con citocininas.....	43
7.4	Evaluación de las respuestas morfogénicas ante tratamientos con citocinina y auxina en las especies de interés	44
7.5	Aclimatación a condiciones <i>ex vitro</i>	44
8	Resultados	45
8.1	Multiplicación de brotes <i>in vitro</i> de las especies <i>Agave colimana</i> , <i>A. convallis</i> y <i>A. guadalajarana</i> a partir explantes basales que contienen meristemos cultivados en medios adicionados con citocininas.....	45
8.1.1	Inducción y formación de brotes:	45
8.1.2	Respuestas adicionales a la formación de brotes	51
8.2	Respuesta morfogénica de los explantes <i>in vitro</i> ante tratamientos con auxinas y citocininas en el medio de cultivo de las especies de interés.....	55
8.2.1	Formación de tejido calloso.....	55

8.2.2 Respuestas adicionales a la formación de tejido calloso	56
8.3 Aclimatación y trasplante de plántulas obtenidas <i>in vitro</i> para su vida <i>ex vitro</i>	57
9. Discusión.....	60
9.1 Multiplicación de brotes <i>in vitro</i> de las especies <i>Agave colimana</i> , <i>A. convallis</i> y <i>A. guadalajarana</i> a partir de explantes basales cultivados en medios semisólidos adicionados con citocininas.	60
9.2 Respuesta morfogénica de los explantes <i>in vitro</i> ante tratamientos con auxinas y citocininas en el medio de cultivo de las especies de interés.....	61
9.3 Aclimatación y trasplante de plántulas obtenidas <i>in vitro</i> para su vida <i>ex vitro</i>	62
10. Conclusión	64
11. Referencias.....	66

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Jerarquía Taxonómica <i>Agave colimana</i> Gentry. Herbario Nacional de México (MEXU).	19
Tabla 2. Jerarquía Taxonómica <i>Agave convallis</i> Gentry. Herbario Nacional de México (MEXU).	23
Tabla 3. Jerarquía Taxonómica <i>Agave guadalajarana</i> . Herbario Nacional de México (MEXU).	28
Tabla 4. Antecedentes sobre el cultivo y propagación <i>in vitro</i> de especies del género <i>Agave</i> . Actualizada de Domínguez <i>et al.</i> , (2008).	36
Tabla 5. Medio basal de Murashige y Skoog, 1962.	41
Tabla 6. Respuestas diferentes a la formación de brotes en <i>A. colimana</i> , <i>A. convallis</i> y <i>A. guadalajarana</i> con la adición de citocininas.	52
Tabla 7. Respuestas diferentes a la formación de tejido calloso en <i>A. colimana</i> , <i>A. convallis</i> y <i>A. guadalajarana</i> con combinación de citocinina y auxina picloram. ...	57
Tabla 8. Porcentaje (%) de supervivencia 22 días después a condiciones <i>ex vitro</i> de <i>A. colimana</i> , <i>A. convallis</i> y <i>A. guadalajarana</i> con Raizone y polvo micorrízico.	58

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución de la familia <i>Agavaceae</i> . Tomado de García-Mendoza y Galván (1995)	11
Figura 2. <i>A. colimana</i>	18
Figura 3. Secciones largas de flores Filifeae, números de colección se muestra debajo de cada especie.	20
Figura 4. Distribución de <i>A. colimana</i>	21
Figura 5. <i>A. convallis</i>	23
Figura 6. Distribución de <i>Agave convallis</i>	26
Figura 7. <i>A. guadalajarana</i>	27

Figura 8. Flores de <i>A. guadalajarana</i>	29
Figura 9. <i>Distribución de A. guadalajarana</i>	30
Figura 10 Explicación del corte del explante en <i>Agave convallis</i>	43
Figura 11. Etapas en la propagación <i>in vitro</i> de <i>A. guadalajarana</i>	46
Figura 12. Respuesta morfogénica de brotes por explante ante tratamientos con BA, 2iP y mtp. en concentraciones de 1, 2 y 3 mg L ⁻¹	47
Figura 13. Brotes de <i>Agave colimana</i> (A), <i>A. convallis</i> (B) y <i>A. guadalajarana</i> (C) después de 60 días.....	48
Figura 14. Explante de <i>Agave colimana</i> después de 60 días.....	49
Figura 15. Explantes diferenciados de <i>Agave convallis</i>	50
Figura 16. Explantes con sistema radicular después de 90 días de <i>Agave guadalajarana</i>	50
Figura 17. Masas de brotes indiferenciados en los distintos tratamientos con BA, 2iP y metatopolina en concentraciones de 1, 2 y 3 mg L ⁻¹	53
Figura 18. Altura máxima en centímetros ante tratamientos con citocinina BA, 2iP y metatopolina en concentraciones de 1, 2 y 3 mg L ⁻¹	54
Figura 19. Diámetro en cm de cada explante para la formación de tejido calloso en combinaciones de auxina con citocinina.....	55
Figura 20. Formación de tejido calloso en <i>A. colimana</i> (A, B y C) con MTP y Picloram; <i>A. convallis</i> (D, E y F) y <i>A. guadalajarana</i> (G, H y I). Citocininas y picloram.....	56
Figura 21. Plantas adaptadas a condiciones <i>ex vitro</i> después de 22 días. Tratamiento con raíces impregnadas con polvo enraizador Raizone® (A, C y E), y en tratamiento con raíces impregnadas con biofertilizante micorrízico en polvo <i>Glomus intaradices</i> (B, D y F).	59

RESUMEN

Agave colimana, *A. convallis* y *A. guadalajarana* son especies que se encuentran amenazadas. Sus poblaciones se encuentran en peligro, severamente fragmentadas y con una gran disminución de individuos maduros. Debido a su escasez, es importante encontrar métodos eficientes para la obtención de plantas que puedan utilizarse en investigación o aprovechamiento racional.

Se logró la propagación *in vitro* mediante meristemos cultivados en medio de cultivo Murashige y Skoog, con 30 g L⁻¹ de sacarosa, y 8 g L⁻¹ de agar y suplementado con las citocininas 6-bencilaminopurina (BA), o 6-(γ,γ -dimetilalilamino), purina (2iP) y metatopolina. El mejor tratamiento para la inducción de brotes por explante consistió en MS suplementado con 1 mg L⁻¹ metatopolina para *A. colimana*, 1 mg L⁻¹ BA para *A. guadalajarana* y 2 mg L⁻¹ BA para *A. convallis*. Aunque en este última no hay diferencia estadística con el tratamiento de 1 mg L⁻¹, fue la que tuvo un crecimiento más tardío en todos los tratamientos de las tres especies. Se observaron otras respuestas interesantes, como la formación de masas de brotes indiferenciados, e inducción de raíces con 2iP y sin reguladores de crecimiento vegetal (RCV) en algunos tratamientos.

En cuanto a las respuestas morfogénicas, se escogió el mejor tratamiento de citocinina según la especie y fue posteriormente combinado con la auxina picloram en proporciones 1:1, 1:2 y 2:1. Se observó la formación de tejido calloso en todos los tratamientos de las tres especies. Finalmente se procedió a la aclimatación y transferencia a suelo de plantas generadas *in vitro*. Para esto fueron transferidas a charolas con sustrato de turba PeatMoss y agrolita en proporción 1:1. Las raíces fueron impregnadas con polvo enraizador (Raizone) o biofertilizante micorrizico en polvo *Glomus intraradices*. Se evaluó la supervivencia después de 3 semanas resultando en porcentajes mínimos de 81.25% y 75% respectivamente.

ABSTRACT

Agave colimana, *A. convallis* and *A. guadalajarana* are threatened species, Their populations are endangered, severely fragmented, and with a significant decrease in mature individuals. Due to their scarcity, it is important to find efficient methods for obtaining plants that can be used in research or rational exploitation.

In vitro propagation through meristems cultivated in semi-solid media was achieved using Murashige and Skoog culture medium, with 30 g L⁻¹ sucrose and 8 g L⁻¹ agar, and supplemented with the cytokinins 6-benzylaminopurine (BA), 6-(γ,γ -dimethylallylamino)purine (2iP), and metatopolin. The best treatment for shoot induction per explant consisted of MS medium supplemented with 1 mg L⁻¹ metatopolin for *A. colimana*, 1 mg L⁻¹ BA for *A. guadalajarana*, and 2 mg L⁻¹ BA for *A. convallis*. Although in the latter there was no statistical difference with the 1 mg L⁻¹ treatment, it exhibited the slowest growth across all treatments in the three species. Other interesting responses were observed, such as the formation of undifferentiated shoot masses and root induction with 2iP and without plant growth regulators (PGR) in some treatments.

Regarding morphogenetic responses, the best cytokinin treatment for each species was selected and subsequently combined with the auxin picloram in 1:1, 1:2, and 2:1 ratios. Callus tissue formation was observed in all treatments for the three species. Subsequently, *in vitro* generated plants were acclimatized and transferred to trays with a 1:1 peat moss and agrolite substrate. Roots were impregnated with rooting powder (Raizone) or *Glomus intraradices* mycorrhizal biofertilizer powder. Survival was evaluated after 3 weeks, resulting in minimum percentages of 81.25% and 75%, respectively.

1. INTRODUCCIÓN

El género *Agave* es endémico de América, hoy en día se reconocen cerca de 220 y al menos 159 de las mismas se encuentran en México, lo cual equivale a un 75% aproximadamente. Por este motivo se considera a México como el centro de mayor riqueza, origen y diversidad de este género (García-Mendoza 2007; 2010; Kablan *et al.*, 2024).

Con respecto a la taxonomía de los agaves, se considera que la clasificación más adecuada fue la realizada por Gentry (1982). La diferencia más notable radica en su estructura floral, donde el subgénero *Littaea* se divide en 8 grupos con 53 especies, se caracteriza por su inflorescencia espigada. Por su parte, el subgénero *Agave*, se divide en 12 grupos con 83 especies, que en conjunto resultaba en este tiempo en 136 especies, número que como se menciona anteriormente ya fue actualizado a 220 (Kablan *et al.*, 2024). Los agaves muestran una inflorescencia paniculada y es importante aclarar que el grupo no es una categoría taxonómica de acuerdo con el Código de Nomenclatura Botánica, pero es práctico para agrupar especies (García-Mendoza 2007, 2010).

Los agaves son plantas vivaces y adaptadas a condiciones de aridez. Tienen raíces muy ramificadas, cutícula gruesa, hojas suculentas con estomas hundidos y hojas en espiral dispuestas en rosetas alrededor de un tallo. Este puede ser corto, con algunos centímetros del suelo, o largo y erecto con hasta tres metros de altura al nivel del suelo. En este último caso, algunas especies presentan un tallo que se dobla hacia el sustrato, dificultando su observación, ya que a veces surgen rosetas a lo largo y tienden a quedar cubiertos por hojas secas. Presentan un metabolismo fotosintético tipo CAM (García-Mendoza 2010; Domínguez *et al.*, 2008).

A pesar de que los agaves son uno de los grupos vegetales más representativos de México, hay varias especies que han sido poco estudiadas en cuanto a su reproducción, procesamiento comercial y conservación. Esto debido a que la mayoría de los trabajos en este sentido se han enfocado en especies usadas para

la producción de tequila, mezcal, aguamiel, pulque, fibras, etc. (Domínguez *et al.*, 2008).

Agave colimana es una especie distribuida principalmente en sitios rocosos junto al mar en Jalisco y Colima; *A. convallis* se distribuye desde el centro de Hidalgo hasta el sur de Oaxaca. y; *A. guadalajarana* forma parte de las especies de *Agave* características de Jalisco, México. (Domínguez *et al.*, 2008; Torres-García *et al.*, 2019). Su hábitat son pastizales abiertos, cerca de robles, zona montañosa cerca de la ciudad de Guadalajara y en algunos sustratos volcánicos. En las tres especies antes mencionadas, se presentan poblaciones severamente fragmentadas y, en caso de la última, su población se encuentra en peligro y decreciendo (Torres-García *et al.*, 2019).

En el presente documento se describen las respuestas morfogénicas ante tratamientos diseñados para generar un sistema de propagación *in vitro* de plantas de *Agave colimana*, *A. convallis* y *A. guadalajarana*.

2. ANTECEDENTES

2.1 Generalidades del género *Agave*

El género *Agave* se ubica actualmente en la familia *Asparagaceae*. Es endémico de América, su distribución geográfica abarca desde el sur de Canadá hasta el norte de Sudamérica, como se aprecia en la figura 1. De aproximadamente 220 especies, al menos 159 se encuentran en México lo cual equivale a un 75% aproximadamente (García-Mendoza, 2007, 2010, 2020; Bautista-Montes, 2022).

Como contexto histórico, *Agave* se ubicaba anteriormente en la familia *Agavaceae*, que comprendía ocho géneros (*Yucca*, *Hesperaloë*, *Frurcraea*, *Beschorneria*, *Agave*, *Manfreda*, *Polianthes*, *Prochnyanthes*), todos presentes en México (Gentry, 1982; Eguiarte, *et al.*, 1994, 2000); sin embargo, Chase *et al.* (2009), al proponer la inclusión de *Agave* en *Asparagaceae*, recomendaron la creación de siete subfamilias (*Agavoideae*, *Aphyllanthoideae*, *Asparagoideae*, *Brodiaeoideae*, *Lomandroideae*, *Nolinoideae* y *Scilloideae*), argumentando que facilitaría la enseñanza de dichas subfamilias. García-Mendoza *et al.* (2020) mencionaron la controversia sobre esta nueva ubicación taxonómica en *Asparagaceae*, mientras que Campbell *et al.* (2016) proponen reconocer nuevamente a *Agavaceae*, constituida por 25 géneros y 637 especies.

Como característica de los agaves, algunos de los géneros se denominan iteróparos ya que pueden reproducirse varias veces, y otros semélparos, cuando producen una sola inflorescencia en su vida antes de morir. Presentan una gran variedad de morfologías florales y polinizadores como abejas, murciélagos, colibríes y polillas (Gentry, 1982; Eguiarte, *et al.*, 1994, 2000; García-Mendoza, 2009; Kablan *et al.*, 2024).



Figura 1. Distribución de la familia *Agavaceae*. Tomado de García-Mendoza y Galván (1995)

Como breve perspectiva histórica de la difusión del agave, se sabe de su cultivo desde el núcleo original en el altiplano mesoamericano, se expandió rápidamente después que los españoles iniciaran la colonización de las regiones del norte del actual México, como Durango y Saltillo. Los náhuatl, empleados como intérpretes, peones y agricultores, desempeñaron un papel crucial en esta expansión, llevando el maguey con ellos y establecieron su cultivo para la obtención de pulque. Por otro lado, los españoles y portugueses fueron aparentemente los que llevaron los agaves a otros continentes para usos ornamentales y de producción de fibra (Gentry, 1982). Un ejemplo de estas exportaciones son las mencionadas por Domínguez *et al.*, (2008), con *Agave americana*, llevada a las islas Azores, Canarias y parte del Mediterráneo por los europeos, donde se convirtió en una especie ornamental muy importante, o el de las especies *A. cantala* y *A. sisalana*, usadas como productoras de fibra en industrias coloniales de Indonesia, Filipinas y África del Este.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

A pesar de que los agaves son uno de los grupos vegetales más representativos de México, hay varias especies que han sido poco estudiadas en cuanto a su reproducción, procesamiento comercial y conservación. La mayoría de los trabajos en este sentido se han enfocado en especies usadas para la producción de tequila, mezcal, aguamiel, pulque, fibras, etc., lo que ha puesto en peligro la diversidad del germoplasma en agaves utilizados para la producción de bebidas. La expansión de un cultivo clon de especies en demanda ocasiona erosión en los suelos, contaminación química, desplazamiento de cultivos tradicionales, entre otras cuestiones, siendo *A. tequilana* variedad azul Weber la especie con mayor importancia económica, conocida también por el nombre Agave azul y la utilizada para la producción de tequila (Nava-Cruz *et al.*, 2014; Pérez *et al.*, 2016; Ramírez-Rodríguez, 2020).

Las partes de la planta que no se utilizan en las industrias mencionadas anteriormente han servido para otro propósito. Por ejemplo, las hojas, que varían en número de 5 hasta 200 según la especie, sirven de forraje para el ganado. Los tallos (piñas) y quiotes (inflorescencias inmaduras) son parte de la dieta de muchas regiones. El aguamiel obtenido de la piña es también un complemento en la dieta de pobladores que viven en zonas áridas, y el procesamiento de la miel de maguey sirve para obtener fructuosa como base de otro tipo de industria (García-Mendoza, 2007; Domínguez *et al.*, 2008; Pérez *et al.*, 2016).

2.1.1 Descripción botánica (morfología)

García-Mendoza (2007) explica que los magueyes son plantas xerófitas, es decir, que tienen adaptaciones para sobrevivir en ambientes con escasez de agua, característicos de climas desfavorables con altas temperaturas. Los agaves cuentan con una morfología especializada para estas condiciones adversas.

Las hojas de los agaves desarrollaron succulencia, una cualidad que les permite almacenar agua con el fin de sobrevivir durante un tiempo en ausencia de este

suministro, lo cual es una ventaja en comparación con otro tipo de plantas que no cuentan con esta característica porque tienen una mayor disponibilidad de agua en su medio ambiente. El desarrollo de fibras en los tejidos de las hojas mantiene la rigidez durante los periodos de pérdida de agua para que los tejidos no se deformen, esto se logra junto con los dientes en el margen de las hojas y una espina terminal (García-Mendoza, 2007).

La absorción de agua es facilitada por el sistema superficial de las raíces, pero igualmente dependerá de qué tan larga sea la sequía y de cuánto volumen de agua y carbohidratos logró almacenar en épocas más favorables. Mientras dure la época seca, el agua almacenada ayudará a mantener las reacciones bioquímicas y la apertura de estomas para la asimilación de carbono (CO₂). Otras características de los agaves para evitar la transpiración en exceso son la acumulación de cera en la superficie de las hojas y la presencia de estomas que debido a su mecanismo fotosintético CAM se abre por la noche. Por su arreglo en el espacio, las hojas se dan sombra unas a otras las hojas (filotaxia) (García-Mendoza, 2007; Andrade *et al.*, 2007).

El metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM), es bastante común en varios géneros de la familia *Asparagaceae*. Esta especialización fisiológica es una adaptación a una alta radiación y baja humedad. A diferencia de la fotosíntesis C3 y C4, este metabolismo es de transpiración nocturna: los estomas se abren en la noche y hacen el intercambio gaseoso donde se fija el CO₂ con el uso de la enzima fosfoenol piruvato carboxilasa (PEPC) (Andrade *et al.*, 2007). El producto de cuatro carbonos es fijado en ácidos orgánicos, principalmente ácido málico, el cual es almacenado en las vacuolas. Durante el día, el ácido málico sufre una descarboxilación para liberar el CO₂ usado para la producción de carbohidratos. Este metabolismo se especializa en la ganancia de carbono con una pérdida mínima de agua (Gentry, 1982; García-Mendoza, 2007; Andrade *et al.*, 2007).

Algunas especies de gran importancia económica tienen este tipo de metabolismo, como *Agave fourcroydes*, *A. lechuguilla*, *A. tequilana* y *A. americana*, que fue la

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

primera especie que demostró ser una planta con metabolismo CAM (García-Moya *et al.*, 2011; García-Mendoza, 2007). Un ejemplo de planta *Agave* con un metabolismo distinto es *A. deserti*, que presenta metabolismo fotosintético C3, pero solo brevemente en las mañanas, y *A. mapisaga*, donde ocurre independientemente de si es mañana o tarde (García-Mendoza, 2007).

En la actualidad, es de gran importancia resaltar los efectos que el cambio climático tienen o podrían tener en la productividad del agave. Se ha visto que el aumento de los niveles de CO₂ atmosférico modifica la morfología y anatomía de las plantas CAM, por ejemplo, con la expansión de las raíces y el rápido desarrollo de los brotes (Nobel, 2010; García-Moya *et al.*, 2011).

2.1.2 Importancia de los agaves

En Mesoamérica los agricultores fomentaron una evolución explosiva en la diversificación del agave. Al establecerse los grupos humanos en estas regiones, desarrollaron importantes centros agrícolas con la domesticación y diversificación mediante la selección humana. Seleccionaron individuos que presentaran características de acuerdo con sus intereses, en algunos casos por sus fibras en tallos y bases de las hojas: o por las altas cantidades de azúcares en el aguamiel, bebida ancestral y artesanal de la que también se obtiene el pulque. Aunque en la actualidad hay especies que no fueron domesticadas, esta selección artificial resultó en una gran diversidad morfológica, filogenética, evolutiva y también cultural (Gentry, 1982; García-Mendoza, 2007; Ramírez-Rodríguez, 2020).

Según Ramírez *et al.*, (2001), los códices mexicanos Boturini, también conocidos como Tira de la Peregrinación, mencionan que los aztecas, durante la migración al Valle de México, descubrieron el agave e "inventaron" el pulque entre 1172 y 1291 d.C. Sin embargo, registros arqueológicos señalan el uso del agave en esta región como alimento por los pobladores mesoamericanos desde hace 9000 años (Gentry, 1982; Domínguez *et al.*, 2008). Lo anterior es una prueba de que los agaves en

México, desde tiempos prehispánicos, han sido aprovechados y han tenido una gran relevancia cultural y económica para los pueblos indígenas, como alimento, bebida, medicina, biocombustible, fructanos, cobijo, ornato y fibras duras. Estos últimos usos se determinaron al encontrar restos de fibras masticadas, cordeles de ixtle y sandalias en cuevas del valle de Oaxaca, Tehuacán y Coahuila. Un ejemplo de su uso medicinal se encuentra en el escrito de 1780 titulado con el nombre "Virtudes maravillosas del Pulque, medicamento universal o polycresto", donde se indica que el pulque se usaba como purgante (García-Mendoza, 2007; Nava-Cruz *et al.*, 2014; Ramírez-Rodríguez, 2020).

Una de las primeras descripciones del agave fue reportada en 1830, donde se expone una clasificación de 33 variedades cultivadas en los llanos de Apan. Se incluyeron algunas descripciones morfológicas, y este escrito fue editado en 1837. A partir de entonces, los estudios posteriores fueron más rigurosos, incluyendo grabados de las pencas. En 1865, se publicó un libro titulado "Memoria sobre el maguey mexicano (*A. maximiliana*)" por los hacendados Pedro e Ignacio Blázquez. En él, exploran la importancia de los agaves en diversas áreas y un posterior manual agrícola que funcionaba como guía para el cultivo y cuidado de la planta y la elaboración de pulque como subproducto. Incluyeron la descripción de los instrumentos y herramientas para la extracción del aguamiel y su fermentación. En la actualidad, y desde hace algunos años, existe una enorme pérdida de suelos fértiles y retención de humedad en México. Por lo tanto, los agaves se visualizan de manera positiva para enfrentar los retos actuales, como el cambio climático. Estas plantas poseen características biológicas superiores, con una mayor eficiencia en el uso de agua y en la captación de CO₂ atmosférico. Además de su uso para diversas industrias, la más conocida es la industria tequilera; le siguen otras como la producción de carbohidratos a partir de las hojas y el tallo para ser convertidos en alcohol, pero también, como ya se ha mencionado, se pueden obtener muchos productos satisfactorios para el ser humano, como forraje, fibra, materiales de construcción, medicina, entre otros (Colunga-García *et al.*, 1993, 2007).

Al cultivarlos, los agaves se han adaptado a terrenos no tan convencionales. Las características de las raíces y su capacidad de captar humedad atmosférica son una ventaja para ser adaptados en una gran variedad de sistemas agrícolas, como los suelos en terrenos de alta pendiente, localidades de laderas, obras con terrazas, bordos o como ayuda para el control de escurrimientos de agua y la pérdida de suelo (Colunga-García *et al.*, 1993, 2007).

La diversidad del germoplasma y los procesos de producción han permitido visualizar un sistema de denominaciones de origen para los nuevos productos de mercados especializados. Se registraron en 24 entidades federativas 42 especies, 7 subespecies y 7 variedades comunes que reciben 259 nombres comunes, lo que indica un número semejante de variedades, procesos de producción y grupos étnicos asociados. Pérez *et al.* (2016) menciona que el tequila se puede producir solo en ciertas áreas por denominación de origen, incluyendo 181 municipios en cinco estados mexicanos; la mayoría se encuentran en Jalisco con 125. Al comparar estos datos con los reconocidos en la Denominación de Origen Mezcal, se aprecia la diferencia: en este solo están involucrados siete estados, y de esos, explícitamente cinco especies (Carrillo, 2007). Por esta razón, Colunga-García *et al.* (2007) sugieren la necesidad de replantear el concepto de Denominación de Origen Mezcal y la urgencia de replantear nuevas estrategias o modificar las existentes para el control y apoyo en la producción y comercialización de nuevos productos (Colunga-García *et al.*, 1993, 2007).

2.1.3 Reproducción de los agaves

Los agaves se reproducen sexual y asexualmente. La reproducción sexual ocurre en todas las especies del género, pero la reproducción asexual, mediante la producción de hijuelos, solo se presenta en algunas (García-Mendoza *et al.*, 2007). Según Trejo *et al.* (2023), la germinación de las semillas puede variar entre agaves cultivados y silvestres, incluso si son de la misma especie. El valor de cuajado de

las semillas es mayor en los agaves silvestres, como *A. americana*, *Agave salmiana* y *A. mapisaga*. La polinización es llevada a cabo principalmente por murciélagos nectarívoros, y en menor medida por insectos diurnos y nocturnos, como polillas y abejas. Los agaves del subgénero *Agave* son polinizados por los murciélagos *leptonycteris curasoae*, *L. nivalis*, *Choeronycteris mexicana* y *glossophaga* sp., por lo tanto, la transferencia de polen de una flor a otra es nocturna. Algunos otros agaves como *A. striada*, *A. kavandivi*, en cambio, son polinizados en su mayoría por insectos, lo que hace que la transferencia de polen sea diurna (Gentry, 1982; García-Mendoza, 2007, 2009; Pérez *et al.*, 2016).

La reproducción puede ser semélpara o monocárpica, donde las plantas mueren después de reproducirse. Este tipo de reproducción, poco común en plantas con flores, pudo ser el resultado de la coevolución, donde las plantas con mayor altura son más atractivas para los polinizadores, pero este despliegue floral causa la muerte de la planta al llegar a su punto máximo (García-Mendoza, 2007, 2009; Simcha, 2017). Otro caso es la reproducción iterópara o policárpica, donde el individuo no muere, sino solo la roseta que tiene la inflorescencia. Existen plantas solitarias, donde la roseta muere muchos meses después de la fructificación, mientras las hojas mantienen su turgencia; un ejemplo sería *A. convallis* (Gentry, 1982; García-Mendoza, 2007, 2009; Simcha, 2017).

Casi todos los agaves se reproducen asexualmente, esto mediante tallos vegetativos derivados del rizoma, emitidos por la planta. Los procesos de reproducción asexual producen clones en diferentes partes de la roseta o inflorescencia. Este mecanismo permite a las plantas ampliar su área de distribución, ya que los hijuelos se desarrollan en la base de la planta o por medio de estolones que emergen a cierta distancia de la planta madre, donde después producirán sus propias raíces y crecerán de manera independiente. Algunas especies, como *A. deserti* pueden producir hasta 65,000 semillas, las cuales son dispersadas por el viento. Sin embargo, se ha documentado que sirven de alimento a larvas de hormigas y otros insectos, y las que logran germinar rara vez se establecen y sobreviven hasta la etapa adulta, porque la semilla tiene una cantidad

limitada de reservas, y las plántulas tienen baja capacidad para absorber agua, y se ven expuestas a grandes variaciones de temperatura de la superficie del suelo en su fase más vulnerable; por ello, a pesar de producir una gran cantidad de semillas, esta especie de agave depende completamente de la reproducción asexual (García-Mendoza, 2007; Pérez *et al.*, 2016).

2.2 Generalidades de *Agave colimana*

El Índice Internacional de Nombres de las Plantas (IPNI) la nombra *A. colimana* y se puede apreciar un ejemplar silvestre en la figura 2, donde se notan sus rosetas cortas e inflorescencia espigada.



Figura 2. *A. colimana* (Viacheslav-Shalisko; 2006, “Maguey de colima”.

<https://www.naturalista.mx/photos/15192838>)

2.2.1 Datos Taxonómicos

En la tabla 1 se puede observar los datos taxonómicos de *A. colimana* con la actual familia *Asparagaceae*.

Tabla 1. Jerarquía Taxonómica *A. colimana* Gentry. Herbario Nacional de México (MEXU).

Nomenclatura del tipo	Isotipo
Reino	Plantae
Phylum o división	Tracheophyta
Clase	Liliopsida
Orden	Asparagales
Familia	Asparagaceae
Género	Agave
Especie	Agave colimana
Nombre científico	<i>Agave colimana</i> Gentry

2.2.2 Descripción botánica (morfología)

La siguiente descripción se basa en una colecta realizada por Gentry (1959), y en material depositado en el Herbario Nacional de México (MEXU).

"Rosetas cortas, caulescentes, monocárpicas, con múltiples hojas rectas lineales, delgadas y plantas de erectas. Estrechándose ligeramente desde la base y ensanchándose hacia la mitad, las hojas son lisas y de color verde. El margen angosto de las hojas presenta una coloración marrón y está bordeado con finas fibras y alargadas del mismo tono. La espina es corta y débil de aproximadamente 5-8 mm de largo, las hojas inferiores superan la longitud de las flores y las hojas superiores son un poco más cortas que las flores; las flores son frescas de

aproximadamente 40-50 mm de largo, no se agrupan densamente y se disponen sobre pedicelos bifurcados de 10-15 mm de largo. El ovario es de 14 a 20 mm de largo, los estambres tienen inserción no prominente y las anteras de color amarillo, 17-21 mm de largo. El estigma no es claviforme. Las cápsulas, de 20-25 mm de largo, son oblongas y puntiagudas, y las semillas son pequeñas, hemisféricas con dimensiones de 2-3 x 3.3-4 mm (Gentry, 1982)."

Lo que distingue a *A. colimana* son sus hojas alargadas, el tubo floral estrecho y profundo, y su parecido con *A. schidigera*, aunque el tubo floral es ligeramente más corto. También se asemeja a *A. multilifera* por sus hojas grandes y alargadas. Para diferenciar estos especímenes, se recomienda retirar las hojas y el cortacésped, como se muestra en la Figura 3, y considerar su ubicación geográfica (MEXU, 2012; Gentry, 1982).

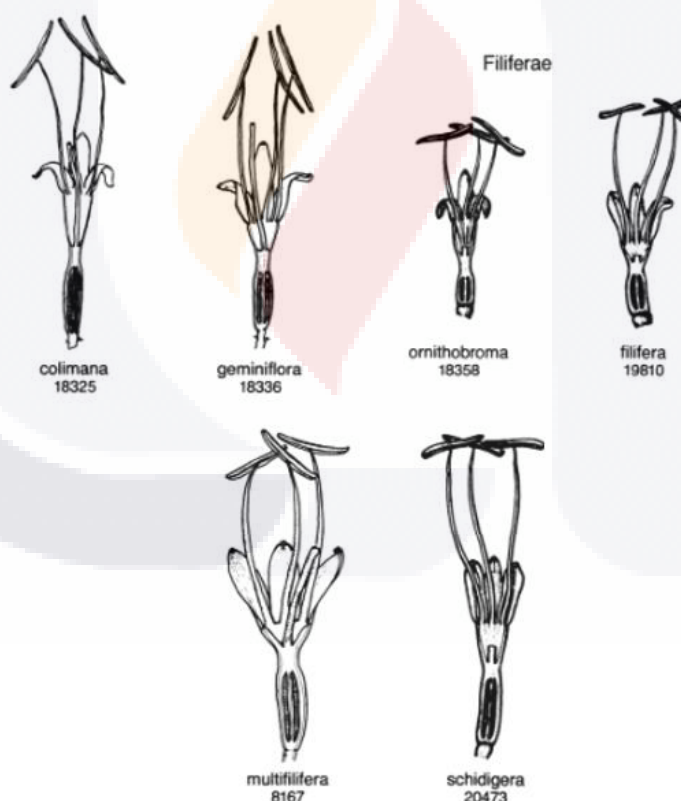


Figura 3. Secciones largas de flores Filifeae, números de colección se muestra debajo de cada especie. Ilustración de Gentry (1982).

2.2.3 Origen y distribución

A. colimana es una especie litoral dispersa principalmente en sitios rocosos junto al mar de Jalisco y Colima, donde el rocío del mar producido por las mareas altas es capaz de alcanzar las plantas. Por ejemplo, cerca de Chamela y Manzanillo. También se ha encontrado más retirada del mar, pero todavía dentro de la zona costera, en los bosques caducifolios tropicales un ejemplo es una colonia encontrada a 20-26 km al suroeste de la ciudad de Colima, en unos acantilados, que se encontraba integrada con poblaciones periféricas en un mismo ecosistema con *A. schiridigra*. Para el año 1982, Gentry no había encontrado ningún uso local de la planta.

Con el paso del tiempo, la información sobre *A. colimana* se ha expandido. En el año 2019, la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN) reportó a Michoacán como otra localidad geográfica de la planta. El límite de elevación superior es de 2100 m s. n. m., florece de noviembre a diciembre y la dehiscencia de semillas es de enero a febrero (Gentry, 1968, 1982).



Figura 4. Distribución de *A. colimana*. Puntos rojos señalan avistamientos (<https://www.naturalista.mx/taxa/290817-Agave-colimana>)

2.2.4 Estado actual de conservación

Para el año 2019, la IUCN reportó que la especie *A. colimana*, con una población estable, se encuentra listada en la categoría "Least Concern", lo cual indica una menor preocupación. Sin embargo, la población se encuentra severamente fragmentada y continúa la disminución de individuos maduros. Se reportan varias áreas protegidas, donde se llevan a cabo acciones de conservación, como en las áreas protegidas de Chamela-Cuixmala, Zicuirán-Infiernillo y la Reserva de la Biosfera Sierra de Manantlán (Torres-García *et al.*, 2019).

2.3 Generalidades de *Agave convallis*

El Índice Internacional de Nombres de las Plantas (IPNI) la nombra *A. convallis*. También es conocido como maguey jabalí y maguey escobeta. Comparte características morfológicas con *A. kerchovei*, *A. striata*, *A. schidigera*, *A. mulviliera*, *A. ghiesbreghtii*, entre otras, aunque con leves diferencias (Gentry, 1982; Vázquez-García *et al.*, 2007a).



Figura 5. *A. convallis* (Tomado de Rodríguez P., 2020).

2.3.1 Datos Taxonómicos

En la tabla 2 se puede observar los datos taxonómicos de *A. convallis* con la actual familia *Asparagaceae*.

Tabla 2. Jerarquía Taxonómica *A. convallis* Gentry. Herbario Nacional de México (MEXU).

Reino	Plantae
Phylum o división	Tracheophyta
Clase	Liliopsida
Orden	Asparagales
Familia	Asparagaceae
Género	<i>Agave</i>
Especie	<i>Agave convallis</i>
Nombre científico	<i>Agave convallis</i> Trel.

2.3.2 Descripción botánica (morfología)

A. convallis se caracteriza por sus rosetas de tamaño mediano, simples o cespitosas, tallo corto y color verde claro, aunque se han encontrado especies con una coloración verdosa más oscura. Son plantas bien estructuradas, que se extienden abiertamente con 80-100 hojas o más al hasta llegar a la madurez, normalmente ramificadas desde las axilas inferiores de las hojas (Gentry 1982).

Las hojas miden aproximadamente 40-100 o hasta 125 cm de largo al llegar a la madurez, ancho de 5-12 cm, lanceoladas, ápice largo y acuminado, generalmente sin dientes. La hoja es recta, con una ligera curvatura, rígidas y plana en la base, cóncava en la parte superior y convexa en la inferior, de color verde-amarillo claro a verde. El margen es comúnmente pesado, su inflorescencia es en forma de espiga, 2.5-5 cm de altura, densamente florecida en la parte superior del eje. El pedúnculo presenta brácteas delgadas y angostas, de secado rápido. Las flores van de una coloración verdosa-púrpura de 38-46 mm de largo, el ovario va de 18-21 mm de largo de forma fusiforme, constreñido en cuello, tubo de la flor es abiertamente extendido, 4-6mm de profundidad, 9-10 mm de ancho, los pétalos de las flores presentan coloraciones que van de verde a rojizo, son lineales, al principio la forma es erecta a extendida, se van entrelazando los filamentos con medidas de 40-50 mm de largo, son más pálidos que los pétalos, insertados en el borde del tubo de la flor. Las anteras son de 18-20 mm de largo, forma céntrica y coloración bronce, amarillo a rojizo, las semillas son de 3.5-4 cm x 2.5-3 mm, gruesas, forma lacrimosa a semilunar, superficie lisa, alas lisas, coloración negra vidriosa (Vázquez-García *et al.*, 2007a; 2007b; Gentry 1982).

De todas las especies del grupo Marginatae, *A. convallis* es de las más robustas y puede ser fácilmente confundida con otras dos especies. Sin embargo, se distingue por sus largas hojas lanceoladas armadas con grandes dientes, espaciados entre sí; tallo grueso de 30-50 cm de altura y flores con pétalos bastante anchos que tardan en engancharse a los filamentos. Es fácilmente confundible con *A.*

ghiesbreghtii, pues cohabitan en zonas del sur de Puebla y Oaxaca. Cuando las formas de ambos agaves son jóvenes, pueden ser casi imposibles de distinguir, debido a variedades de *A. convallis* que carecen de dientes en las hojas, así como a la enorme variabilidad en el tamaño, forma y armadura de las hojas cuando se compara con otra de la misma especie, pero de diferente localización geográfica (Gentry, 1982).

Con *A. marmorata* se confunde debido a que ambas tienen el mismo periodo de floración. Sin embargo, en zonas como el oeste de Tehuacán, se distingue *A. convallis* por sus hojas más anchas y flexibles, mientras que *A. marmorata* se distingue por los dientes ganchudos de sus hojas de gran tamaño. Con *A. angustiarum* se distingue levemente porque los dientes están más cercanos entre sí y sus hojas no son tan lineales (Gentry, 1982; Vázquez-García *et al.*, 2007a).

2.3.3 Origen, distribución u usos

Agave convallis se distribuye desde el centro de Hidalgo hasta el sur de Oaxaca, en elevaciones entre 1400-1875 m s. n. m. según Gentry (1982). Sin embargo, García-Mendoza *et al.* (2019) reportan un límite de elevación superior de 2600 m s. n. m. y un límite inferior de 927 m s. n. m. De cualquier modo, la planta se considera de tierras altas. Su hábitat es semiárido, con una temporada de lluvias corta en la Sierra Madre Oriental. Algunas características notables de su hábitat son las precipitaciones que oscilan entre 450-800 mm, con un periodo seco prolongado de octubre a junio. Crece en valles aluviales, suelos gruesos, estepas rocosas y bosques semiabiertos, en comunidades vegetales con árboles bajos que tienen una rica variedad de suculentas, cactáceas, bromelias, así como árboles y arbustos que tienen una estructura carnosa o suculenta (García-Mendoza *et al.*, 2019; León Vázquez *et al.*, 2013).

Se reporta el uso de *A. convallis* para la extracción de ixtle, con el que se hacen cuerdas llamadas jabalinas. También se le conoce como maguey jabalí, del cual se

obtiene una bebida llamada mezcal jabalí con denominación de origen (García-Mendoza *et al.*, 2019; León Vázquez *et al.*, 2013; Mezcal Colores, s.f.).

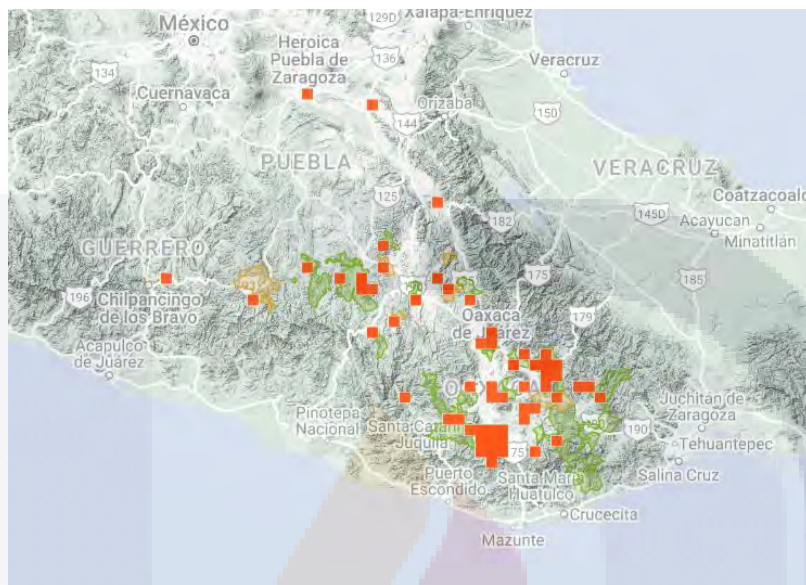


Figura 6. Distribución de *Agave convallis*. Puntos rojos señalan avistamientos (<https://www.naturalista.mx/taxa/862823-Agave-convallis>)

2.3.4 Estado actual de conservación

Para el año 2017, la IUCN reportó que la especie *A. convallis* tiene una población vulnerable bajo el criterio B1, lo cual indica el decrecimiento de la población. También reportaron que se encuentra severamente fragmentada y continúa el declive en individuos maduros, debido a la continua disminución del área y calidad del hábitat. Para el año 1982, Gentry hizo énfasis en que las regiones donde crece *A. convallis* han estado habitadas durante mucho tiempo y se podían apreciar muchos valles con aspecto desnudo debido al uso excesivo por parte del hombre y sus animales, algo que se ha confirmado y agravado con el pasar de los años. Se

reportan solo dos áreas protegidas, una en la Reserva de la Biosfera Tehuacán-Cuicatlán y la otra en RTP Cerro Negro-Yucaño (García-Mendoza *et al.*, 2019).

2.4 Generalidades de *Agave guadalupensis*

A. guadalupensis forma parte de las especies de agaves características de Jalisco, México. Usualmente, tienen rosetas atractivas, apretadas y muy parecidas a las alcachofas, siendo *A. guadalupensis* la que las presenta de manera más distintiva, cuando se compara con otras especies parecidas como *A. gracilipes*, *A. havardiana*, *A. neomexicana*, *A. parrasana* y *A. parryi* (Kemble, 2006; Gentry, 1982).



Figura 7. *A. guadalupensis* (Tomado de Álvarez, 2023).

2.4.1 Datos Taxonómicos

En la tabla 3 se puede observar los datos taxonómicos de *Agave guadalajarana* con la actual familia *Asparagaceae*.

Tabla 3. Jerarquía Taxonómica *A. guadalajarana*. Herbario Nacional de México (MEXU).

Reino	Plantae
Phylum o división	Tracheophyta
Clase	Liliopsida
Orden	Asparagales
Familia	Asparagaceae
Género	<i>Agave</i>
Especie	<i>Agave guadalajarana</i>
Nombre científico	<i>Agave guadalajarana</i> Trel.

2.4.2 Descripción botánica (morfología)

Son rosetas pequeñas, compactas, grisáceas, rara vez con chupones, de 25-35 cm de altura, más anchas que altas. Las hojas, numerosas y en forma de paleta, son más anchas por encima de la mitad, con forma obovada u oblonga, miden 20-30 cm por 8-12 cm. Los dientes afilados, de 10 mm de color marrón rojizo a gris, se encuentran en la parte superior de las protuberancias, a distancias de 5-10 mm en el margen recto. Los dientes de la mitad de la hoja hacia la base son mucho más pequeños, de unos 3-4 mm de largo. La superficie de la hoja muestra curiosas huellas de yemas, ocurridas porque las hojas en desarrollo están apretadas y juntas en un cono en el centro de la planta (Kemble, 2006; Gentry, 1982).

En *A. guadalajarana*, la inflorescencia es de color verde claro en capullo, y en ocasiones puede volverse más pálida hacia las puntas moradas, a veces con un rubor morado en la base. Al abrirse, la parte inferior de la flor permanece verde, tal y como se muestra en la Figura 8 (Kemble, 2006).



Figura 8. Flores de *A. guadalupensis*. (Tomado de Kemble, 2006).

2.4.3 Origen y distribución

El hábitat de *A. guadalupensis* se caracteriza por pastizales abiertos en zonas montañosas cercanas a Guadalajara, donde cohabita con una considerable presencia de robles. Esta especie se desarrolla en sustratos de origen volcánico. A pesar de compartir la misma región geográfica con otras especies de agave cuyas distribuciones son contiguas, *A. guadalupensis* presenta una distribución notablemente separada. También se reporta la presencia de la especie en los estados de Nayarit y Zacatecas (fig. 9). Su rango altitudinal se sitúa entre los 1700 y 1900 metros sobre el nivel del mar (Kemble, 2006; Hernández-Vera *et al.*, 2007; Gentry, 1982; IUCN, 2018).

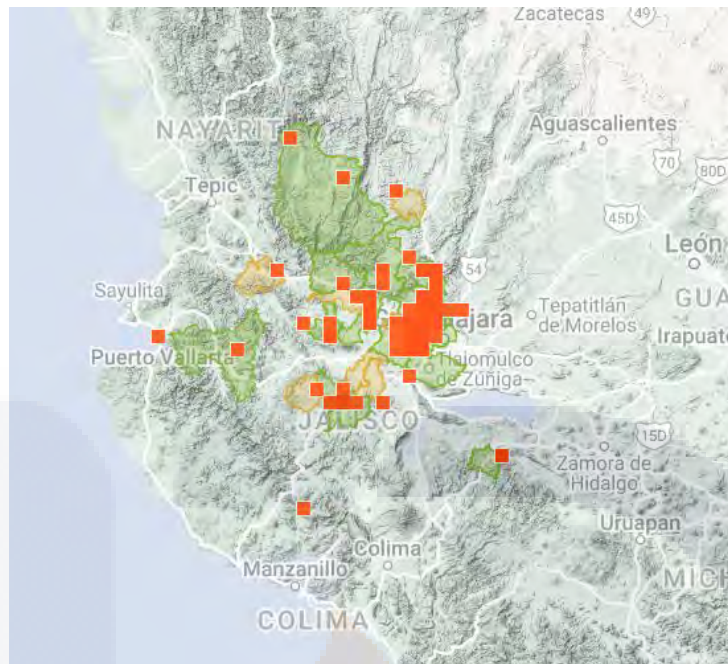


Figura 9. *Distribución de A. guadalupensis*. Puntos rojos señalan avistamientos (<https://www.naturalista.mx/taxa/290837-Agave-guadalupensis>)

2.4.4 Estado actual de conservación

Para el año 2018, la IUCN reportó que la especie *A. guadalupensis* tiene una población en peligro bajo el criterio B1 ab (i, iii, v), lo cual indica que la población está decreciendo y es evidente la disminución de individuos maduros; la población está severamente fragmentada, a pesar de distribuirse uniformemente dentro de su área, y pocos individuos permanecen donde el acceso humano es posible, lo cual es una amenaza por la recolección excesiva para el comercio hortícola y ornamental. Debido a que se encuentra en las cercanías de Guadalajara, la expansión urbana también ocasiona una disminución constante de individuos maduros en la naturaleza.

Se reportan acciones de conservación en más de un área protegida: Área de Protección de Flora y Fauna La Primavera y RTP 59 Cuenca del Río Jesús María (IUCN, 2018).

2.5 Propagación *in vitro*

El metabolismo tipo CAM, las bajas tasas de reproducción sexual y asexual por problemas de polinización o viabilidad de las semillas son factores que dificultan la multiplicación masiva y resultan en un crecimiento muy lento en las poblaciones de agaves. Para contrarrestar esta limitante en el aprovechamiento de estas especies, se ha implementado una alternativa basada en la aplicación de técnicas de propagación derivadas de la biotecnología vegetal. La práctica de cultivo de tejidos vegetales, cuando se extiende a una propagación a gran escala de tejidos vegetativos a partir de una regeneración vegetal, se denomina "micropropagación", la cual es de tipo asexual y utiliza las técnicas de cultivo de tejido vegetal para establecer, mantener o propagar una variedad de órganos vegetales, cuidando las condiciones axénicas, la asepsia y los nutrientes (Domínguez *et al.*, 2008; Jain y Nakhooda, 2017). Según Malda (1999) y Gil (2019), las respuestas particulares en el caso de cactus a los ambientes *in vitro* podrían estar relacionadas con su fisiología CAM, algo que comparten con los agaves. La alta humedad en el recipiente que los contiene podría permitir que los estomas permanezcan abiertos durante el día, no solo por las noches, y provocar una fijación continua de CO₂, lo cual sugiere una asimilación constante de carbono y una acelerada absorción de nutrientes, resultando en un rápido crecimiento.

2.5.1 Cultivo en medio semisólido

La regeneración de plantas a partir de cultivo de tejido vegetal fue complicada hasta que Miller y Skoog (1962) lograron la regeneración al aislar cinetina a partir de esperma de arenque. Los compuestos que estimulan la división celular son las citocininas (cyto=cell, kinesis=división). También se describió la relación de proporciones de auxinas y citocininas en un medio de cultivo donde buscaban estimular la formación de raíces. En diferentes combinaciones y experimentos, se demostró que una proporción mayor de citocinina estimula la formación de yemas y brotes, pero si la auxina es predominante, se forma callo (Gentry, 1982; Read *et al.*, 2014).

En general, uno de los primeros experimentos que documentan la propagación *in vitro* de agave fue realizado por Groebewald *et al.* (1977), donde se buscó la formación de callos a partir de semillas de agave no identificado y la posterior regeneración de plantas con el tejido organogénico. Se utilizó medio Linsmaier y Skoog, al que se adicionaron dos combinaciones distintas de reguladores de crecimiento vegetal: al medio A se le adicionó 1 mg L⁻¹ de 2,4-D y 5 mg L⁻¹ de kinetina; y al medio B, 0.2 mg L⁻¹ de 2,4-D y 1 mg L⁻¹ de kinetina. El crecimiento de callo fue posible únicamente en el medio A, pero no se presentó organogénesis; esta fue posible hasta que el callo se transfirió al medio B. Este descubrimiento sentó las bases sobre las concentraciones y tipos de reguladores de crecimiento vegetal que podrían utilizarse en futuros experimentos. Groebewald *et al.* (1977) creyeron que el tejido vegetal del agave requería altas concentraciones de 2,4-D para acelerar la división celular y, consecuentemente, la formación de callo. Sin embargo, como se aprecia en investigaciones posteriores, cada especie de agave reacciona de manera diferente según el tipo y concentración de reguladores de crecimiento vegetal.

En años posteriores, Robert *et al.* (1987), Powers y Backhaus (1989) y Binh *et al.* (1990) intentaron la propagación *in vitro* mediante organogénesis indirecta. Los primeros usaron el medio SH suplementado con BA, pero la formación de explantes fue infrecuente y demoró bastante tiempo, por lo que se creía que existía algún factor externo y desconocido que afectaba la propagación *in vitro* e impedía la

correcta diferenciación de explantes. Powers y Backhaus (1989) fueron los primeros en usar bulbilos como explantes. Las hojas fueron esterilizadas y se utilizó el medio MS, que actualmente es uno de los más utilizados para la propagación *in vitro* en diversas plantas, incluyendo los agaves. Al igual que los primeros, buscaron la inducción de callo con 2,4-D, pero decidieron hacer la posterior diferenciación con BA y ANA en diferentes concentraciones, lo cual tomó de 2 a 4 meses en completarse. Este fue también el primer artículo que mostraba de manera visual todos los pasos en el proceso de propagación *in vitro* hasta la aclimatación, aunque este último paso no fue detallado. Binh *et al.* (1990) fueron los primeros en comparar la propagación *in vitro* entre diferentes especies de agave, en combinación de citocininas y auxinas a diferentes concentraciones. A partir de este artículo, se notan las características básicas a tomar en cuenta para futuros experimentos de propagación *in vitro*. Algunos ejemplos son la descripción detallada del medio MS enriquecido, tablas con análisis de resultados más específicas comparando las concentraciones y hormonas utilizadas con la obtención de tejido calloso, brotación múltiple, porcentaje de enraizamiento, así como la supervivencia a condiciones *ex vitro*.

2.5.2 Etapas de la micropropagación

Las etapas de la micropropagación descritas a continuación se basan en Read *et al.* (2014).

- Etapa 0: Selección y preparación de la planta madre

La planta de donde se toma el explante se denomina planta madre. Las características generales de esta planta madre son fundamentales para el éxito del proceso de micropropagación. El propagador debe comenzar con una planta sana, ya que las bacterias, hongos y virus ocasionarán que las plantas micropropagadas a partir de esta también se encuentren infectadas.

El nivel de luz y el fotoperiodo afectarán en diferente medida las condiciones de la planta madre, aunque esto siempre depende del tipo de planta, pues hay especies que son mucho más sensibles al fotoperiodo y podrían tener respuestas fisiológicas muy diferentes.

- Etapa 1: Establecimiento del cultivo *in vitro*

El objetivo principal es introducir con éxito el tejido vegetal en el medio mediante el uso de explantes limpios y técnicas asépticas. La desinfección de los explantes es importante, ya que las células bacterianas, las esporas de hongos y algunas plagas de arácnidos o insectos pequeños pueden habitar en la superficie del tejido y, cuando el explante se coloca en el medio de cultivo, estos contaminantes pueden multiplicarse y destruirlo. Se puede realizar la comparación de diferentes técnicas de desinfección y determinar cuál es la mejor, o aplicar una estándar, desinfectando los explantes con lejía (soluciones de hipoclorito de sodio o calcio).

Es necesario que se implementen condiciones asépticas y se tome en cuenta la temperatura a la que se mantendrán los cultivos *in vitro*, que por lo general suele estar en un rango de 20-27 °C, aunque siempre habrá excepciones con diferentes tipos de plantas. Por ejemplo, algunas tropicales se desarrollan mejor a temperaturas de 32-39 °C.

- Etapa 2: Multiplicación de brotes

Esta etapa es solo una de las varias vías de regeneración; se aprovecha la estimulación de las yemas axilares en el explante para producir muchos más brotes que tienen yemas axilares que, con subcultivo repetido, pueden resultar en un aumento exponencial del número de explantes. Posteriormente, estos brotes se pueden cortar en numerosas piezas, cada una con al menos una yema axilar, para su posterior subcultivo. Los brotes resultantes pueden luego ser inducidos para producir raíces adventicias y crecer como plantas intactas, otras vías de regeneración opcionales son la embriogénesis y organogénesis directa e indirecta.

- Etapa 3: Enraizamiento

En esta etapa, el objetivo principal es la iniciación y el desarrollo de raíces para completar la formación de nuevas plantas clonales que crecerán en un invernadero o campo para su acondicionamiento. El enraizamiento se puede lograr *in vitro* en la sala de incubación de cultivo de tejidos o *ex vitro* en un invernadero o cámara de crecimiento. Cuando el enraizamiento es *ex vitro*, se combinan las etapas III y IV, enraizamiento y aclimatación, lo que gana eficiencia si los porcentajes tanto de enraizamiento como de aclimatación son altos. Aunque algunas especies de plantas, como las herbáceas, producen su enraizamiento durante la etapa II, lo que permite omitir la etapa III, hay que tomar en cuenta que la etapa 3 es crítica para muchas especies, especialmente plantas leñosas, incluidas plantas ornamentales y cultivos de frutas y nueces.

- Etapa 4: Transferencia y aclimatación de la plántula al medio ambiente

La aclimatación de microplantas en ambientes *ex vitro*, como invernaderos, es uno de los momentos de mayores pérdidas de plantas en el proceso de micropropagación, pues estas se encuentran muy acostumbradas a recibir los nutrientes al estar en condiciones *in vitro*.

2.6 Antecedentes sobre el cultivo y propagación *in vitro* de agaves

En la tabla 4 se muestra una revisión de los antecedentes existentes a nivel mundial, compilando las metodologías establecidas en diversas publicaciones de carácter científico, sobre la metodología aplicada para la propagación *in vitro* en medio semisólido de diversas especies de agaves.

Tabla 4. Antecedentes sobre el cultivo y propagación *in vitro* de especies del género Agave. Actualizada de Domínguez et al., (2008).

Especie de Agave	Avance reportado	Medio de cultivo / Reguladores del crecimiento utilizados	Referencia
<i>Agave sp.</i>	Regeneración de plantas a través de organogénesis indirecta.	Linsmaier y Skoog con 1 mg L ⁻¹ de 2,4-D y 5 1mg L ⁻¹ de cinetina para la generación de tejido calloso. Mismo medio con 0.2 mg L ⁻¹ de 2,4-D y 1 mg L ⁻¹ de cinetina para la generación de brotes a partir del callo.	Groenewald <i>et al.</i> (1977)
<i>A. fourcroydes</i>	Regeneración de plantas a través de organogénesis indirecta.	SH adicionado con BA	Robert y <i>et al.</i> (1987)
<i>A. arizonica</i>	Regeneración de plantas a través de organogénesis indirecta.	MS con 1.4 µM de 2,4-D para la generación de tejido calloso. Diferenciación de brotes en medio con BA y ANA.	Powers y Backhaus(1989)
<i>A. cantala</i> <i>A. fourcroydes</i> <i>A. sisalana</i>	Regeneración de plantas a través de organogénesis indirecta.	MS con 0.1 mg L ⁻¹ de 2,4-D y 0.1 mgL ⁻¹ de BA para la generación de tejidocalloso y brotación.	Binh y <i>et al.</i> (1990)
<i>A. sisalana</i>	Regeneración de brotes a partir de meristemos basales (rizomas).	MS o SH con BA.	Das (1992)
<i>A. victoria-reginae</i>	Embriogénesis somática directa en explantes de hoja.	MS con vitaminas L2 y 2,4-D para la generación de embriones, MS oSH al 50% para su germinación.	Rodríguez-Garay y col.(1996)
<i>A. sisalana</i>	Regeneración de brotes a partir de meristemos basales y organogénesis indirecta.	MS, SH, Gamborg y de White adicionados con diversas concentraciones de BA, de cinetina, de NAA, de IAA y de 2,4-D en combinación solos.	Nikam (1997)
<i>A. amaniensis</i>	Cultivo de tejido calloso y producción de sapogeninas.	MS con Cinetina y 2,4-D	Andrijany y <i>et al.</i> (1999)
<i>A. parrasana</i>	Regeneración de brotes a partir de meristemos basales y organogénesis indirecta.	MS adicionado con BA y 2,4-D	Santacruz-Ruvalcaba y <i>et al.</i> (1999)
<i>A. sisalana</i>	Regeneración de plantas a través de organogénesis indirecta.	MS, MS + (NH ₄ NO ₃ : 1500 mg L ⁻¹) y MS + hidrolizado de caseína (1000 mg L ⁻¹), todos adicionados con 2,4-D y cinetina	Hazra y <i>et al.</i> (2002)

<i>A. victoriareginae</i>	Regeneración por embriogénesis somática y generación de brotes a partir de meristemos basales.	MS con fue con 2,4-D para la inducción de callo. MS con de BA para la generación de brotes.	Martínez-Palacios y <i>et al.</i> (2003)
<i>A. sisalana</i>	Regeneración por embriogénesis somática.	MS con 2,4-D (0.5-1 mg L ⁻¹) más BAP o cinetina (1-2 mg L ⁻¹) para la formación de callo. MS con 1 mg L ⁻¹ de cinetina para la diferenciación de embriones somáticos.	Nikam y <i>et al.</i> (2003)
<i>A. angustifolia</i>	Generación de brotes de a través de organogénesis directa a partir de segmentos de médula de tallo.	MS con 1 mg L ⁻¹ de BA.	Enríquez del Valle y <i>et al.</i> (2005)
<i>A. tequilana</i>	Regeneración de plantas a través de organogénesis indirecta y generación de brotes a partir de meristemos.	Para la formación de callo el mejor tratamiento fue con ANA. La regeneración a partir de meristemos y de callo se logró con 2,4-D y 44 BA.	Valenzuela-Sánchez y <i>et al.</i> (2006)
<i>A. salmiana</i>	Generación de brotes a partir de meristemos.	MS con 2.0 mg l ⁻¹ BA y 0.25 mg l ⁻¹ AIA	Silos-Espino y <i>et al.</i> (2007)
<i>A. tequilana</i>	Regeneración por embriogénesis somática.	Se utilizaron MS más combinaciones de 2,4-D/BA µM para la formación de callo. MS más distintas concentraciones de BA, cinetina, 2iP y TDZ para la diferenciación de embriones somáticos	Portillo y <i>et al.</i> (2007)
<i>A. vera-cruz</i>	Regeneración por embriogénesis somática.	Se utilizó MS adicionado con 2,4-D para la formación de callo. MS adicionado NAA más zeatina.	Tejavathi y <i>et al.</i> (2007)
<i>A. hypericum goyanesii</i>	Regeneración de plantas a través de organogénesis (recolección y desinfección de hojas)	Se utilizó MS enriquecido con auxinas AIB y BAP en diferente concentración y combinación o solas	Pedroza Manrique y <i>et al.</i> (2007)
<i>A. inaequidens Koch</i>	Regeneración por organogénesis de brotes a partir de yemas axilares y tejido de tallo	Se utilizó MS adicionado con diversas concentraciones de BA, cinetina y 2iP en combinación o solos.	Aureoles-Rodríguez y <i>et al.</i> (2008)
<i>A. cupreata</i> <i>A. difformis</i> <i>A. Karwinskii</i> <i>A. obscura</i> <i>A. potatorum</i> <i>A. cocui</i>	Regeneración a partir de tejidos meristemáticos extraídos de plántulas germinadas <i>in vitro</i>	Se utilizó MS adicionado con sacarosa, agar y varios tratamientos con citocininas (BA, 2iP, Cin, TDZ, MT) solas o combinadas.	Domínguez Rosales y <i>et al.</i> (2008)
<i>A. angustifolia</i>	Regeneración por organogénesis de plantas a través yemas adventicias.	MS suplementado con tiamina, ac. Nicotínico, piridoxina y mio-inositol (1 mg L ⁻¹ c/u), adicionado con BA en diferente conc., solo o combinado y agar	Salazar Efrain y <i>et al.</i> (2009)
<i>A. angustifolia</i>	Embriogénesis somática, embriones cigóticos de semillas de <i>agave angustifolia haw</i>	Concentración diferente de sales inorgánicas MS (75 o 100%) adicionado en diferentes con. de 2,4-D, BA y sacarosa, solas o combinadas.	Arzate-Fernández y <i>et al.</i> (2011)
<i>A. Americana</i> var. <i>oaxacensis</i>	Regeneración de plantas a través de explantes de tejido de callo	Preparado de MS en diferente conc. (33, 66 y 100%) adicionado con auxina AIB en diferente conc.	Miguel Luna y <i>et al.</i> (2013)
<i>A. americana</i>	Regeneración de plantas a través de organogénesis indirecta. (brotes <i>in vitro</i>)	Se utilizó MS adicionado con BA, diversos carbohidratos, todo en diferentes concentraciones, combinadas o solas	Elisama Miguel y <i>et al.</i> (2014)

<i>A. potatorum</i> <i>Zucc</i>	Regeneración de plantas a través de organogénesis (brotes adventicios a partir de tejidos de tallo)	MS (50, 75 y 100%), IBA para la generación de brote en diferentes concentraciones	Enríquez-del Valle y <i>et al.</i> (2016)
<i>A. angustifolia</i> <i>HAW</i>	Regeneración por embriogénesis somática (embriones encapsulados)	MS (25%) con vitaminas L2 y 2,4-D, sacarosa y BAP, MAS para generación de brote en diferentes concentraciones combinadas o solas	Arzate-Fernández y <i>et al.</i> (2016)
<i>A. angustifolia</i>	Regeneración de plantas a través de organogénesis (toma de explantes que fueron racimos de una planta)	Se utilizó MS adicionado con BAP y AIA diferentes concentraciones, combinadas o solas	Ríos-Ramírez y <i>et al.</i> (2017)
<i>A. marmorata</i> <i>roezl</i>	Regeneración de plantas a través de organogénesis indirecta (obtención de brotes a partir de un cultivo <i>in vitro</i> de ápices de plantas)	MS suplementado con azúcar de caña, myonitol, agar y tiamina-HCL, adicionado en diferentes concentraciones de BA y AIA solas o combinadas.	Aguilar Jiménez y <i>et al.</i> (2018)
<i>A. marmorata</i> <i>A. angustifolia</i>	Regeneración de plantas a través de organogénesis (morfogénesis en tejidos somáticos de agave)	MS suplementado con tiamina-HCL, myo-inositol y sacarosa, adicionado con AIA Y BAP en diferentes concentraciones, combinadas y/o solas	López Acevedo y <i>et al.</i> (2018)
<i>A. potatorum</i> <i>Zucc</i>	Regeneración a través de embriogénesis somática (plántulas a partir de semillas germinadas <i>in vitro</i>)	MS (75 o 100%) adicionado con auxina (AIA o AIB) solos o combinados	Bautista-Castellanos y <i>et al.</i> (2020)
<i>A. salmiana</i> <i>A. marmorata</i>	Embriogénesis somática (embriones cigóticos maduros) y regeneración por organogénesis (zona meristemática de plantas)	MS (25%) enriquecido con 30 g L ⁻¹ de sacarosa, 0.5 g L ⁻¹ de carbón activado, adicionando con BA y 2,4-D en diferentes concentraciones, combinadas y solas	Arzate-Fernández y <i>et al.</i> (2020)
<i>A. marmorata</i> <i>roezl</i>	Embriogénesis somática indirecta (inducción de callo embriogénico a partir de otro callo previo)	MS suplementado con vitamina L2 y 2,4-D, sacarosa g L ⁻¹ , agar y BA en dif. Concentraciones, combinados o solos.	Álvarez-Aragón (2020)
<i>A. guiengola</i>	Propagación mediante brotes axilares mejorados a partir de segmentos de tallo	MS suplementado con BA, 2ip, 2,4-D y Cinetina.	Chávez-Ortiz y <i>et al.</i> (2020)
<i>A. salmiana</i> var. <i>Púa</i> <i>larga</i>	Regeneración de plantas a través de organogénesis directa e indirecta	MS adicionado con diversas concentraciones de K, 2,4-D, ANA, BAP y 2IP solos o combinados.	Flores-Morales y <i>et al.</i> (2021)
<i>A. durangensis</i>	Germinación de semillas y producción de brotes adventicios	MS adicionado con cinetina, BAP y ANA solos o combinados	Dévora-Rodríguez y <i>et al.</i> (2020)
<i>A. peacockii</i>	Regeneración y multiplicación por meristemas	MS enriquecido y adicionado con BA y cinetina en diferentes combinaciones y/o solas.	Delgado-Aceves y <i>et al.</i> (2022)
<i>A. maximiliana</i> <i>Baker</i>	Regeneración de plantas a través de organogénesis (proliferación de yemas axilares)	MS suplementado con sacarosa, se usó 2,4-D y BA para estimulación de brote de yemas axilares en diferente concentración, combinadas o solas.	Santacruz-Ruvalcaba y <i>et al.</i> (2022)
<i>A. tequilana</i>	Regeneración de plantas a través de tallos segmentados	MS enriquecido con 3.0% sacarosa y 8 g L ⁻¹ agar, y adicionado con BA y cinetina en diferentes concentraciones y/o solos.	Vázquez-Martínez y <i>et al.</i> (2022)

<i>A. wocomahi</i>	Germinación de semillas y posterior regeneración de plantas por organogénesis directa (segmentos de tallo en medio basal)	MS enriquecido con 30 g L ⁻¹ de sacarosa y 8 g L ⁻¹ de agar, adicionado con AIA, ANA y 2,4-D solos o en combinación.	Reyes-Silva y <i>et al.</i> (2022)
--------------------	---	--	------------------------------------

3 Justificación

Agave colimana, *A. convallis* y *A. guadalajarana* son especies poco investigadas y aprovechadas. Su hábitat natural se está degradando rápidamente y sus poblaciones están severamente fragmentadas. *A. guadalajarana* ya es considerada una especie en peligro según la IUCN.

El desarrollo de protocolos eficientes para propagar masivamente estas especies permitirá generar ejemplares para darles uso racional, sin necesidad de coleccionar plantas silvestres y eventualmente poder producir plantas para ser reintroducidas a su hábitat y regenerar así poblaciones ya dañadas. Los agaves representan una opción muy atractiva en el contexto del cambio climático, esto debido a su adaptación natural a las altas temperaturas y a la baja disponibilidad de agua. Sin embargo, su explotación debe hacerse de una forma racional que no ponga en riesgo su supervivencia como especies. La tecnología desarrollada en este proyecto contribuirá a este fin.

4 Hipótesis

Es posible desarrollar una técnica de micropropagación en medio semisólido para la multiplicación de las especies *Agave colimana*, *A. convallis* y *A. guadalajarana*. Esto empleando reguladores de crecimiento vegetal para favorecer la multiplicación *in vitro* de las especies antes mencionadas, y posteriormente enraizando y transfiriendo a suelo los brotes generados.

5 Objetivos

5.1 Objetivo General

Desarrollar un sistema de propagación *in vitro* en tres especies que se encuentran amenazadas o en peligro de extinción, *A. colimana*, *A. convallis* y *A. guadalajarana*.

5.2 Objetivos específicos

1. Desarrollar una metodología para propagar las especies *A. colimana*, *A. convallis* y *A. guadalajarana in vitro* a partir de explantes basales con meristemos cultivados en medios semisólidos adicionados con citocininas.
2. Evaluar las respuestas morfogénicas ante tratamientos con auxinas y citocininas en las especies de interés.
3. Desarrollar una metodología para enraizar y adaptar a suelo las plantas generadas *in vitro*.
4. Con la información generada establecer una metodología fácilmente replicable de cada una de las especies de interés.

6. Impacto social

El desarrollar un protocolo de propagación masiva *in vitro* en especies de agaves que se encuentran amenazadas o en peligro de extinción permitirá darles un uso racional sin necesidad de coleccionar ejemplares silvestres. Además, haciendo los estudios pertinentes, las plantas producidas a través del cultivo *in vitro* podrán ser reintroducidas a su hábitat natural con el fin de regenerar las poblaciones dañadas.

7. Metodología

7.1 Medio de cultivo

El medio de cultivo utilizado para todos los experimentos fue MS (Murashige y Skoog 1962) que se muestran en la Tabla 5, suplementado con 30 g L⁻¹ de sacarosa, 1.9 g L⁻¹ de nitrato de potasio, 1.65 g L⁻¹ de nitrato de amonio y 8 g L⁻¹ de agar.

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

Solución	Concentración	Formula	Cantidad
----------	---------------	---------	----------

A	1000 x. volumen: 50	22.000 g
Cloruro de calcio	ml	
B	1000 x. volumen 50	
Yoduro de potasio	ml	KI 41.50 mg
Cloruro de cobalto		CoCl ₂ +6H ₂ O 1.25 mg
C	400 x. volumen: 50	
Fosfato monobásico de K	ml	
Ac. bórico		KH ₂ PO ₄ 3.400 gr
Molibdato de sodio		H ₃ BO ₃ 0.124 gr
		NaMoO ₄ 0.005 gr
D	400 x. volumen: 50	
Sulfato de magnesio	ml	MgSO ₄ +7H ₂ O 7.400 gr
Sulfato de manganeso		MnSO ₄ H ₂ O 0.340 gr
Sulfato de zinc		ZnSO ₄ +7H ₂ O 0.172 gr
Sulfato de cobre		CuSO ₄ +5H ₂ O 0.50 mg
E	200 x. volumen 100	
Sulfato ferroso	ml	FeSO ₄ +7H ₂ O 0.557 g
EDTA disódico		0.745 gr
F	100 x. volumen 100	
Glicina	ml	20.00 mg
Piridoxina HCL		5.00 mg
Ac. nicotínico		5.10 mg
Tiamina HCL		1.0 mg
Mio inositol		1.0 mg

7.2 Propagación del material vegetal a partir de explantes basales que contienen meristemos

Se utilizaron cultivos establecidos *in vitro* de *A. colimana*, *A. convallis* y *A. guadalajarana*, proporcionados por el Banco de Germoplasma de la Unidad de

Biotecnología Vegetal de la Universidad Autónoma de Aguascalientes. Estas plántulas fueron propagadas *in vitro* en medio MS enriquecido y adicionado con 1.5 mg L⁻¹ de BA para promover su multiplicación. Los cultivos se mantuvieron a 25 ± 2 °C bajo luz blanca (lámparas LED, 55 μmol m⁻² s⁻¹) con un fotoperíodo de 16/4 h durante al menos 60 días. Se utilizaron frascos de vidrio herméticos de 460 ml, colocando dos explantes por frasco, con corte meristemático (Figura 10). Se propagaron 12 frascos de *A. colimana* y *A. guadalajara*, y 7 de *A. convallis* (debido a su disponibilidad limitada). Para los experimentos con citocininas y auxina, se utilizaron 10 repeticiones para *A. colimana* y *A. guadalajara*, y 5 para *A. convallis*. Esta propagación preliminar con BA se realizó para generar el material vegetal necesario para los experimentos.

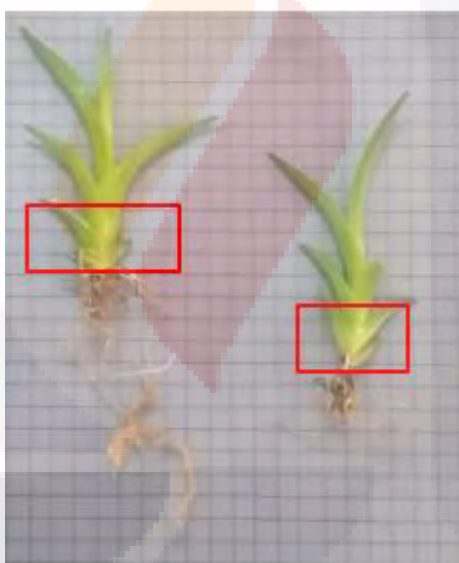


Figura 10 Explicación del corte del explante en *Agave convallis*. Líneas rojas señalan lugar para el corte.

7.3 Evaluación de las respuestas morfogénicas ante tratamientos con citocininas

Se utilizaron los brotes generados como se describe en 7.2 para evaluar el efecto de tres citocininas (BA, 2iP y metatopolina) en concentraciones de 1, 2 y 3 mg L⁻¹. El medio basal fue MS enriquecido (7.1). Se mantuvieron las condiciones de inoculación, incubación y recipientes descritas en 7.2. Se incluyó un control sin RCV y un tratamiento con 2 g L⁻¹ de carbón activado. La evaluación se realizó después de 60 días.

El análisis estadístico consistió en ANOVA seguido de la prueba de Tukey (R Studio, GraphPad Prism, $P \leq 0.05$, n=10 para *A. colimana* y *A. guadalajarana*, n=5 para *A. convallis*).

7.4 Evaluación de las respuestas morfogénicas ante tratamientos con citocinina y auxina en las especies de interés

Se evaluó la adición de picloram en combinación con la concentración óptima de citocinina determinada en 7.3 en proporciones 1:1, 1:2 y 2:1. La mejor concentración resultó 1 mg L⁻¹ de BA para *A. convallis* y *A. guadalajarana*, por lo tanto, las combinaciones a probar fueron: 1 mg L⁻¹ BA y 1 mg L⁻¹ de PIC; 1 mg L⁻¹ BA y 2 mg L⁻¹ de PIC; 2 mg L⁻¹ BA y 1 mg L⁻¹ de PIC. Para *A. colimana* la mejor concentración resultó en 1 mg L⁻¹ de metatopolina, las combinaciones a probar fueron: 1 mg L⁻¹ MTA y 1 mg L⁻¹ de PIC; 1 mg L⁻¹ MTA y 2 mg L⁻¹ de PIC; 2 mg L⁻¹ MTA y 1 mg L⁻¹ de PIC. Se utilizaron 10 repeticiones para *A. colimana* y *A. guadalajarana*, y 5 para *A. convallis*. La evaluación se realizó a los 60 días.

7.5 Aclimatación a condiciones ex vitro

Se utilizaron plántulas cultivadas en medio MS con 2 g L⁻¹ de carbón activado, y aquellas con raíces bien desarrolladas (≥ 5 cm) y altura de plántula ≥ 5 cm. Las plántulas se aclimataron durante una semana en laboratorio (luz artificial, 20-35 °C),

sin sellado hermético. Después, se retiró el medio basal con agua y se dejaron las raíces extendidas en una charola durante 24 horas.

Se trasplantaron a macetas de 150 ml con sustrato de peat moss y agrolita en invernadero. Se aplicaron dos tratamientos: impregnación de raíces con Raizone[®] y con esporas de micorrizas (*Glomus intraradices*). Se evitó el contacto de la parte apical con los polvos. Las macetas se colocaron en bolsas de plástico perforadas durante 15 días, abriendo gradualmente las bolsas. Se realizaron riegos semanales y se evaluó la supervivencia a los 22 días aproximadamente, después de la exposición completa a las condiciones del invernadero.

8 Resultados

8.1 Multiplicación de brotes *in vitro* de las especies *Agave colimana*, *A. convallis* y *A. guadalajara* a partir explantes basales que contienen meristemas cultivados en medios adicionados con citocininas.

8.1.1 Inducción y formación de brotes:

Se logró la inducción y formación de brotes en las tres especies de agave utilizando medios MS suplementados con citocininas, como se describe en la metodología. El tiempo de incubación antes de la toma de resultados fue de 60 días en todos los tratamientos (fig. 11). Transcurrido este tiempo, se analizó la respuesta morfogénica de las plantas en el medio de cultivo semisólido, considerando los siguientes parámetros: brotes generados por explante, altura máxima de la plántula, masas de brotes indiferenciados, presencia de callo y formación de raíces. Los explantes que no mostraron crecimiento, presentaron vitrificación o contaminación se consideraron como respuestas negativas.

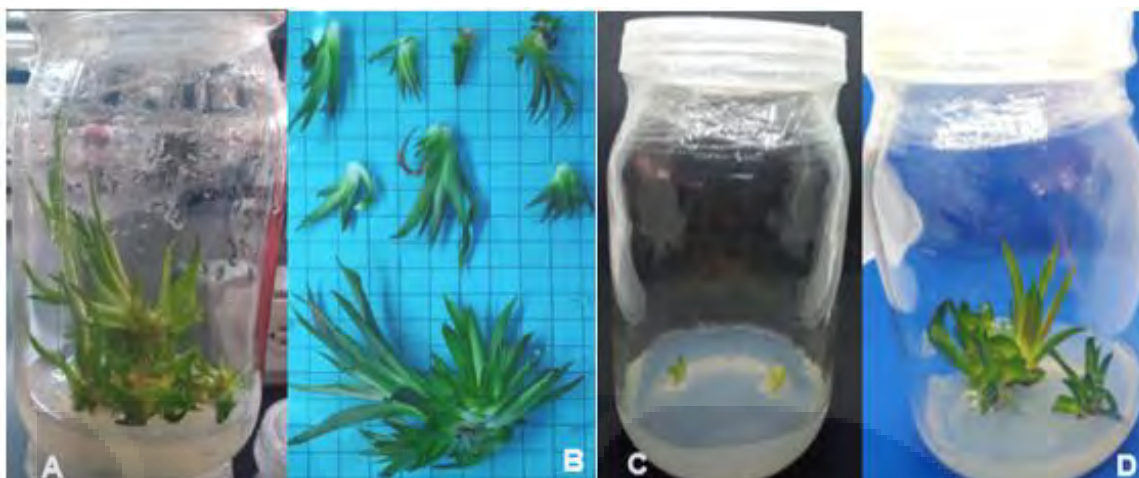


Figura 11. Etapas en la propagación *in vitro* de *A. guadalupensis*. A) Material vegetal proporcionado por el laboratorio, B) Masa de brotes diferenciadas de *A. guadalupensis* y separación de brotes, C) Corte y e inoculación del explante, (2 por frasco), D) Desarrollo morfogénico, multiplicación *in vitro* por formación de brotes adventicios. Cada cuadro equivale a 1 cm.

Los mejores tratamientos para la inducción y formación de brotes por explante, en respuesta a las tres citocininas, fueron 1 mg L^{-1} de metatopolina para *A. colimana* y 1 mg L^{-1} de BA para *A. convallis* y *A. guadalupensis* (fig. 12 y 13). También se observó la formación de masas de brotes indiferenciados (fig.14, 15, 16).

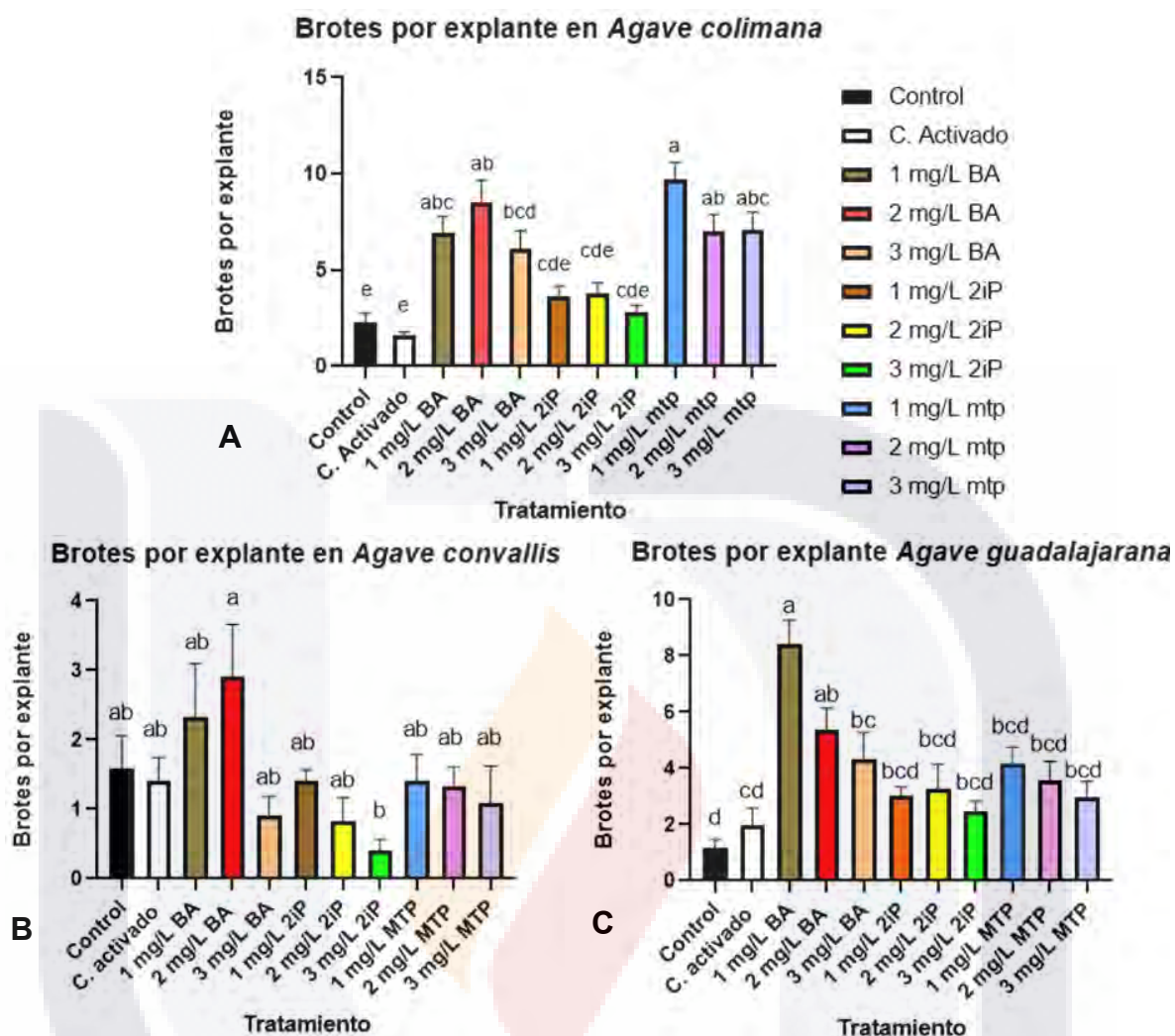


Figura 12. Respuesta morfogénica de brotes por explante ante tratamientos con BA, 2iP y mtp. en concentraciones de 1, 2 y 3 mg L⁻¹, tratamientos sin RCV con control y con carbón activado 2 g L⁻¹. Barras con error estándar, análisis de varianza y prueba de Tukey, $P \leq 0.05$, $n=10$ *Agave colimana* y *A. guadalajara*, $n=5$ para *A. convallis*. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa, A) *A. colimana*, B) *A. convallis* y C) *A. guadalajara*.

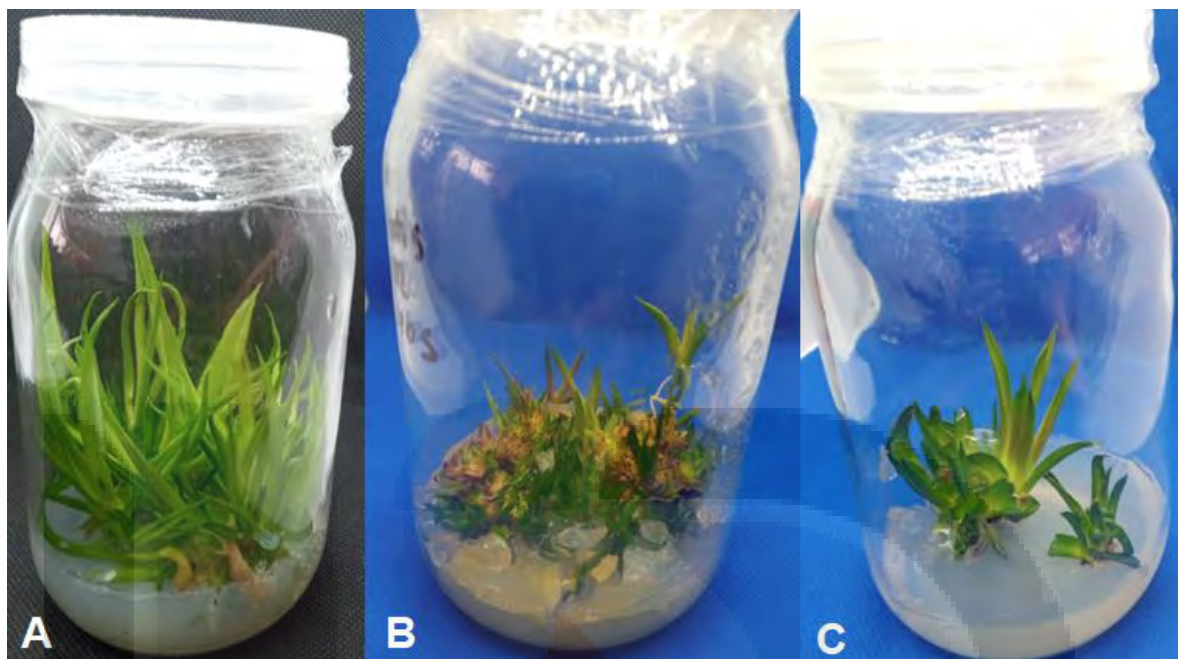


Figura 13. Brotes de *Agave colimana* (A), *A. convallis* (B) y *A. guadalajarana* (C) después de 60 días.

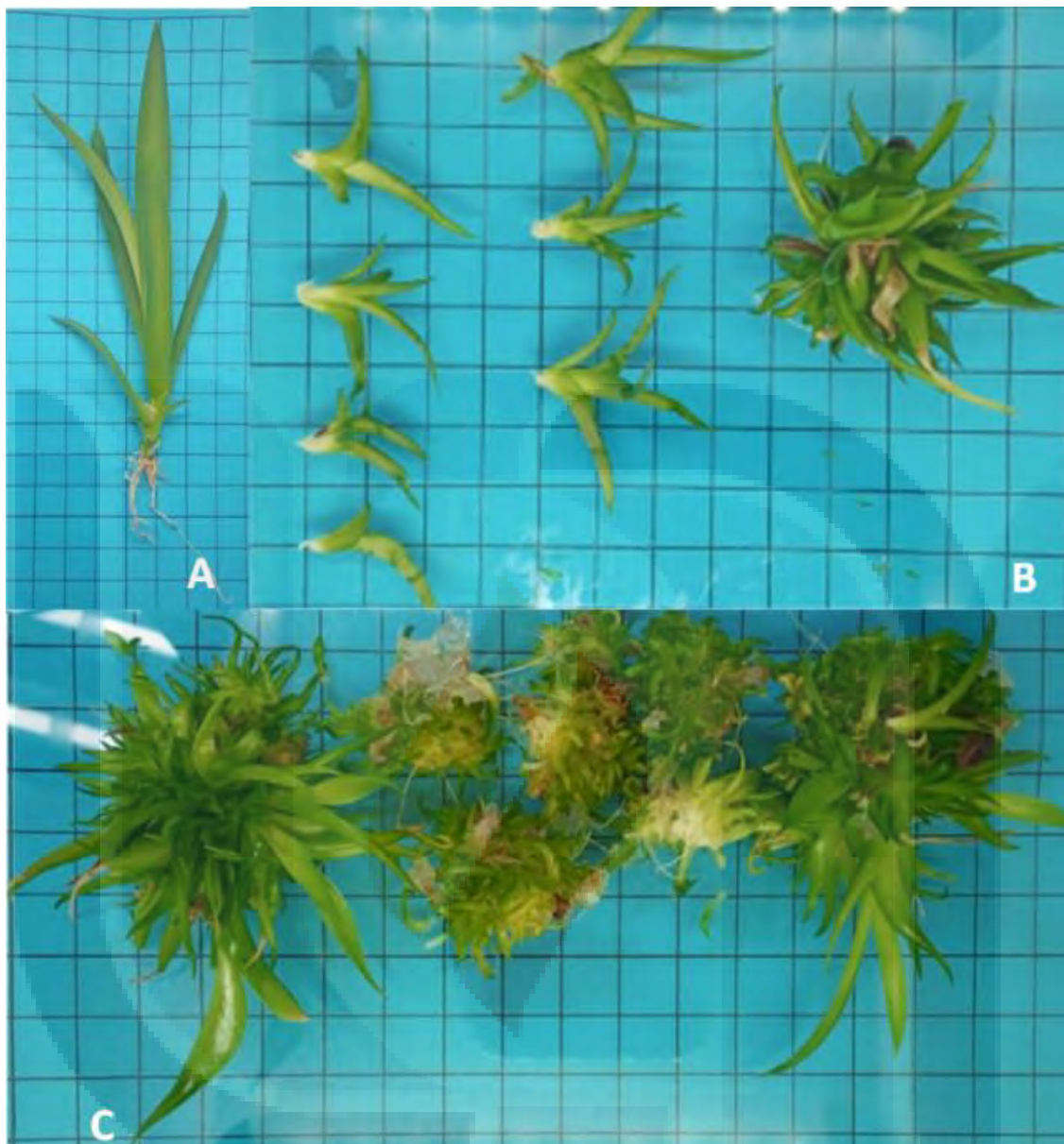


Figura 14. Explante de *Agave colimana* después de 60 días con un sistema radicular poco desarrollado (A), masa de brotes con explantes diferenciados y separados (B), y masas de brotes indiferenciados (C). Cada cuadro equivale a 1 cm².

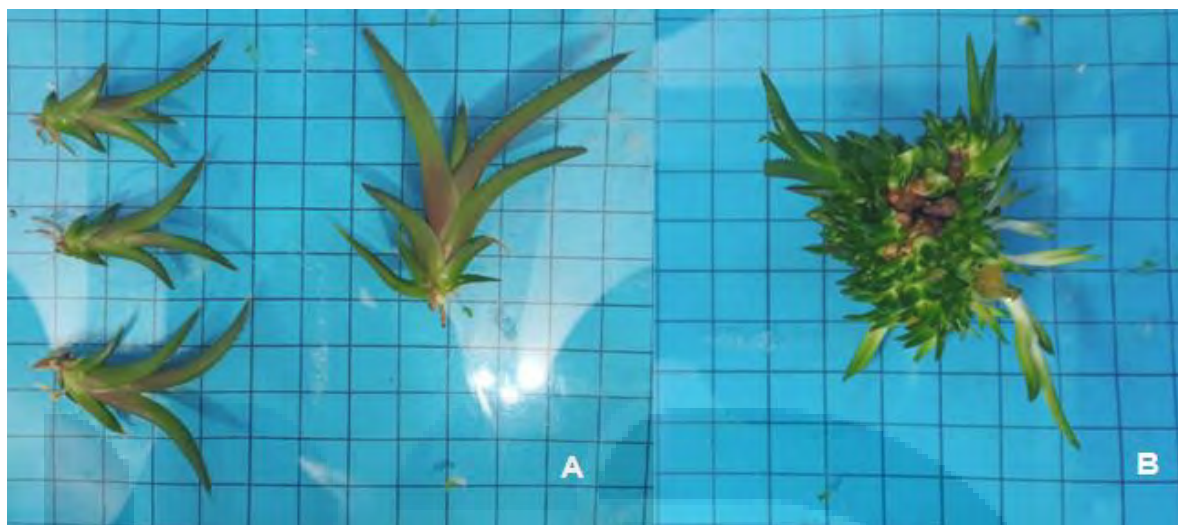


Figura 15. Explantes diferenciados de *Agave convallis* (A), masa de brotes con explantes indiferenciados (B). Cada cuadro equivale a 1 cm².

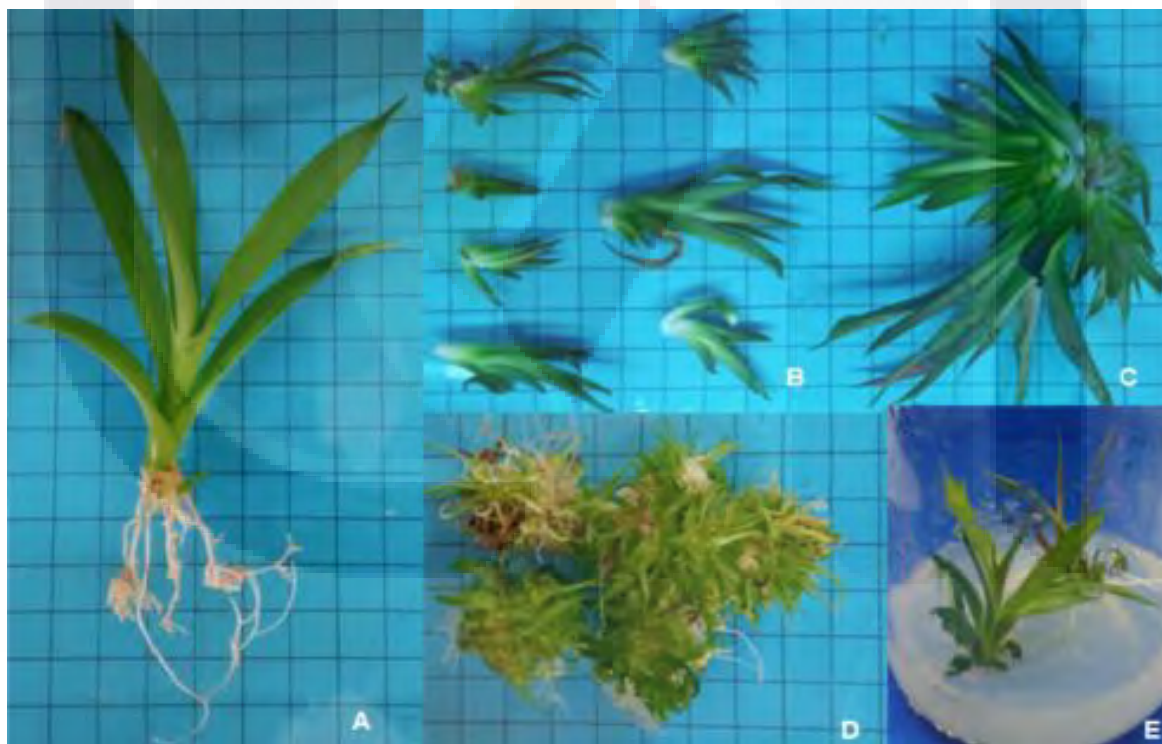


Figura 16. Explantes con sistema radicular después de 90 días de *Agave guadalupensis* (A), brotes por explante separados (B), masa de brotes diferenciados (C), masa de brotes indiferenciados (D), explantes de tratamiento control después de 60 días *in vitro* (E). Cada cuadro equivale a 1 cm².

8.1.2 Respuestas adicionales a la formación de brotes

Se observó la formación de tejido calloso en *A. convallis* (fig. 15). Esta especie presentó el crecimiento más lento en todos los tratamientos, con o sin RCV. La inducción de raíces fue más común en tratamientos con 2iP, sin RCV y con 2 g L⁻¹ de carbón activado (tabla 6).

El mayor tamaño de masas de brotes se obtuvo en tratamiento con carbón activado 2 g L⁻¹ y 3 mg L⁻¹ de metatopolina en *A. colimana*, y con 1 mg L⁻¹ de metatopolina para *A. convallis* y *A. guadalajara* (fig. 17). La medición se realizó considerando el diámetro desde la parte inferior de los frascos que contenían los explantes.

Tabla 6. Respuestas diferentes a la formación de brotes en *A. colimana*, *A. convallis* y *A. guadalajarana* con la adición de citocininas.

Tratamiento	<i>A. colimana</i>			<i>A. convallis</i>			<i>A. guadalajarana</i>		
	MB (cm)	TC (%)	FR (%)	MB (cm)	TC (%)	FR (%)	MB (cm)	TC (%)	FR (%)
	Promedio + EE			Promedio + EE			Promedio + EE		
Control	1.43± 0.41 ^{ab}	0	70	0.16± 0.16 ^c	0	60	0.39 ± 0.22 ^{bc}	0	40
Carbón activado	2.95± 0.33 ^a	0	50	0.47± 0.19 ^c	0	50	0.72 ± 0.30 ^{abc}	0	80
1 mg L ⁻¹ BA	0.86± 0.39 ^b	0	30	1.55± 0.54 ^{abc}	80	0	0.27± 0.12 ^c	0	20
2 mg L ⁻¹ BA	1.16± 0.22 ^{ab}	0	60	1.45± 0.38 ^{abc}	100	0	0.87± 0.32 ^{abc}	0	0
3 mg L ⁻¹ BA	1.62± 0.55 ^{ab}	0	20	2.02± 0.20 ^a	60	0	1.83± 0.36 ^a	0	40
1 mg L ⁻¹ 2iP	0.32± 0.22 ^b	0	90	0.24± 0.16 ^c	50	60	0 ^c	20	70
2 mg L ⁻¹ 2iP	0.71± 0.25 ^b	0	100	1.03± 0.33 ^{abc}	60	30	0 ^c	10	20
3 mg L ⁻¹ 2iP	1.37± 0.50 ^{ab}	0	90	0.56± 0.29 ^{bc}	80	0	0.26± 0.15 ^c	10	90
1 mg L ⁻¹ MTP	1.07± 0.54 ^{ab}	0	50	1.69± 0.28 ^{ab}	20	0	0.71± 0.20 ^{abc}	20	0
2 mg L ⁻¹ MTP	1.38± 0.53 ^{ab}	0	0	0.97± 0.34 ^{abc}	60	0	1.1± 0.39 ^{abc}	0	0
3 mg L ⁻¹ MTP	1.89± 0.53 ^{ab}	0	0	0.22± 0.14 ^c	80	0	1.53 ± 0.45 ^{ab}	30	0

Tabla 6. N=10 para todos los tratamientos, excepto *A. convallis* (n=5). Letras distintas indican diferencia estadística con la prueba de Tukey, $P \leq 0.05$. Siglas: masas de brotes (MB), tejido calloso (TC), formación de raíces (FR).

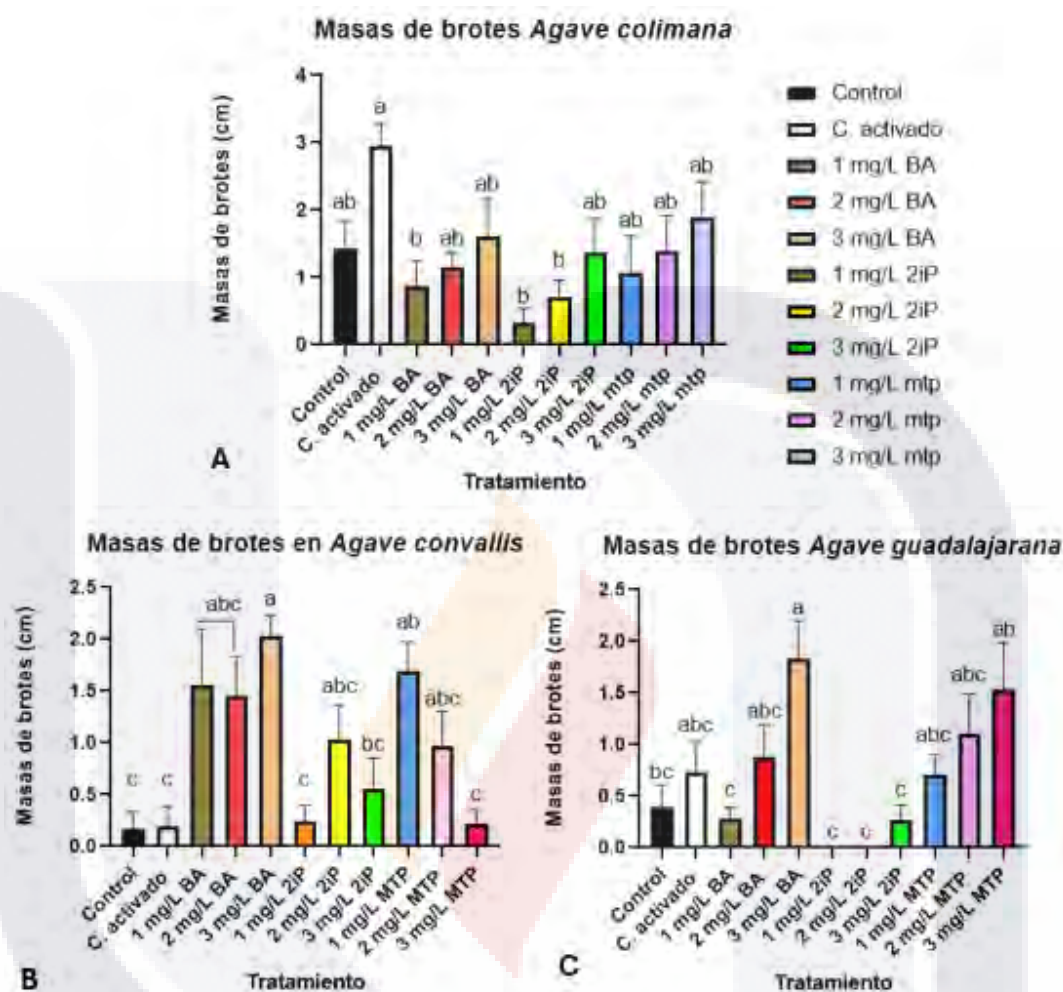


Figura 17. Masas de brotes indiferenciados en los distintos tratamientos con BA, 2iP y metatopolina en concentraciones de 1, 2 y 3 mg L⁻¹, tratamientos sin RCV y con carbón activado 2 g L⁻¹. Barras con error estándar, análisis de varianza y prueba de Tukey, $P \leq 0.05$, $n=10$ para *Agave colimana* y *A. guadalajara*, $n=5$ *A. convallis*. Letras indican diferencia estadística, A) *A. colimana*, B) *A. convallis* y C) *A. guadalajara*.

La mayor altura de los brotes se obtuvo con 1 mg L⁻¹ de metatopolina en las tres especies: 7 cm en *A. colimana*, 2.96 cm en *A. convallis* (estadísticamente igual en todos los tratamientos) y 8.11 cm en *A. guadalajarana* (fig. 18).

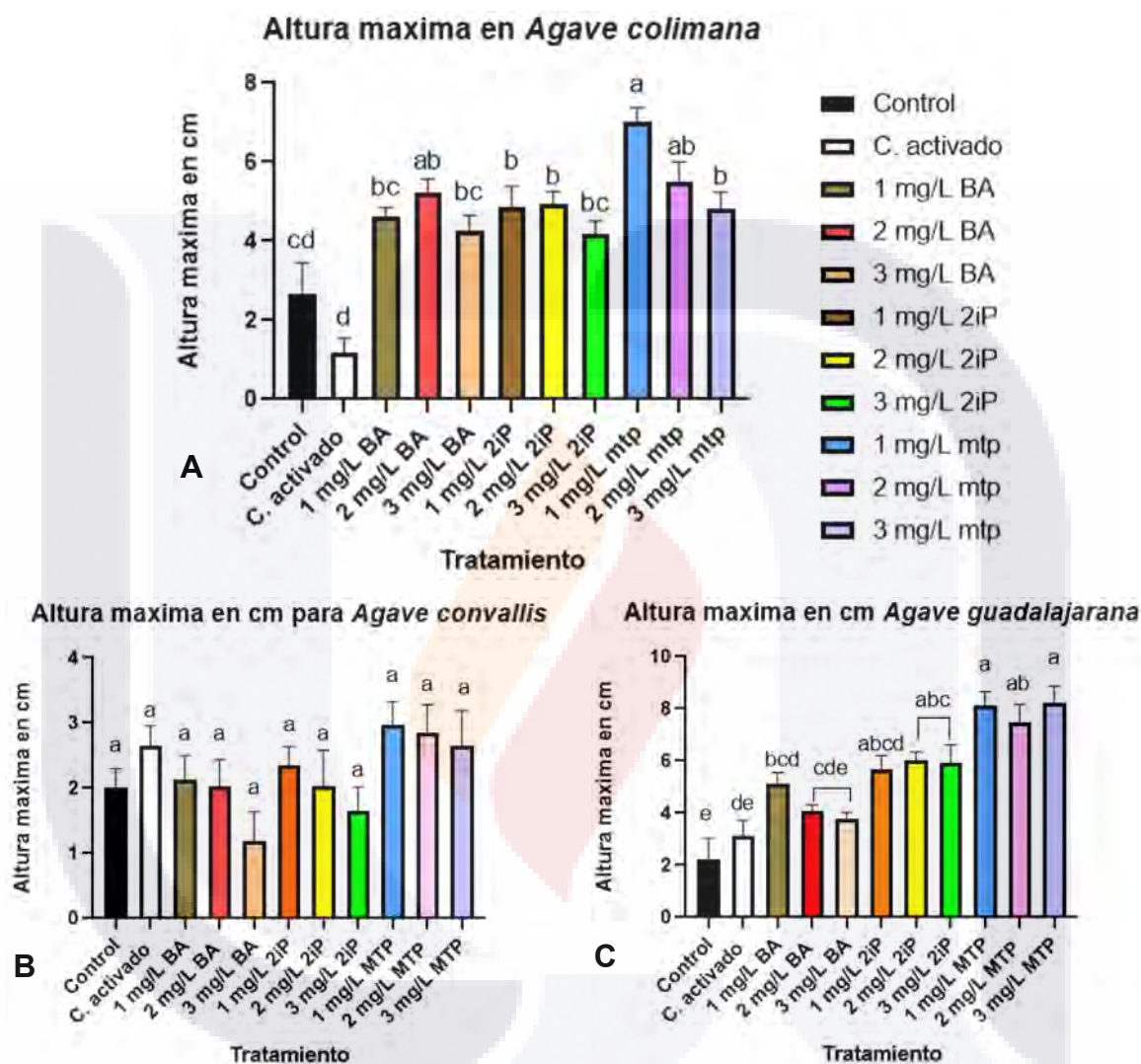


Figura 18. Altura máxima en centímetros ante tratamientos con citocinina BA, 2iP y metatopolina en concentraciones de 1, 2 y 3 mg L⁻¹, tratamientos sin RCV con control y con carbón activado 2 g L⁻¹. Barras con error estándar, análisis de varianza y Tukey, $P \leq 0.05$, $n=10$ para *Agave colimana* y *A. guadalajarana*, $n=5$ para *A. convallis*. Letras indican diferencia estadísticamente significativa. A) *A. colimana*, B) *A. convallis* y C) *A. guadalajarana*.

8.2 Respuesta morfogénica de los explantes *in vitro* ante tratamientos con auxinas y citocininas en el medio de cultivo de las especies de interés.

8.2.1 Formación de tejido calloso

Se combinó la concentración de citocinina que resultó en un mayor número de brotes por explante con la auxina picloram en tres tratamientos y un control. Las combinaciones se realizaron en proporciones 1:1, 1:2 y 2:1, (fig. 19).

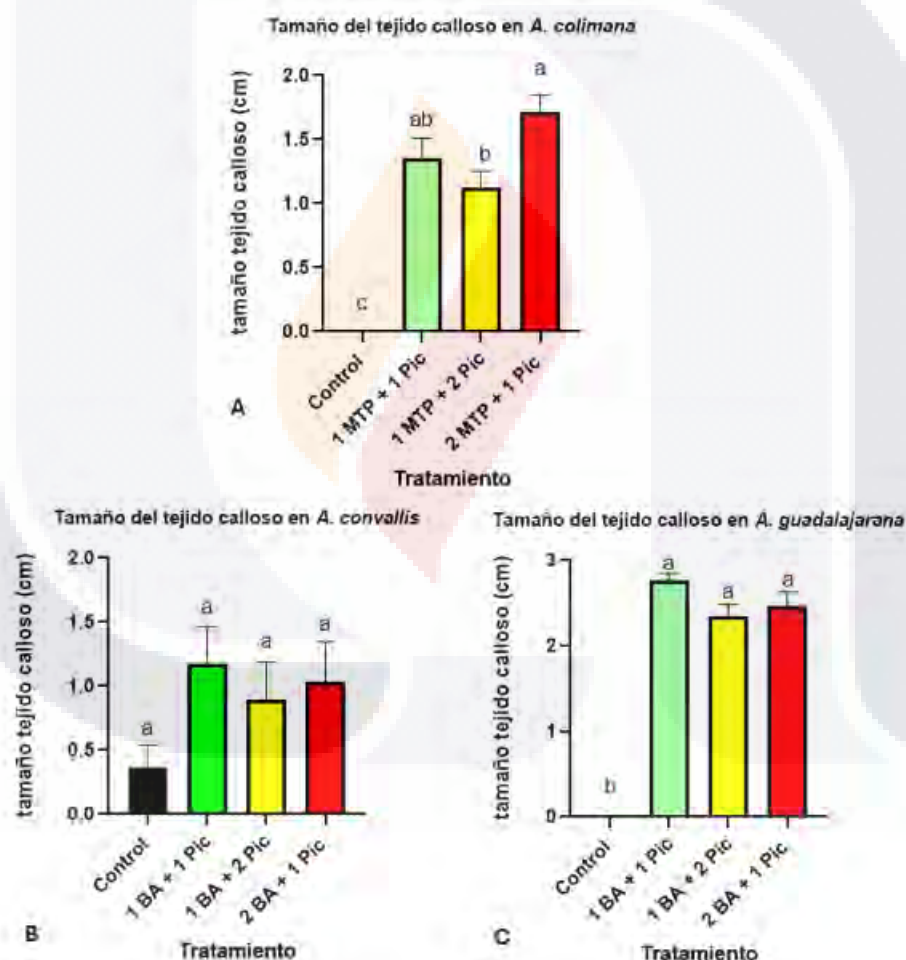


Figura 19. Diámetro en cm de cada explante para la formación de tejido calloso en combinaciones de auxina con citocinina. Barras con error estándar, análisis de varianza y prueba de Tukey, $P \leq 0.05$, $n=10$ para *Agave colimana* y *A.*

guadalajarana, n=5 para *A. convallis*. Letras indican diferencia estadística, A) *A. colimana*, B) *A. convallis* y C) *A. guadalajarana*.

Transcurridos 60 días después de la inoculación, se procedió a la toma de resultados. Todos los tratamientos con RCV (auxinas y citocininas) indujeron la formación de tejido calloso. Sin embargo, solo en *A. guadalajarana* se observó tejido organogénico, con formación de brotes (fig. 20).

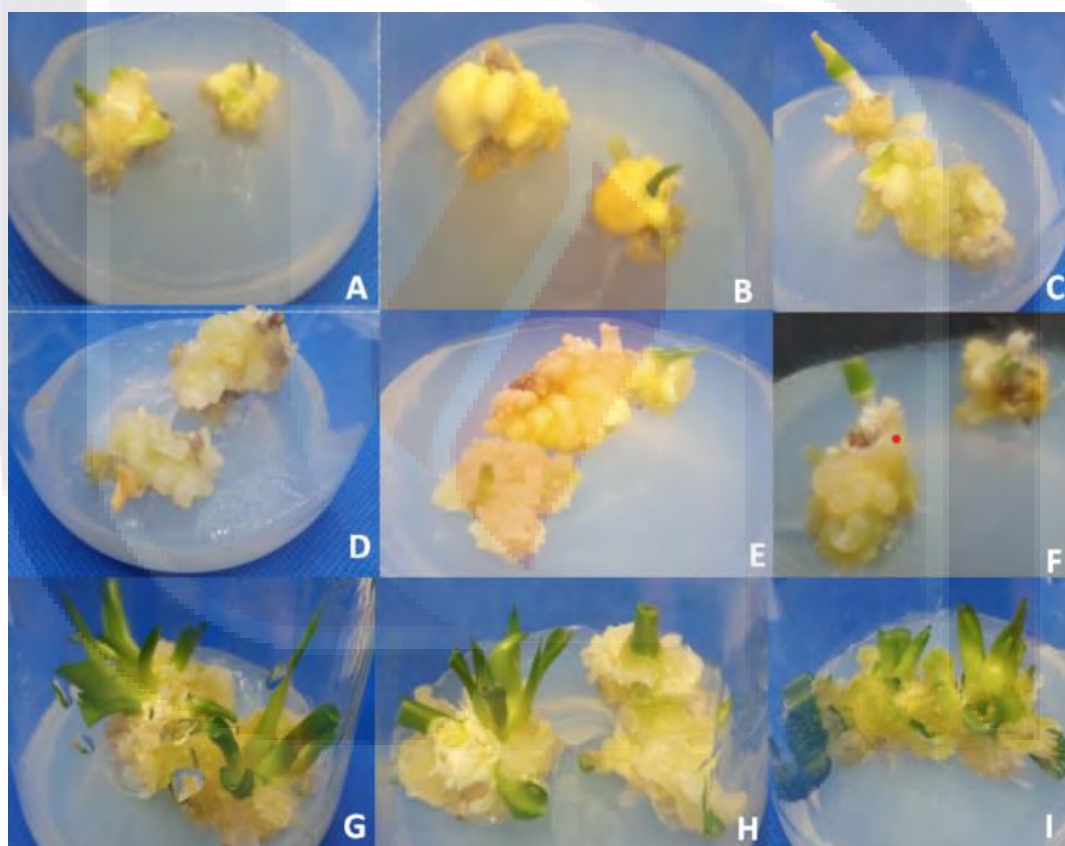


Figura 20. Formación de tejido calloso en *A. colimana* (A, B y C) con MTP y Picloram; *A. convallis* (D, E y F) y *A. guadalajarana* (G, H y I). Citocininas y picloram en diferentes proporciones (1:1, 1:2 y 2:1 mg L⁻¹).

8.2.2 Respuestas adicionales a la formación de tejido calloso

Se evaluó la formación de raíces, que fue nula en todos los tratamientos, excepto en el control sin RCV (Tabla 7).

Tabla 7. Respuestas diferentes a la formación de tejido calloso en *A. colimana*, *A. convallis* y *A. guadalajarana* con combinación de citocinina y auxina picloram.

	<i>A. colimana</i>		<i>A. convallis</i>		<i>A. guadalajarana</i>	
RCV (mg L ⁻¹)	TC (cm)	FR (%)	TC (cm)	FR (%)	TC (cm)	FR (%)
Sin RCV	0 ^c	60	0.37 ± 0.17 ^a	40	0 ^b	100
1 MTP + 1 PIC	1.35 ± 0.16 ^{ab}	0	1.17 ± 0.29 ^a	0	2.77 ± 0.08 ^a	0
1 MTP + 2 PIC	1.12 ± 0.13 ^b	0	0.89 ± 0.29 ^a	0	2.36 ± 0.13 ^a	0
2 MTP + 1 PIC	1.71 ± 0.13 ^a	0	1.03 ± 0.31 ^a	0	2.50 ± 0.17 ^a	0

N=10 para todos los tratamientos, excepto *A. convallis* (n=5). Letras distintas indican dentro diferencia estadísticamente significativa con la prueba de Tukey, $P \leq 0.05$. Siglas: tejido calloso (TC) y formación de raíces (FR).

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

Los porcentajes de supervivencia en las tres especies de *Agave* en invernadero, con tratamientos de enraizador Raizone[®] y biofertilizante micorrízico *Glomus intraradices*, se muestran en la Tabla 8. La mayor supervivencia para *Agave colimana* fue de 81.25% con Raizone, y para *A. convallis* y *A. guadalajarana* fue de 83.33% con polvo micorrízico; sin embargo, el número de repeticiones por tratamiento no fue el mismo para las tres especies.

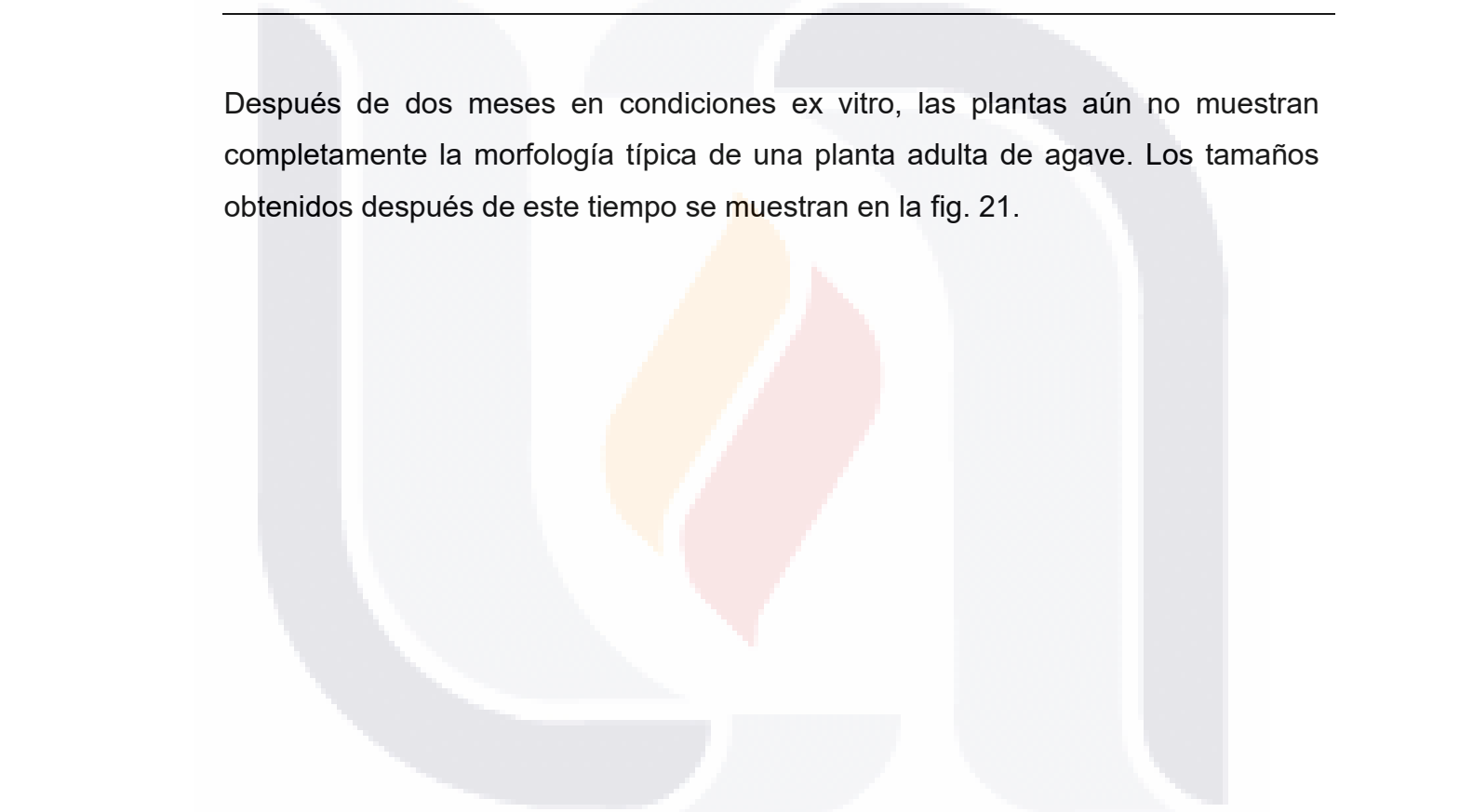


Tabla 8. Porcentaje (%) de supervivencia 22 días después a condiciones *ex vitro* de *A. colimana*, *A.convallis* y *A. guadalajarana* con Raizone y polvo micorrízico.

Tratamientos	<i>A. colimana</i>		<i>A. convallis</i>		<i>A. guadalajarana</i>	
	N=	Porcentaje de supervivencia	N=	Porcentaje de supervivencia	N=	Porcentaje de supervivencia
Raizone	16	81	13	77	13	77
Micorriza	16	75	12	83	12	83

Después de dos meses en condiciones *ex vitro*, las plantas aún no muestran completamente la morfología típica de una planta adulta de agave. Los tamaños obtenidos después de este tiempo se muestran en la fig. 21.

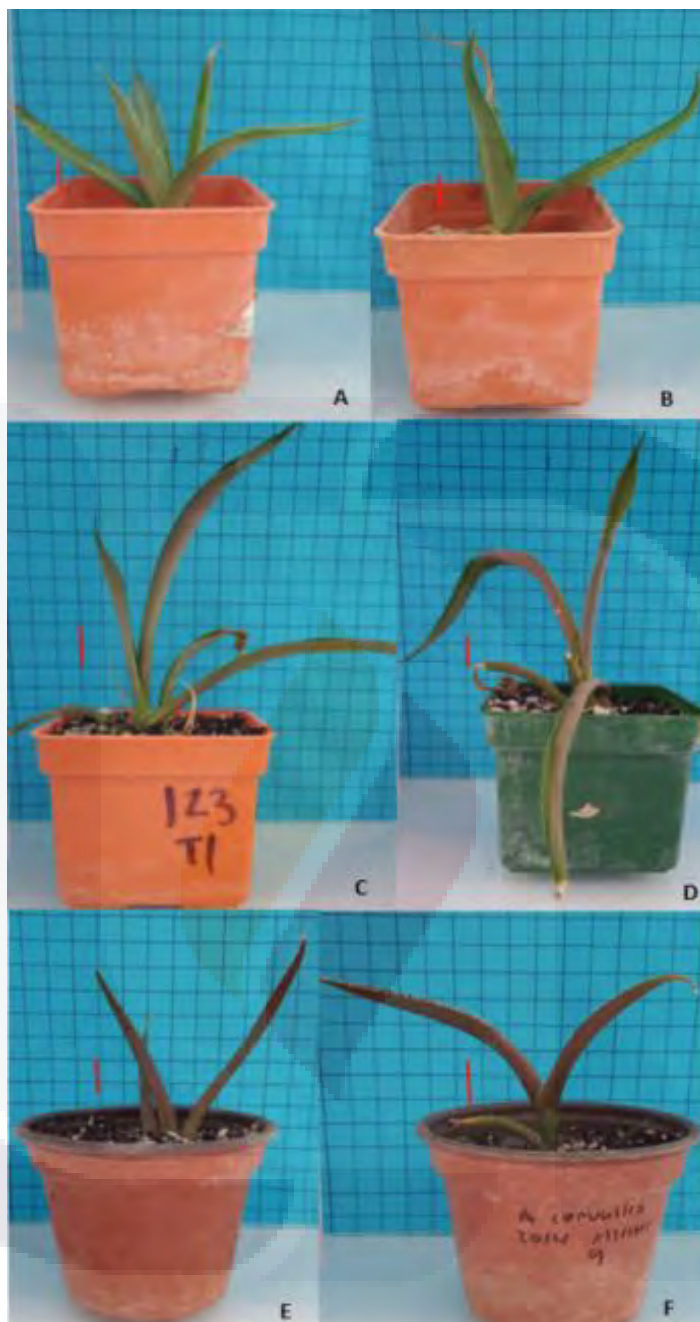


Figura 21. Plantas adaptadas a condiciones *ex vitro* después de 22 días. Tratamiento con raíces impregnadas con polvo enraizador Raizone® (A, C y E), y en tratamiento con raíces impregnadas con biofertilizante micorrízico en polvo *Glomus intradices* (B, D y F). A y B) *Agave colimana*, C y D) *A. guadalajarana*, E y F) *A. convallis*. Línea roja equivale a 1 cm.

9. Discusión

9.1 Multiplicación de brotes *in vitro* de las especies *Agave colimana*, *A. convallis* y *A. guadalajarana* a partir de explantes basales cultivados en medios semisólidos adicionados con citocininas.

El mejor tratamiento para la formación de brotes por explante varió entre las especies de *Agave*. En *A. colimana*, 1 mg L⁻¹ de metatopolina produjo el mayor número de brotes (9.7), mientras que en *A. convallis* y *A. guadalajarana*, 1 mg L⁻¹ de BA fue más efectivo (2.33 y 8.45 brotes, respectivamente). Este resultado concuerda parcialmente con estudios previos (Aureoles-Rodríguez *et al.*, 2008; Ríos-Ramírez *et al.*, 2017), Pasternak y Steinmacher (2024), mencionan de manera general, que el principal efecto de la citoquinina en el cultivo de tejidos *in vitro* es la inducción de brotes. La variación en la respuesta a las citocininas entre las especies subraya la importancia de optimizar los tratamientos para cada especie individualmente, como sugieren Pérez-Molphe-Balch *et al.* (2008), quienes obtuvieron 10.5 y 6.1 brotes por explante en *A. cupreata* y *A. karwinskii* utilizando 1.5 y 1 mg L⁻¹ de BA, respectivamente; sin embargo, *A. cupreata* no respondió a la metatopolina, y en *A. karwinskii* se observó una respuesta muy pobre a la misma hormona. La eficacia de 1mg L⁻¹ de metatopolina y 1mg L⁻¹ de BA, establecen que son las mejores hormonas para la propagación *in vitro* de las especies de *Agave* estudiadas y por lo tanto serían las ideales para la creación de una metodología replicable.

Como resultado de los tratamientos con citocininas, además de brotes bien formados se observaron masas de brotes indiferenciados, particularmente en *A. convallis*, lo que sugiere la necesidad de explorar tratamientos adicionales para promover la diferenciación de estos brotes y convertirlos en plantas. Este fenómeno, descrito por Chávez-Ortiz *et al.* (2021) como "conglomerados de brotes", dificulta el conteo preciso y requiere de estrategias para inducir la completa diferenciación y

desarrollo de brotes individuales. Por ejemplo, estas masas de brotes resultan un explante ideal para ser inoculado en biorreactores, en donde los brotes se diferencian en poco tiempo con lo que se obtiene una tasa de multiplicación mucho más alta que la observada directamente en explantes basales tratados con citocininas (Chávez-Ortiz y Pérez-Molphe-Balch, 2024). La formación de tejido calloso presentó variaciones entre las especies: fue ausente en *A. colimana*, común en *A. convallis* y esporádica en *A. guadalajarana*. La presencia significativa de callo en *A. convallis*, incluso utilizando meristemos, contradice la recomendación de Aureoles-Rodríguez *et al.* (2008) para *A. inaequidens*, donde se busca evitarlo mediante el uso de meristemos. Dado que la concentración más baja de BA (1 mg L⁻¹) resultó favorable para esta especie, una estrategia futura podría consistir en una segunda serie de experimentos con concentraciones más finas de BA (0.5, 1 y 1.5 mg L⁻¹) para identificar una respuesta aún óptima. Sin embargo, limitaciones de tiempo y disponibilidad de material vegetal en *A. convallis* impidieron la realización de esta etapa."

9.2 Respuesta morfogénica de los explantes *in vitro* ante tratamientos con auxinas y citocininas en el medio de cultivo de las especies de interés.

Aunque en general en el cultivo de tejidos vegetales se utilizan combinaciones de auxinas y citocininas para inducir formación de tejido calloso, en algunas especies de agaves se ha reportado la generación de brotes al combinar ambos grupos de reguladores de crecimiento vegetal (Reyes-Zambrano *et al.*, 2016; Ríos-Ramírez *et al.*, 2017; Aguilar-Jiménez y Rodríguez de la O, 2018).

Sin embargo, en este trabajo la combinación de citocininas metatopolina para *A. colimana* y BA para *A. convallis* y *A. guadalajarana*) con picloram indujo la formación de tejido calloso en las tres especies. Este resultado contrasta con lo reportado por Ríos-Ramírez *et al.* (2017) sobre la sinergia entre auxinas y citocininas en la formación de brotes, pero concuerda con lo reportado por Chávez-Ortiz *et al.* (2021),

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

quienes utilizaron BA y 2,4-D en *A. guiengola*, donde al combinarse siempre resultaron en la inducción de tejido calloso. Flores Morales *et al.* (2023) reportaron lo mismo para la especie *Agave salmiana* var. *púa larga*, donde el 90% de los explantes en tratamientos que tenían la auxina ANA y la citocinina BA en concentración de 1 mg L⁻¹ presentaron callogénesis.

La formación de tejido organogénico solo se observó en *A. guadalajarana*, lo que sugiere diferencias en la respuesta a las auxinas entre las especies, según Arzate-Fernández *et al.* (2020). Para estos casos, se puede proceder con una organogénesis indirecta para la posterior formación de la plántula donde el tejido calloso fue cambiado a otro medio de cultivo únicamente adicionado con BA. La nula formación de raíces en estos tratamientos indica que la combinación de auxinas y citocininas no es adecuada para la rizogénesis *in vitro* en estas especies. Arzate-Fernández *et al.* (2020) reportan que en *A. marmorata* y *A. salmiana*, solo el 5% de los brotes generados por organogénesis indirecta enraizaron, por lo que esta vía de regeneración no es una alternativa viable si se busca la posterior aclimatación de la plántula.

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

Durante la aclimatación en invernadero las tres especies mostraron porcentajes de supervivencia variables: 81.25% para *A. colimana* con enraizador comercial Raizone ® y 83.33% para *A. convallis* y *A. guadalajarana* con micorrizas. Se ha reportado que el uso de micorrizas arbusculares facilitan la aclimatación *ex vitro* de las plantas (Roveda *et al.*, 2007). Sin embargo, estos índices de supervivencia son comparables a los obtenidos en otros estudios con diferentes especies de agaves, utilizando distintos substratos (Aureoles-Rodríguez *et al.*, 2008; Aguilar-Jiménez y Rodríguez de la O, 2018; Chávez-Ortiz *et al.*, 2021). En el caso de las micorrizas, su efecto más importante se espera en el desarrollo a largo plazo de las plantas, lo

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

cual no fue posible observar por cuestiones de tiempo en el marco de este trabajo y la falta de un tratamiento control sin Raizone y micorrizas. La variación en los porcentajes de supervivencia entre estudios subraya la influencia del sustrato y otros factores ambientales en la aclimatación. Los resultados obtenidos muestran que el polvo enraizador y el biofertilizante micorrízico son de gran ayuda para la supervivencia de las plantas de agave en condiciones *ex vitro*; sin embargo, es necesario realizar más experimentos con el fin de comparar los resultados de plantas que sí fueron tratadas con estos productos y las que no.



10. Conclusión

Se logro desarrollar una metodología para propagar las especies de *A. colimana*, *A. convallis* y *A. guadalajara* *in vitro* a partir de meristemas cultivados en medios semisólidos adicionados con citocininas, la concentración que resulto en un mayor número de brotes fue de 1 mg L⁻¹ de metatopolina para *A. colimana*, y 1 mg L⁻¹ de BA para *A. convallis* y *A. guadalajara* respectivamente.

Se evaluaron las respuestas morfogénicas ante tratamientos con RCV, a partir de la citocinina que resulto en una mayor eficiencia de brotes por explante y adicionado con la auxina picloram en proporciones 1:1, 1:2 y 2:1, resultando en la generación de tejido calloso en todos los tratamientos que tenían citocinina y auxina para *A. colimana* y *A. convallis* y tejido calloso organogénico para *A. guadalajara*, en todos los tratamientos con citocinina y auxina.

Se desarrollo una metodología para enraizar y adaptar a suelo las plantas generadas *in vitro*, en Agave colimana el mayor porcentaje de supervivencia fue de 81.25% y se logró con polvo enraizador Raizone © y de 83.33% para las especies de *A. convallis* y *A. guadalajara* con esporas en polvo micorrícico.

Los sistemas para el cultivo y propagación *in vitro* desarrollados en este trabajo pueden contribuir a la conservación de tres especies de Agave poco estudiadas, pero de gran importancia ecológica y potencial de ser aprovechadas de manera racional.

En *A. colimana* el tratamiento en el que se obtuvo mayor tamaño de tejido calloso fue de 1 mg L⁻¹ de MTP con 1 mg L⁻¹ de PIC; para generar un sistema radicular en el 100% de los brotes fue con la adición de 2 mg L⁻¹ de 2iP; y para la supervivencia a condiciones *ex vitro* con polvo enraizador Raizone ®.

En *A. convallis* el tratamiento en el que se obtuvo mayor tamaño de tejido calloso fue de 1 mg L⁻¹ de MTP con 1 mg L⁻¹ de PIC; para generar un sistema radicular en

el 60% de los brotes fue el tratamiento sin RCV; y para la supervivencia a condiciones *ex vitro* con esporas en polvo micorrícico.

En *A. guadalajarana* el tratamiento en el que se obtuvo mayor tamaño de tejido calloso fue de 1 mg L⁻¹ de MTP con 1 mg L⁻¹ de PIC; para generar un sistema radicular en el 80% de los brotes el mejor tratamiento fue la adición de carbón activado 2 g L⁻¹; y para la supervivencia a condiciones *ex vitro* con esporas en polvo micorrícico.



11. Referencias

Agave guadalupensis Trel., Contr. U. S. Nat. Herb. 23: 123, 1920.

Aguilar-Jiménez, D., y Rodríguez de la O, J. L. (2018). Micropropagación y aclimatación de Maguey Pitzometl (*Agave marmorata* Roez) en la Mixteca Poblana. Revista Colombiana de Biotecnología. 20(2), 124–131. doi:10.15446/rev.colomb.biote.v20n2.77084

Andrade, J. L., Barrera, E. D., Reyes-García, C., Ricalde, M. F., Vargas-Soto, G., y Cervera, J. C. (2007). El metabolismo ácido de las crasuláceas: diversidad, fisiología ambiental y productividad. Boletín de la Sociedad Botánica de México, (81), 37-50.

Arzate-Fernández, A. M., Martínez-Velasco, I., Alvarez-Aragón, C., Martínez-Martínez, S. Y., & Norman-Mondragon, T. H. (2020). Morphogenetic response of two agave species regenerated in vitro. Tropical and Subtropical Agroecosystems, (23), 47. doi.org/10.56369/tsaes.3201

Aureoles-Rodríguez, F., Rodríguez-de la O, J. L., Legaria-Solano, J. P., Sahagún-Castellanos, J., y Peña Ortega, M. G.. (2008). Propagación *in vitro* del 'Maguey bruto' (*Agave inaequidens* Koch), una especie amenazada de interés económico. Revista Chapingo. Serie horticultura, 14(3), 263-269. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1027152X2008000300006&lng=es&tlng=es.

Aureoles-Rodríguez, F., Rodríguez-de la O, J. L., Legaria-Solano, J. P., Sahagún-Castellanos, J., y Peña Ortega, M. G. (2008). Propagación *in vitro* del "maguey bruto" (*Agave inaequidens* Koch), una especie amenazada de interés económico. Revista Chapingo Serie Horticultura, 14(3), 263-269.

Bautista-Castellanos, A., Valle, J., Velasco-Velasco, V., y Rodríguez-Ortiz, G. (2020). Enraizamiento *in vitro* de brotes y aclimatación de plantas de *Agave potatorum* Zucc. Ecosistemas y Recursos Agropecuarios, 7(3). doi:10.19136/era.a7n3.2618

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Binh, L. T., Muoi, L. T., Oanh, H. T. K., Thang, T. D., y Phong, D. T. (1990). Propagación rápida del agave mediante cultivo de tejidos *in vitro*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 23(1), 67–70. doi.org/10.1007/bf00116091

Brian Kemble. (2006). *Agave guadalajarana*. Cactus and Succulent Journal 78(3), 126-130. [https://doi.org/10.2985/0007-9367\(2006\)78\[126:AG\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.2985/0007-9367(2006)78[126:AG]2.0.CO;2)

Campbell, C. S., Kellogg, E. A., Stevens, P. F., Donoghue, M. J., y Judd, W. S. (2016). Plant systematics: a Phylogenetic Approach. Sinauer Associates, Inc. Sunderland. (4th ed.), 464-576, 611 and 677.

Carrillo-Trueba, L.A. (2009). Los destilados de agave en México y su denominación de origen. Ciencias, (087). Recuperado a partir de [https://revistas.unam.mx /index .php/cns/article/view/12111](https://revistas.unam.mx/index.php/cns/article/view/12111)

Chase, M. W., J. L. Reveal y M. F. Fay. 2009. Una clasificación subfamiliar para las familias ampliadas de asparagaleas Amaryllidaceae, Asparagaceae y Xanthorrhoeaceae 161(2), 132-136. doi.org/10.1111/j.1095-8339.2009.00999.x

Chávez-Ortiz, L.I., Morales-Domínguez, J.F., Rodríguez-Sahagun, A., y Pérez-Molphe-Balch, E. (2021). *In Vitro* Propagation of *Agave guiengola* Gentry Using Semisolid Medium and Temporary Immersion Bioreactors. Phytion-International Journal of Experimental Botany, 90(3), 1003-1013. doi:10.32604/phyton.2021.012862

Chávez Ortiz, L.I., Pérez Molphe Balch, E. 2024. In Vitro Propagation of Threatened Agave Species Using a Two-Stage System. In: Loyola-Vargas, V., Ochoa-Alejo, N. (eds) Plant Cell Culture Protocols. Methods in Molecular Biology, vol 2827. Humana, New York, NY. https://doi-org.dibpxy.uaa.mx/10.1007/978-1-0716-3954-2_11

Colunga-García M. P. y May-Pat F. (1993). Agave studies in Yucatán, México. Past and present germplasm diversity and uses. Economic Botany 47(3), 312-327.

Colunga-García, M. P., A. S. Larqué, L. E. Eguiarte y D. Zizumbo-Villarreal. (2007). En lo ancestral hay futuro: del tequila, los mezcales y otros agaves. CICY CONACYT-CONABIO-INE. Mérida, Yucatán. 402 p.

Cruz-García, H., Campos, V., Enríquez-del-Valle, R., Velasco-V., y Rodríguez-Ortiz, G. (2017). Senescencia foliar en plantas micropropagadas de *Agave americana* durante su aclimatización. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas, 8(2), 381-391. doi.org/10.29312/remexca.v8i2.58

Dahlgren R.M., Clifford H.T. y Yeo P.F. (1985). The Families of the Monocotyledons: Structure, Evolution, and Taxonomy. Springer-Verlag, Berlin, 520. doi.org/10.1007/978-3-642-61663-1

Departamento de Botánica, Instituto de Biología (IBUNAM), *Agave colimana* Gentry, ejemplar de: Herbario Nacional de México (MEXU), Tipos de Plantas Vasculares. En Portal de Datos Abiertos UNAM (en línea), México, Universidad Nacional Autónoma de México. Disponible en: <http://datosabiertos.unam.mx/IBUNAM:MEXU:T129944>

Departamento de Botánica, Instituto de Biología (IBUNAM), *Agave colimana* Gentry, ejemplar de: Herbario Nacional de México (MEXU), Plantas Vasculares. En *Portal de Datos Abiertos UNAM*, México, Universidad Nacional Autónoma de México. <http://datosabiertos.unam.mx/IBUNAM:MEXU:253416>

Dévora-Rodríguez, D., Pulido-Díaz, C., Chávez-Simental, J., Ortiz-Sánchez, I., Loera, H., y Prieto-Ruiz, J. (2021). Reguladores de crecimiento en el desarrollo vegetativo de vitroplantas de *Agave durangensis* Gentry. Ecosistemas y Recursos Agropecuarios, 8(1), e2720. doi:10.19136/era.a8n1.2720

Domínguez-Rosales, M. S., González-Jiménez, M. D., Rosales-Gómez, C., Quiñones-Valles, C., Delgadillo-Díaz-de-León, S., Mireles-Ordaz, S. J., y Pérez Molphe-Balch, E. (2008). El cultivo *in vitro* como herramienta para el aprovechamiento, mejoramiento y conservación de especies del género agave. Investigación y Ciencia, 16(41), 53-62.

Pérez-Molphe-Balch, E., Domínguez-Rosales, MS, Alpuche-Solís, AG, Vasco-Méndez, NL. (2008). Efecto de citocininas en la propagación *in vitro* de agaves mexicanos. *Revista Fitotecnia Mexicana*, (31), 317–322.

Eguiarte, L. E., Souza, V., y Silva-Montellano, A. (2000). Evolución de la familia Agavaceae: filogenia, biología reproductiva y genética de poblaciones. *Ciencias Botánicas*, (66), 131 – 150. doi.org/10.17129/botsci.1618

Endlicher, Stephan. (1841). *Enchiridion botanicum, exhibens classes et ordines plantarum accedit nomenclator generum et officinalium vel usualium indicatio*. Sumptibus G. Engelmann. doi.org/10.5962/bhl.title.7559 Flores Morales, A., Chávez Avila, V. M., & Jiménez Estrada, M. (2023). Evaluación de una alternativa de propagación de maguey pulquero (*Agave salmiana*) var. púa larga. *Revista Mexicana De Agroecosistemas*. 8(1), 46–58. <https://revistaremaeitvo.mx/index.php/remae/article/view/270>

García-Mendoza y V. R. (1995). Riqueza de las Agavaceae y Nolinaceae en México. *Boletín de la Sociedad Botánica México* (56), 7-24. doi.org/10.17129/botsci.1461

García-Mendoza, A. J., (2010). Revisión Taxonómica del complejo *Agave potatorum* zucc. (*Agavaceae*): nuevos taxa y neotipificación. *Acta Botánica Mexicana*, (91), 71-93. doi.org/10.21829/abm91.2010.292

García-Mendoza, A. J., Franco-Martínez, I., y Sandoval-Gutiérrez, D. (2019). Cuatro especies nuevas de *Agave* (Asparagaceae, Agavoideae) del sur de México. *Acta botánica mexicana*, (126), e1461. doi.org/10.21829/abm126.2019.1461

García-Mendoza, A.J. (2007). Los agaves de México. *Ciencias*, (87), 14–23. <https://www.revistas.unam.mx/index.php/cns/article/view/12113>

García-Mendoza, A.J., Casas, A., Sandoval-Gutiérrez, D. y Torres-García, I. (2019). *Agave convallis*. La Lista Roja de Especies Amenazadas de la IUCN 2019: <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2019-3.RLTS.T114937274A114963541>.

García-Moya, E.; Romero-Manzanares, A.; Nobel, P.S. (2011). Highlights for Agave productivity. GCB Bioenergy. (3), 4–14. doi.org/10.1111/j.17571707.2010.01078.x.

Gentry, H. S. (1968). *Agave geminiflora* and *Agave colimana* spec. nov. (40), 208-13.

Gentry, HS (1982). *Agaves of Continental North America*. Tucson: The University of Arizona Press.

Gil C., A. I., Ariza C., C., Castillo-T., L., Salgado-D., L., Banda-Sánchez, L. y Vanegas M., L. (2019). Inducción de organogénesis *in vitro* con 6-bencilaminopurina en *Cattleya trianae* Linden y Rchb.f.. Revista U.D.C.A Actualidad y Divulgación Científica, 22(2), e1275. doi.org/10.31910/rudca.v22.n2.2019.1275

Groenewald, EG, Wessels DCJ, Koeleman A (1977). Callus formation and subsequent plant regeneration from seed tissue of an Agave species (*Agavaceae*) *Z. Pflanzenphysiol.* 21(4), 369-373. doi.org/10.1016/s0044-328x(77)80105-0

Hernández-Vera, G., MJ. Cházaro-Basañez y E. Flores-Berrios. (2007). Inventory and distribution of Agave (*Agavaceae*) species in Jalisco, México. Journal of the Botanical Research Institute of Texas, 1(1), 499-509.

Hoch, W. A.; Singaas, E. L. and Mc-Cown, B. H. (2003). Resorption protection. Anthocyanins facilitate nutrient recovery in Autumn by shielding leaves from potentially damaging light levels. Plant Physiol. (133), 1296-1305. doi:10.1104/pp.103.027631.

Índice Internacional de Nombres de las Plantas (s.f.) <http://www.ipni.org>

Jain, S. M., y Nakhooda, M. (2017). Clonal and micropropagation. In: MURPHY, D. J.; MURRAY, B. G. (Ed.). Encyclopedia of Applied Plant Sciences (2nd ed.), 428-432. doi:10.1016/B978-0-12-394807-6.00144-1

León-Vázquez, N. I., Campos-Ángeles, G., Enríquez-del Valle, J., Velasco-Velasco, V., M., Francisco, y Rodríguez-Ortiz. (2013). Diversidad de especies de agave en

San Miguel Tilquiapam, Ocotlán, Oaxaca. Revista mexicana de ciencias agrícolas, 4(spe6), 1185-1195.

Malda, G., Backhaus, R. A., & Martin, C. (1999). Alterations in growth and crassulacean acid metabolism (CAM) activity of in vitro cultured cactus. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 58(1), 1-9. <https://doi.org/10.1023/A:1006377206855>

Mezcal colores. (s.f.). Producto Mezcla jabalí. <https://mezcalcolores.com/producto/mezcal-maguey-jabali/>

Murashige, T. y Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Plant Physiology*. 15(3), 473-497. doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x

Nava-Cruz, N. Y., Medina-Morales, M. A., Martinez, J. L., Rodriguez, R., y Aguilar, C. N. (2014). Agave biotechnology: an overview. *Critical Reviews in Biotechnology*, 35(4), 546–559. <https://doi.org/10.3109/07388551.2014.923813>

Pasternak, T. P., y Steinmacher, D. (2024). Plant Growth Regulation in Cell and Tissue Culture *In Vitro*. *Plants*. 13(2), 327. <https://doi.org/10.3390/plants13020327>

Pérez-Hernández, E., Chávez-Parga, M. del C., y González-Hernández, J. C. (2016). Revisión del agave y el mezcal. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 18(1), 148-164. doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v18n1.49552

Pérez-Molphe-Balch, E., Domínguez-Rosales, M., Vasco-Méndez, N., y Alpuche-Solís, A. (2008). Efecto de citocininas en la propagación *in vitro* de agaves mexicanos. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 31(4), 317-322. [doi:10.35196/rfm.2008.4.317](https://doi.org/10.35196/rfm.2008.4.317)

Powers, D. E., y Backhaus, R. A. (1989). Propagación *in vitro* de *Agave arizonica* Gentry y Weber. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 16(1), 57–60. doi.org/10.1007/bf00044072

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Radding, C. (2012). The children of Mayahuel: agaves, human cultures, and desert landscapes in northern Mexico. *Environmental Histor.* (17), 84 - 115. doi:10.1093/envhis/emr118

Ramírez, J. F., De la Torre-Villar, E. (2001). Códice Boturini: Tira de la peregrinación mexicana. *Obras históricas. Tomo I. Universidad Nacional Autónoma de México.* 241-246.

Ramírez-Rodríguez, R. (2020). El desarrollo de los estudios sobre el maguey en México, de la Ilustración a la Revolución. *Saberes. Revista De Historia De Las Ciencias Y Las Humanidades*, 3(7), 93-117. <https://www.saberesrevista.org/ojs/index.php/saberes/article/view/164>

Read, P., y Preece, J. (2014). Cloning: Plants - Micropropagation/Tissue Culture. *Encyclopedia of Agriculture and Food Systems.* (2), 317–336. doi.org/10.1016/B978-0-444-52512-3.00224-2

Reveal, J. L. 2012. An outline of a classification scheme for extant flowering plants. *Phytoneuron.* (37), 1-221. <https://www.biodiversitylibrary.org/part/174898>

Reyes-Zambrano, S. J., Lecona-Guzmán, C. A., Barredo-Pool, F. A., Calderón, J. D. A., Abud-Archila, M., Rincón-Rosales, R., Ruiz-Valdiviezo, V. M., y Gutiérrez-Miceli, F. A. (2016). Plant growth regulators optimization for maximize shoots number in *Agave americana* L. by indirect organogenesis. *Gayana. Botánica.* 73(1), 124–131. doi.org/10.4067/S0717-66432016000100014

Ríos-Ramírez, S., Valle, J., Rodríguez-Ortiz, G., y Ruíz-Luna, J. (2017). Concentraciones de bencilaminopurina y ácido indol-3-acético en la proliferación *in vitro* de brotes adventicios de *Agave angustifolia*. *Ciencia e Investigación Agraria.* 44(3), 284–293. doi:10.7764/rcia.v44i3.1810

Robert, M. L., Herrera, J. L., Contreras, F., y Scorer, K. N. (1987). Propagación *in vitro* de *Agave fourcroydes* Lem. (Henequen). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 8(1), 37–48. doi.org/10.1007/bf00040731

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Roveda, G., Cabra, L., Ramírez, M. M., y Peñaranda, A. (2007). Efecto de las micorrizas arbusculares sobre la aclimatación y endurecimiento de microplántulas de mora (*Rubus glaucus*). Ciencia y Tecnología Agropecuaria, 8(1), 28-36. doi.org/10.21930/rcta.vol8_num1_art:80

Santacruz-Ruvalcaba, F., Castañeda-Nava, J. J., Villanueva-González, J. P., García-Sahagún, M. L., Portillo, L., y Contreras-Pacheco, M. L. (2022). Micropropagación de *Agave maximiliana* Baker por proliferación de yemas axilares. Polibotánica. (54), 139-151. doi.org/10.18387/polibotanica.54.9

Simcha, L.-Y. (2017). How monocarpic is Agave? Flora. (230), 12–13. doi:10.1016/j.flora.2017.03.002

Torres-García, I., García-Mendoza, A.J. y Sandoval-Gutiérrez, D. (2019). *Agave guadalajarana*. La Lista Roja de Especies Amenazadas de la IUCN 2019: <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2019-3.RLTS.T115629200A116353893.en>.

Torres-García, I., García-Mendoza, A.J., Sandoval-Gutiérrez, D. y Casas, A. (2019). *Agave ortgiesiana*. La Lista Roja de Especies Amenazadas de la IUCN 2019. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.20193.RLTS.T115689300A116354243.en>.

Trejo, L., Soriano-Fernandez, D., Romano-Grande, E., Sánchez-Carmona, B., y Dávila-Navarro, D. (2023). Diversity of reproductive characters, seed set, and viability of Agave seeds used for pulque production and their wild relatives in Tlaxcala, Mexico. Genetic Resources and Crop Evolution, (71), 2877–2903. doi:10.1007/s10722-023-01803-5

Vázquez-García, J. A. Cházaro B. M. D. J. y Hernández Vera, G. (2007a). Los Agaves del Occidente de México. Universidad de Guadalajara-CUCBA-Consejo Regulador del Tequila AC-CIATEJ AC-CONAFOR. 221 pp. <https://elibro.net/es/ereader/uaa/74312>

Vázquez-García, J.A., Cházaro-Basáñez, M.J., (2007b). Taxonomía del género Agave en el occidente de México: una panorámica preliminar. En: Vázquez-García, J.A., Cházaro-Basáñez, M., Hernández-Vera, G., Flores-Berrios, E. & Vargas-

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Rodríguez, Y.L. (Eds.). Los Agaves del Occidente de México. Universidad de Guadalajara-Consejo Regulador del Tequila AC-CIATEJ AC-CONAFOR. 41-45, 128-191 pp.

Vázquez-Martínez, O., Núñez-Palénus, H.G., Pérez-Molphe-Balch, E.M., Valencia-Posadas, M., Pérez-Moreno, L. et al. (2022). *In Vitro*-Propagation of *Agave tequilana* Weber cv. azul in a Temporary Immersion System. *Phyton-International Journal of Experimental Botany*, 91(1), 83-96.
doi.org/10.32604/phyton.2022.017281

