



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

TESIS

GENERACIÓN, CRECIMIENTO Y EVALUACIÓN DE LA
PRODUCCIÓN DE METABOLITOS EN TEJIDO CALLOSO DE
Agave potatorum Y *Agave guiengola* UTILIZANDO UN
BIORREACTOR DE INMERSIÓN TEMPORAL

PRESENTA

I.Q. Mariel Amacalli Alejandre Paniagua

PARA OBTENER EL GRADO DE MAestrÍA EN CIENCIAS: ÁREA DE
BIOTECNOLOGÍA VEGETAL O TOXICOLOGÍA

TUTORA

Dra. Lucía Isabel Chávez Ortiz

COMITÉ TUTORAL

Dra. Yenny Adriana Gómez Aguirre

Dr. Mario Rodríguez Monroy

Aguascalientes, Ags.

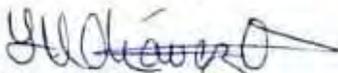
**M. EN C. JORGE MARTIN ALFEREZ CHAVEZ
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BASICAS
PRESENTE**

Por medio del presente como **Miembros del Comité Tutorial** designado de la estudiante **MARIEL AMACALLI ALEANDRE PANIAGUA** con ID 354258 quien realizó la tesis titulada: **GENERACIÓN, CRECIMIENTO Y EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE METABOLITOS EN TEJIDO CALOSO DE *Agave potatorum* Y *Agave guiengola* UTILIZANDO UN BIORREACTOR DE INMERSIÓN TEMPORAL**, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia damos nuestro consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que nos permitimos emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirlo así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

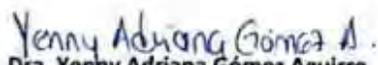
Ponemos lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, le enviamos un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 26 de mayo de 2025.



Dra. Lucía Isabel Chávez Ortiz
Tutora de tesis



Dra. Yenny Adriana Gómez Aguirre

Asesora de tesis



Dr. Mario Rodríguez Monroy
Asesor 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: DO-SEE-FD-16
Actualización: 00
Emisión: 17/05/19

**MARIEL AMACALLI ALEANDRE PANIAGUA
ESTUDIANTE DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS
ÁREA DE BIOTECNOLOGÍA VEGETAL
P R E S E N T E.**

Estimada Alumna:

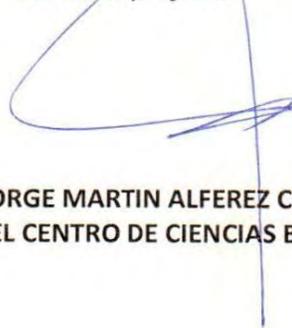
Por medio de la presente me permito comunicar a Usted que habiendo recibido los votos aprobatorios de los revisores de su trabajo de tesis y/o trabajo práctico titulado: **“GENERACIÓN, CRECIMIENTO Y EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE METABOLITOS EN TEJIDO CALOSO DE Agave potatorum Y Agave guiengola UTILIZANDO UN BIORREACTOR DE INMERSIÓN TEMPORAL”**, 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., 04 de junio 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: Mariel Amacalli Alejandre Paniagua ID 354258

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

TIPO DE TRABAJO: (X) Tesis () Trabajo práctico
TÍTULO: Generación, crecimiento y evaluación de la producción de metabolitos en tejido calloso de *Agave potatorum* y *Agave guineola* utilizando un biorreactor de inmersión temporal

IMPACTO SOCIAL (señalar el impacto logrado): Contribuye a la conservación de especies endémicas como *Agave potatorum* y *Agave guineola* mediante el desarrollo de biotecnología para la producción de metabolitos de interés sin recurrir a la extracción directa de plantas silvestres. La implementación de sistemas de cultivos in vitro en biorreactores de inmersión temporal promueve alternativas que favorecen el aprovechamiento racional.

INDICAR SI/NO SEGÚN CORRESPONDA:

Elementos para la revisión académica del trabajo de tesis o trabajo práctico:

- Sí El trabajo es congruente con las LGAC del programa de posgrado
- Sí La problemática fue abordada desde un enfoque multidisciplinario
- Sí Existe coherencia, continuidad y orden lógico del tema central con cada apartado
- Sí Los resultados del trabajo dan respuesta a las preguntas de investigación o a la problemática que aborda
- Sí Los resultados presentados en el trabajo son de gran relevancia científica, tecnológica o profesional según el área
- Sí El trabajo demuestra más de una aportación original al conocimiento de su área
- Sí 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
- Sí Cumple con los requisitos señalados en el plan de estudios (créditos curriculares, optativos, actividades complementarias, estancia, predoctoral, etc)
- NA Cuenta con los votos aprobatorios del comité tutorial, en caso de los posgrados profesionales si tiene solo tutor podrá liberar solo el tutor
- Sí Cuenta con la carta de satisfacción del Usuario
- Sí Coincide con el título y objetivo registrado
- Sí Tiene congruencia con cuerpos académicos
- Sí Tiene el CVU del SECHTI/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

Sí X

No

FIRMAS

Elaboró:

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

Yenny Adriana Gómez A.
Dra. en C. Yenny Adriana Gómez Aguirre

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO TÉCNICO:

Elsa Marcela Ramírez Lobez
Dra. en C. Elsa Marcela Ramírez Lobez

* 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:

A. Padilla
Dr. en C. Alejandro Padilla Díaz

Autorizó:

NOMBRE Y FIRMA DEL DECANO:

M. en C. Jorge Martín Alferez 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

A la Universidad Autónoma de Aguascalientes por permitirme llevar a cabo este proyecto y por el apoyo económico otorgado para la presentación del proyecto en modalidad cartel en el Congreso de la Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química (AMIDIQ).

A la Secretaría de Ciencias, Humanidades, Tecnología e Innovación (Secihti) por el apoyo económico otorgado durante la elaboración del proyecto mediante la beca 1202324.

A la Dra. Lucia Isabel Chávez Ortiz, por su infinita paciencia y apoyo durante la elaboración de este proyecto, así como por sus consejos tanto de vida como escolares. A la Dra. Yenny Adriana Gómez Aguirre por apoyarme durante todo este proyecto, así como ser una de las mejores profesoras que haya tenido. Al Dr. Mario Rodríguez Monroy por su apoyo y guía.

A la Unidad de Biotecnología Vegetal, por darme el espacio para la realización de esta tesis y el material vegetal que se utilizó durante el proceso. También agradezco profundamente a mis compañeros y a los técnicos de laboratorio, a Lupita Mata por su apoyo constante tanto emocional como en los consejos técnicos para poder sacar adelante este trabajo. A mis amigas Fanny, Kenya, Ale, Casandra y Martha por estar conmigo en las buenas y en las malas. A los Tijuanes de Tucana por escucharme y motivarme cada vez que hablaba de este trabajo y siempre tener la curiosidad por la ciencia.

A mis papás, por no dejarme caer y motivarme a seguir. A Luis, por ser mi compañero de vida y por creer en mí aun cuando yo no creo en mí misma. A mis hermanos por estar acompañándome en esta etapa de mi vida.

DEDICATORIA

A la Mariel del pasado, por todas las lágrimas, estrés y noches de desvelo que contribuyeron a terminar este proyecto.

A la Mariel del futuro, para que recuerde que es capaz de muchas cosas.



INDICE GENERAL

RESUMEN 7

ABSTRACT 9

INTRODUCCIÓN 11

1. MARCO TEORICO..... 13

1.1. GENERALIDADES Y CARACTERISTICAS DE LOS AGAVES 13

 1.1.1. Agave guiengola Gentry 18

 1.1.2. Agave potatorum Zucc..... 20

1.2. METABOLISMO CAM 21

 1.2.1. SAPONINAS..... 23

 1.2.2. FRUCTANOS 26

1.3. CULTIVO DE TEJIDO CALLOSO IN VITRO 29

1.4. BIORREACTORES 30

2. JUSTIFICACIÓN 33

3. HIPÓTESIS 33

4. OBJETIVOS 34

4.1. OBJETIVO GENERAL..... 34

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 34

5. INCIDENCIA, IMPACTO SOCIAL O AMBIENTAL ESPERADO 35

6. METODOLOGÍA..... 36

6.1. PROPAGACIÓN DE MATERIAL VEGETAL 36

 6.1.1. DESINFECCIÓN DE EXPLANTES..... 36

6.2. EVALUACION DE DIFERENTES COMBINACIONES DE AUXINAS/CITOCININAS EN LA INDUCCIÓN DE TEJIDO CALLOSO EN MEDIO SEMISÓLIDO.....	37
6.3. EVALUACIÓN DE CRECIMIENTO DEL TEJIDO CALLOSO UTILIZANDO DIFERENTES SISTEMAS DE CULTIVO.....	38
6.4. EVALUACIÓN DE INDUCCION DEL TEJIDO CALLOSO UTILIZANDO DIFERENTES SISTEMAS DE CRECIMIENTO	39
6.5. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE SAPONINAS	39
6.5.1. PREPARACIÓN DE MATERIAL VEGETAL	39
6.5.2. EXTRACCIÓN DE SAPONINAS	41
6.5.3. DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE SAPONINAS POR CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA	41
6.5.4. CUANTIFICACION DE SAPONINAS POR ESPECTROFOTOMETRÍA	42
6.6. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE FRUCTANOS POR KIT MEGAZYME.....	42
7. RESULTADOS	44
7.1. EVALUACION DE DIFERENTES COMBINACIONES DE AUXINAS/CITOCININAS EN LA INDUCCIÓN DE TEJIDO CALLOSO EN MEDIO SEMISÓLIDO.....	44
7.2. EVALUACIÓN DE CRECIMIENTO DEL TEJIDO CALLOSO UTILIZANDO DIFERENTES SISTEMAS DE CULTIVO.....	50
7.3. EVALUACIÓN DE INDUCCION DEL TEJIDO CALLOSO UTILIZANDO DIFERENTES SISTEMAS DE CULTIVO	53
7.4. DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE SAPONINAS POR CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA.....	54
7.5. CUANTIFICACION DE SAPONINAS POR ESPECTROFOTOMETRÍA	56

7.6. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE FRUCTANOS POR KIT
MEGAZYME..... 59

8. DISCUSIÓN 60

9. CONCLUSIONES..... 69

10. BIBLIOGRAFÍA 70



INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Estudios en agaves utilizando biorreactores de inmersión temporal..... 31

Tabla 2. Tratamientos para inducción de tejido calloso. 37

Tabla 3. Peso fresco y seco de las hojas de *A. potatorum* y *A. guiengola*..... 40

Tabla 4. Peso fresco y seco de tejido calloso obtenido en los diferentes sistemas de cultivo..... 40

Tabla 5. Peso de tejido calloso de *A. potatorum* a los 60 días de cultivo..... 50

Tabla 6. Porcentaje de tejido calloso necrosado en los diferentes sistemas de cultivo en *A. potatorum*..... 51

Tabla 7. Porcentaje de inducción de tejido calloso en los diferentes sistemas de cultivo en *A. guiengola* junto con el peso promedio. 54

Tabla 8. Factor de retención de las bandas en la cromatografía de capa fina. 55

Tabla 9. Contenido de saponinas en tejido calloso de *A. potatorum* y *A. guiengola* en diferentes sistemas de cultivo. 57

Tabla 10. Contenido de frúctanos en hojas y tejido calloso de *A. potatorum* y *A. guiengola* en diferentes sistemas de cultivo..... 59

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Usos del agave 14

Figura 2. Ilustraciones de las diferencia físicas entre las distintas especies de agaves 15

Figura 3. Esquema de la morfología general de los agaves 17

Figura 4. Distribución geográfica de *Agave guiengola* 19

Figura 5. *Agave guiengola* en su hábitat natural 20

Figura 6. Características de *Agave potatorum* 21

Figura 7. Diagrama del mecanismo fotosintético CAM comparado con C3 y C4. . 22

Figura 8. Origen y síntesis de saponinas esteroideas 24

Figura 9. Estructura de las saponinas 25

Figura 10. Síntesis de fructanos 27

Figura 11. Respuestas morfogénicas de los explantes de *A. potatorum* a diferentes combinaciones y concentraciones de auxinas/citocininas 44

Figura 12. Respuestas morfogénicas de los explantes de *A. potatorum* 45

Figura 13. Peso promedio del tejido calloso de *A. potatorum* después de 60 días. 46

Figura 14. Respuestas morfogénicas de los explantes de *A. guiengola* a diferentes combinaciones y concentraciones de auxinas/citocininas. 47

Figura 15. Diferentes respuestas morfogénicas de *A. guiengola* 48

Figura 16. Peso promedio del tejido calloso de *A. guiengola* después de 60 días de siembra 49

Figura 17. Cinética de crecimiento de tejido calloso de *A. potatorum* en diferentes sistemas de cultivo 51

Figura 18. Cinética de crecimiento de tejido calloso de *A. guiengola* en diferentes sistemas de cultivo 52

Figura 19. Callo de *A. guiengola* en medio líquido con agitación y en biorreactor. 53

Figura 20. Cromatografía en capa fina en fase normal con una fase móvil. 55

Figura 21. Curva de calibración de saponina *Quillaja* sp. para cálculos de concentración de saponinas en las muestras a evaluar 57

ABREVIACIONES

ADN: Ácido desoxirribonucleico

CAM: Metabolismo Ácido de las Crasuláceas

EHF: Exohidrolasas fructosílicas

MS: Murashige y Skoog

PEPC: Fosfoenolpiruvato carboxilasa

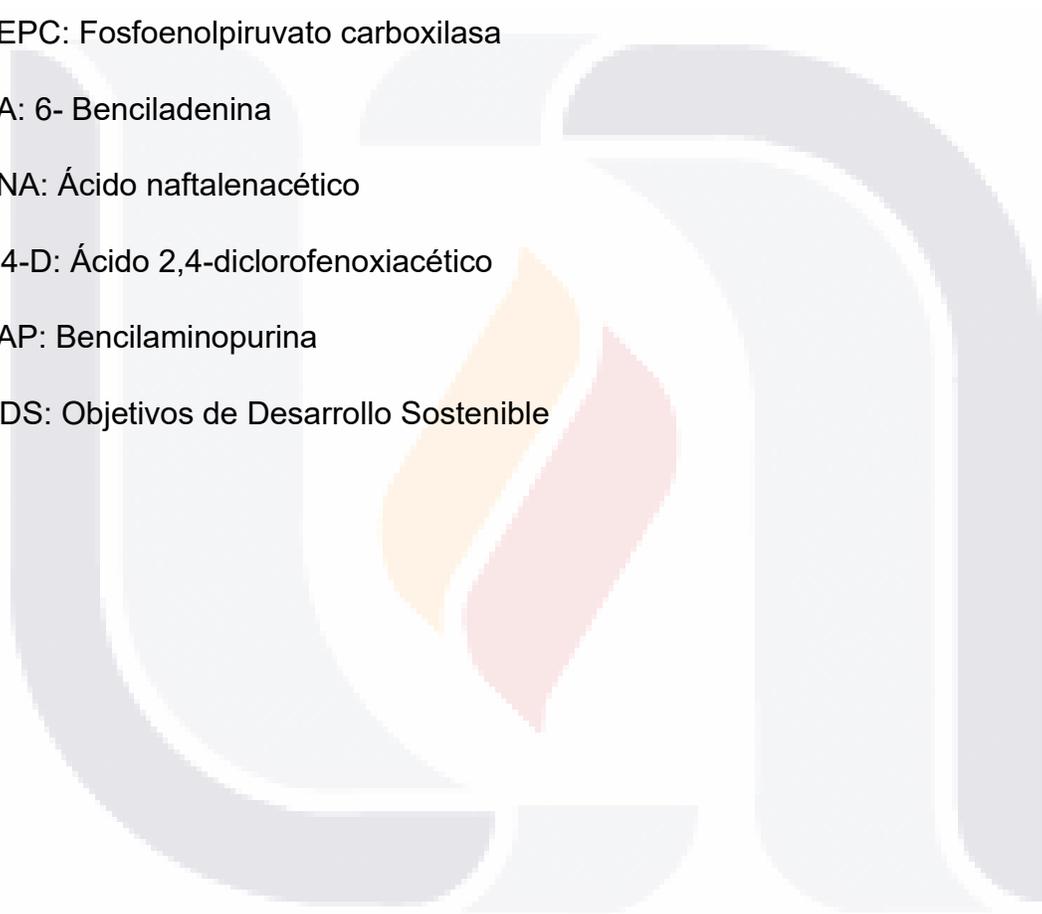
BA: 6- Benciladenina

ANA: Ácido naftalenacético

2,4-D: Ácido 2,4-diclorofenoxiacético

BAP: Bencilaminopurina

ODS: Objetivos de Desarrollo Sostenible



RESUMEN

En este trabajo se evaluó la efectividad de diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento vegetal para la inducción y crecimiento de tejido calloso en *Agave potatorum* y *Agave guiengola* para después evaluar la inducción y el crecimiento de estas en tres diferentes sistemas de crecimiento vegetal (semisólido, medio líquido con agitación y biorreactor de inmersión temporal tipo tanques gemelos). Posteriormente se realizó un análisis cuantitativo para la determinación de saponinas y fructanos en el tejido calloso obtenido.

El mejor tratamiento para la inducción de tejido calloso para *A. potatorum* fue la combinación de 3 mg/L BA y 2 mg/L de 2,4-D, ya que el 75% de los explantes generaron callo, solo el 8 % de los explantes generaron brotes, y solo el 17 % de los explantes necrosaron. En *A. guiengola* dos tratamientos indujeron formación de tejido calloso en más del 80% de los explantes, fueron en las combinaciones de 1 mg/L 2,4-D con 3 mg/L BA, y 3 mg/L ANA con 7 mg/L BA. Considerando que ambos tratamientos obtuvieron resultados similares, se seleccionó el tratamiento con las concentraciones de 1 mg/L 2,4-D con 3 mg/L BA.

Posteriormente, con esas concentraciones se evaluó la inducción de callo en tres sistemas de cultivo de tejidos vegetales: medio semisólido, en medio líquido en agitación y biorreactores de inmersión temporal tipo tanques gemelos. En *A. potatorum* tanto los explantes cultivados en biorreactor como en medio líquido en agitación se hiperhidrataron; mientras que en *A. guiengola*, se logró inducir callo en medio líquido en agitación.

En cuanto a crecimiento de tejido calloso, en *A. potatorum* comparando los tres sistemas de cultivo empleando renovación periódica del medio de cultivo, tanto en medio líquido como semisólido hubo un mayor crecimiento de tejido calloso, que empleando biorreactores, mientras que sin renovación del medio se obtuvo la menor acumulación de biomasa. En *A. guiengola*, tanto con renovación como sin renovación de medio de cultivo, el sistema con el que se obtuvo mayor cantidad de biomasa y mejor respuesta fue en medio líquido con agitación.

Se encontró que el tejido calloso tanto de *A. potatozum* como *A. guineensis* logra sintetizar saponinas y fructanos, aunque en menor cantidad que una planta *ex vitro*. El contenido más alto de saponinas en *A. potatozum* en tejido calloso fue de 2.57 ± 0.29 mg/g de extracto y de *A. guineensis* fue de 2.69 ± 0.31 mg/g de extracto. En *A. potatozum* el contenido de fructanos más alto fue de 1.81 ± 0.06 % de peso de fructanos/peso de tejido y para *A. guineensis* de 4.45 ± 2.70 % de peso de fructanos/peso de tejido.



ABSTRACT

The effectiveness of different combinations of plant growth regulators for the induction and growth of callus tissue in *Agave potatorum* and *Agave guiengola* was evaluated. The induction and growth of callus tissue was then assessed in three different plant growth systems (semi-solid, stirred liquid medium, and twin-tank immersion bioreactor). A quantitative analysis was subsequently performed to determine the presence and amount of saponins and fructans in the obtained callus tissue.

The best treatment for callus induction in *A. potatorum* was the combination of 3 mg/L BA and 2 mg/L 2,4-D, since 75% of the explants generated callus, only 8% of the explants generated shoots, and it had a 17 % of necrotic explants. In *A. guiengola*, two treatments induced callus formation in more than 80% of the explants: the combinations of 1 mg/L 2,4-D with 3 mg/L BA, and 3 mg/L ANA with 7 mg/L BA. Considering that both treatments gave similar results the treatment with concentrations of 1 mg/L 2,4-D with 3 mg/L BA was chosen.

Subsequently, callus induction was evaluated using these concentrations in three plant tissue culture systems: semisolid medium, stirred liquid medium, and twin-tank immersion bioreactor. In *A. potatorum*, explants grown in bioreactor and in stirred liquid medium were hyperhydrated; while in *A. guiengola*, callus induction was achieved in stirred liquid medium.

Regarding callus growth, in *A. potatorum*, comparing the three culture systems using periodic renewal of the culture medium, both in liquid and semi-solid media, there was greater callus growth than in bioreactors, while without renewal of the medium, lower weight was obtained. In *A. guiengola*, both with and without renewal of the culture medium, the system that obtained the greatest amount of biomass and the best response in terms of necrosis was the agitated liquid medium.

It was found that the callus tissue of both *A. potatorum* and *A. guiengola* can synthesize saponins and fructans, although in lower quantities than in *ex vitro* plants. The highest saponin content in *A. potatorum* in callus tissue was 2.57 ± 0.29 mg/g

of extract, and in *A. guiengola* it was 2.69 ± 0.31 mg/g of extract. Regarding fructans, the highest content in *A. potatorum* was 1.81 ± 0.06 % fructans/tissue weight, and 4.45 ± 2.70 % fructans/tissue weight obtained with *A. guiengola*.



INTRODUCCIÓN

En los últimos años el interés por la conservación de los agaves ha incrementado debido a su importancia tanto social, como cultural y económica. Con el uso de herramientas biotecnológicas se puede fomentar el uso regulado y la conservación de las distintas especies de agaves, todas ellas con igual importancia biológica. Una de estas herramientas es el cultivo *in vitro*, que consiste en el cultivo de plantas, órganos o tejidos vegetales bajo condiciones controladas (como lo es la temperatura, humedad, fotoperiodo, componentes nutritivos del medio y luz) simulando un ambiente artificial (Abdalla et al., 2022). Requiere de condiciones asépticas que permitan mantener la planta libre de patógenos, así como una exhaustiva selección del explante, tejido vegetal aislado de una planta madre, que cumpla con las características que se buscan (Abdalla et al., 2022; Hasnain et al., 2022).

Debido al control que provee el cultivo *in vitro*, se ha utilizado esta técnica para reproducción de plantas libres de patógenos, crecimiento rápido de plantas difíciles de propagar y la conservación y reproducción de especies amenazadas (Abdalla et al., 2022). Powers & Backhaus (1989) utilizaron esta técnica para la conservación del *Agave arizonica* Gentry y Weber usando medio MS con 2,4-D, el cual se consideraba una planta amenazada en el estado de Arizona. En México, se han hecho estudios para conservación de diferentes especies de agaves mediante las técnicas de cultivo *in vitro* que han permitido la obtención de brotes y desarrollo de plantas hasta llevar a invernadero (Martinez-Rodriguez et al., 2022; Téllez Torres et al., 2023), para posteriormente llevarlas a campo.

El cultivo *in vitro* de plantas ha demostrado ser eficiente para la obtención de cultivos de órganos, como raíces transformadas y embriones; de igual manera se pueden obtener células en suspensión, protoplastos y tejido calloso (Hasnain et al., 2022; Jin et al., 2020; Steinmacher et al., 2007).

Las investigaciones para la producción de metabolitos de alta importancia para la industria a partir de tejido calloso se han vuelto un elemento importante en la

biotecnología ya que, otorgan la ventaja de que su crecimiento es más rápido y controlado (Dabuwar et al., 2019; Espinosa-Leal et al., 2018; Jin et al., 2020).

En Agaves se han realizado investigaciones para la extracción de metabolitos de interés como lo son compuestos fenólicos, flavonoides, saponinas, fructanos, alcaloides, triterpenos, entre otros (Camacho et al., 2020; Delgado-Alvarado et al., 2021; Durán et al., 2021; López-Romero et al., 2023; Montañez-Soto et al., 2011; Soto-Rodríguez, 2020). Dichos compuestos de interés suelen almacenarse en las hojas y raíces de la planta dependiendo de su edad y factores ambientales (Camacho et al., 2020)

En los agaves estos metabolitos se suelen extraer principalmente de las hojas y raíces, por lo que se requieren de cultivos adultos o en cierta etapa de madurez para poder realizar la extracción (Camacho et al., 2020; Omodamiro et al., 2024). Sin embargo, con las nuevas tecnologías se espera que sea posible realizar esa extracción directo de las plantas o callos crecidos en laboratorio, cultivados *in vitro* (Dabuwar et al., 2019).

El tejido calloso se puede cultivar *in vitro* en biorreactores o en medio semisólido, permitiendo la producción de los metabolitos a gran escala (Sánchez-Calvo & Alvarenga-Venutolo, 2015), al manipular las condiciones para que haya un crecimiento anormal de las células desdiferenciadas y obtener el metabolito o producto deseado.

Este trabajo se enfocó en comprobar si se mantiene la producción de saponinas y fructanos en el tejido calloso del agave, así como en la cuantificación de estos en caso de observar su presencia. Las saponinas son producidas en la pulpa de las hojas, y tienen diversas propiedades farmacológicas (Hernández et al., 2005), como efecto expectorante, diurético, antiinflamatorio, anti estresante y como estimulante (López-Luengo, 2001); por su parte, los fructanos; son glucósidos complejos compuestos de cadenas de fructosa que se encuentran mayormente como inulinas en los agaves (Alvarado-Loza et al., 2017).

1. MARCO TEORICO

1.1. GENERALIDADES Y CARACTERISTICAS DE LOS AGAVES

Los agaves, también conocidos como magueyes, son plantas monocotiledóneas, generalmente suculentas. Estas son parte de la cultura mesoamericana desde hace 10,000 años (Mora-López et al., 2011) siendo utilizados principalmente como vestimenta y alimento, ya que las fibras de los agaves se utilizaban para creación de textiles y accesorios, las flores y parte de la penca eran consumidos como alimento, mientras que el tallo, mejor conocido como piña, se utilizó para elaborar bebidas alcohólicas (Alducin-Martínez et al., 2022; Figueredo et al., 2015; Kancab-Uc, 2016).

Actualmente los agaves son aprovechados con diferentes propósitos: para elaboración de alimentos y textiles; como forraje y material de construcción; uso medicinal; elaboración de productos de limpieza (fig. 1). Para la industria farmacéutica y alimenticia es relevante la obtención de fructooligosacáridos, derivados de la síntesis de los fructanos del agave, los cuales son utilizados como prebióticos y fibras dietéticas, mejorando las funciones intestinales, el proceso de digestión y la estimulación del sistema inmune (Ávila-Fernández et al., 2011; López et al., 2003).

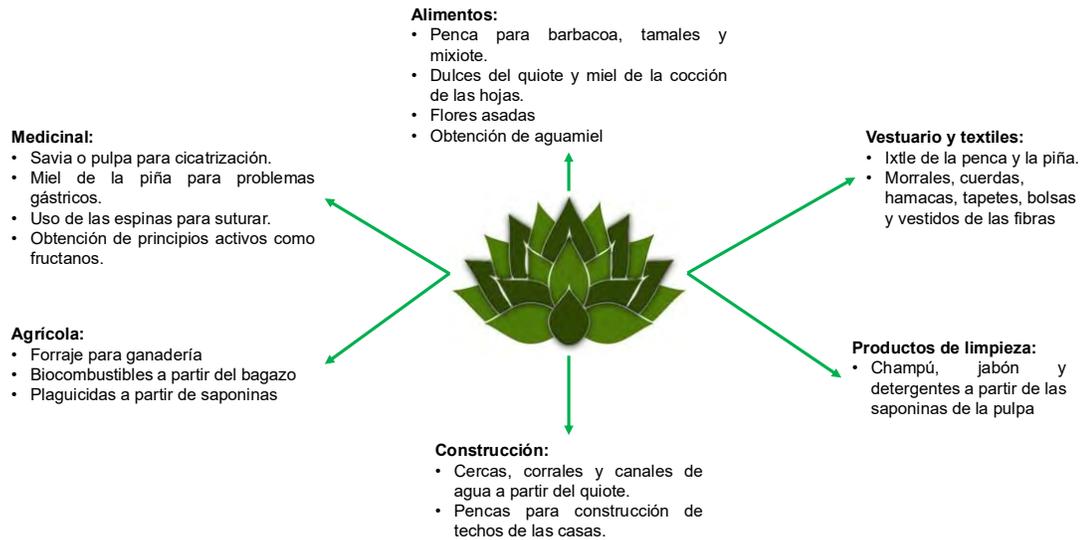


Figura 1. Usos del agave (Espinoza-Barrera, 2015; Nava-Cruz et al., 2015)

Además, en las últimas décadas se ha impulsado el estudio del uso de algunas especies de agaves como materia prima para la elaboración de biocombustibles, particularmente sus residuos agrícolas, como el bagazo obtenido después de haber sido procesado o las vinazas de la industria de destilados (García-Depraect et al., 2020; Osuna-Laveaga et al., 2020).

El género *Agave* pertenece al orden *Asparagales* y tiene más de 200 especies (Eguiarte et al., 2021; García-Mendoza, 2002), y 47 categorías (taxas) intraespecíficas (García-Mendoza, 2002). México alberga aproximadamente el 75% de las especies de este género (García-Mendoza, 2002).

Los agaves se encuentran desde la parte sur de Estados Unidos hasta Sudamérica incluyendo una parte de Colombia y Venezuela (García-Mendoza, 2002), y se distribuyen mayoritariamente en las zonas templadas y áridas, siendo México el centro de origen y diversificación de este grupo de plantas.

La amplitud de la zona de distribución se debe a que estas plantas se adaptan mejor a temperaturas de los 10 °C a 25 °C, con una altitud que va de los 1500 a 2000 m

sobre el nivel del mar. Se adaptan mejor a suelos francos y arcillosos ricos en hierro y pH de 6.0 a 8.0 (Álvarez- Sánchez et al., 2010) . Los agaves son plantas xerófitas, es decir, plantas que desarrollaron ciertas adaptaciones para poder sobrevivir en climas muy cálidos y con poca precipitación, por lo que son capaces de habitar en un ambiente con escasez de agua, cambios abruptos de temperatura y sequías extremas (Giraldo-Cañas, 2020).

Poseen hojas arregladas en rosetas en el ápice de un tallo, lo que les permite que cuando llueva o se forme rocío, las hojas puedan capturar y dirigir el agua hacia las raíces (Espinoza-Barrera, 2015). El tamaño, forma y espesor de las hojas (fig. 2) varía dependiendo de la especie; pueden tener desde los 50 cm hasta los 2 m de longitud (CONABIO, 2021). Tienen fibras en abundancia que las protegen y les otorgan rigidez, debido a una alta concentración de lignina (Sánchez-Galindo, 2010). Las hojas y el tallo presentan succulencia, la cual es una característica que les permite almacenar grandes cantidades de agua (García-Mendoza, 2007).

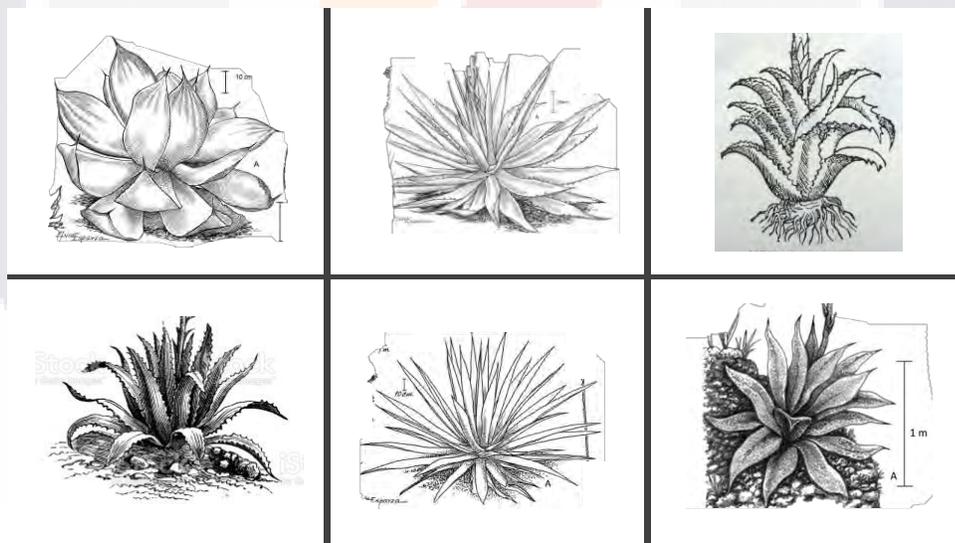


Figura 2. Ilustraciones de las diferencia físicas entre las distintas especies de agaves. (García-Mendoza, 2007, 2010; García-Mendoza & Sandoval-Gutiérrez, 2019; Jiménez-Pérez et al., 2021; Romero-Galvan, 2018)

Las hojas presentan una capa de cera epicuticular que disminuye la evapotranspiración y las protege contra insectos y ciertos patógenos (Guerra de León et al., 2007; Ortigón-Campos, 2005; Pérez-España et al., 2022). Dicha capa está constituida principalmente por grupos de ácidos grasos, hidrocarburos y algunos ésteres (Guerra de León et al., 2007). Otra adaptación para evitar la pérdida excesiva de agua se presenta en los estomas, los cuales se abren solo en la noche, momento en el que hacen el intercambio gaseoso (Pérez España et al., 2022).

Los agaves viven entre 8 y 20 años, y son conocidos por su lento crecimiento. La mayoría de las especies son perennes monocárpicas, lo que significa que florecen una sola vez, marcando así el fin de su ciclo vital, siendo la floración su última etapa (Nava-Cruz et al., 2015).

Su reproducción puede ocurrir tanto de forma sexual como asexual. En cuanto a su reproducción sexual, el tallo floral, conocido vulgarmente como quiote, nace directamente del centro de la roseta y llega a medir hasta 10 m; el quiote esta desprovisto de hojas, pero presenta varias ramificaciones de las cuales salen los racimos de flores (De la Torre et al., 2018) (fig. 3).

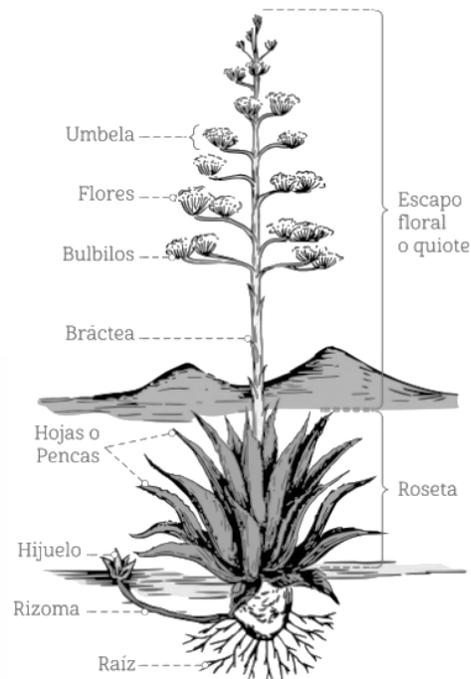


Figura 3. Esquema de la morfología general de los agaves (Gallardo-Valdez, 2017).

Los agaves con inflorescencias paniculadas son polinizados por murciélagos mientras que los que tienen inflorescencias espigadas son polinizados principalmente por insectos. También pueden ser polinizados por aves, como los colibríes. Esta variación en los agentes polinizadores permite una polinización tanto nocturna como diurna (García-Mendoza, 2007).

La floración además da pauta a la despolimerización de los fructanos en las hojas, de esa manera la planta obtendrá la energía extra requerida para la floración sacrificando los nutrientes almacenados en la hoja (Godínez-Hernández et al., 2015; Márquez-López et al., 2022).

La reproducción asexual consiste en la clonación de la planta madre mediante hijuelos que crecen directamente en la raíz principal, o bulbillos que se forman en la inflorescencia (García-Mendoza, 2007). Esta capacidad de generar hijuelos y bulbillos confiere al agave una ventaja significativa al posibilitar su reproducción

mediante un método alternativo, asegurando así la continuidad de generaciones de plantas. Sin embargo, no todas las especies de agaves pueden generar hijuelos y su tiempo de madurez sexual es muy lento (de 5 hasta 15 años dependiendo de la especie).

1.1.1. *Agave guiengola* Gentry

A. guiengola es una especie endémica de Oaxaca, usada para ornato; crece solo en el Cerro Guiengola, en una superficie de aproximadamente 10 000 km², lo que la convierte en una especie micro endémica (García-Mendoza & Galván-V., 1995) (fig. 4).

Se encuentra al pie y en las paredes de la montaña y es muy susceptible a la erosión del suelo. Se ha reportado que en la parte baja de la montaña se lleva a cabo la extracción de mármol (García-Mendoza, 2002), lo que a mediano o largo plazo podría destruir el hábitat, por ello, esta categorizada como una especie amenazada (Alducin-Martínez et al., 2022; García-Mendoza & Sandoval-Gutiérrez, 2019)

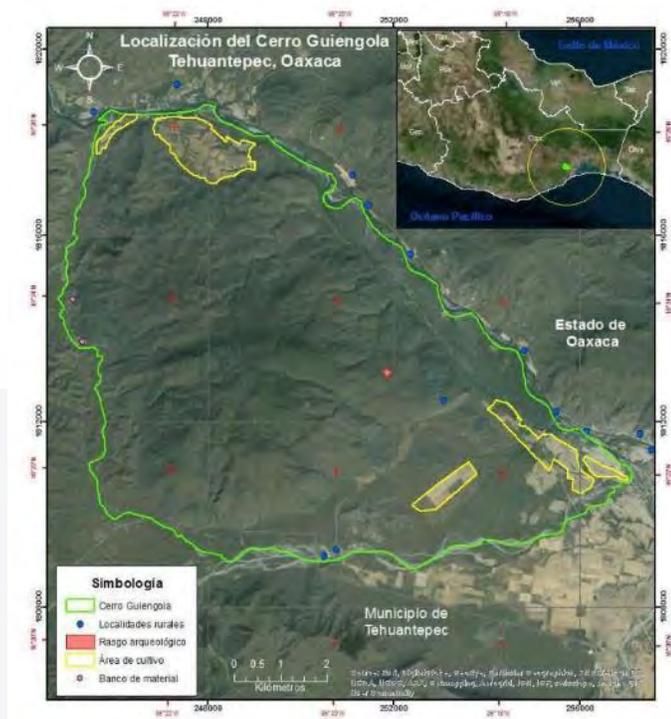


Figura 4. Distribución geográfica de *Agave guiengola* (Vargas-Valencia, 2017)

A. guiengola tiene de 25-30 hojas por roseta, con una longitud de 45 a 76 cm (fig. 5); son ovaladas a ovado-lanceolada. Poseen un color verdeazulado y presentan en los márgenes pequeñas espinas dentadas de color rojo oscuro (Starr, 2022; García-Mendoza & Franco-Martínez, 2018).



Figura 5. *Agave guiengola* en su hábitat natural (Starr, 2022)

La etapa de florescencia ocurre durante los meses de febrero y marzo, y el quiote llega a medir de 1.6 a 2 m de altura. Esta especie también genera hijuelos, pero solo algunos individuos tienen esa capacidad (Gentry, 1982; Starr, 2022).

1.1.2. *Agave potatorum* Zucc.

Agave potatorum crece en las zonas desérticas desde Puebla hasta el sur de Oaxaca. Este agave tiene un alto interés comercial dado que de él se obtienen los azúcares para el destilado de mezcal tóbala, para lo que se utilizan principalmente individuos silvestres, lo que lo ha convertido en una especie amenazada (García-Mendoza, 2010).

Las rosetas de este agave tienen de 30-60 cm de alto; puede tener hasta 60 hojas por planta, de un color plateado con la pulpa de color liliáceo y presentan en la punta una espina color rojiza de 4 cm (fig. 6). Esta especie florece de fines de agosto a noviembre, siendo la época fructífera de noviembre a marzo; esporádicamente llegan a producir de 1 a 3 hijuelos (García-Mendoza, 2010).

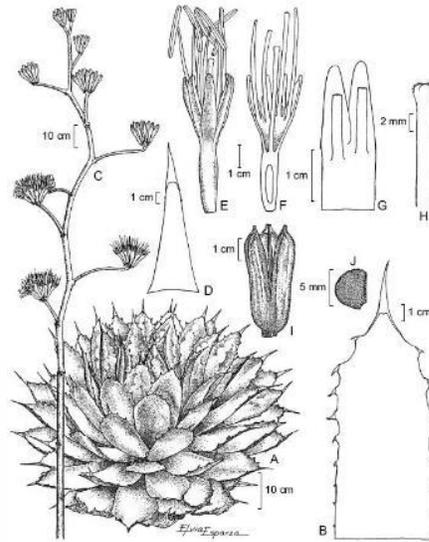


Figura 6. Características de *Agave potatorum*: A. roseta; B. hoja; C. inflorescencia; D. bráctea del pedúnculo; E. flor; F. flor disecada; G. detalle de la inserción del filamento; H. estilo y estigma; I. cápsula; J. semilla (García-Mendoza, 2010).

1.2. METABOLISMO CAM

Los agaves presentan una notable ventaja adaptativa al emplear el metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM, por sus siglas en inglés), una ruta metabólica especializada que les permite fijar dióxido de carbono (CO_2) atmosférico durante la noche mediante la acción de la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC). Este mecanismo les permite mantener los estomas cerrados durante el día, lo que reduce significativamente la pérdida de agua por transpiración en ambientes áridos y semiáridos (fig. 7) (Gil-Marín et al., 2006).

La PEPC fija el CO_2 nocturno uniéndolo al fosfoenolpiruvato (PEP), una molécula de tres carbonos, para formar ácido málico, un compuesto de cuatro carbonos que se almacena en las vacuolas, provocando su acidificación al acumularse (Forseth, 2010). Durante el día, cuando los estomas permanecen cerrados, el ácido málico es descarboxilado, liberando CO_2 que es redirigido al ciclo de Calvin para la síntesis de carbohidratos (Andrade et al., 2007; A. J. García-Mendoza, 2007).

Además de que esta estrategia resulta en un uso más eficiente del agua, el metabolismo CAM influye directamente en la producción y acumulación de metabolitos secundarios en los agaves, como saponinas, flavonoides y compuestos fenólicos. Estos metabolitos no solo cumplen funciones ecológicas, como la defensa frente a herbívoros y estrés abiótico, sino que también tienen un alto valor en las industrias farmacéutica, alimentaria y cosmética CITA.

Cabe señalar que la producción de metabolitos secundarios no es exclusiva de las plantas con metabolismo CAM, ya que también ocurre en especies con otros tipos de fotosíntesis (C_3 y C_4); sin embargo, en el caso de los agaves, el CAM proporciona un contexto fisiológico particular que favorece la regulación diferencial de estas rutas biosintéticas bajo condiciones de estrés hídrico y alta radiación, ya que diversos estudios sugieren que la actividad fotosintética CAM puede modular rutas biosintéticas clave mediante señales metabólicas y hormonales, lo cual refleja una estrecha conexión entre el metabolismo primario y la biosíntesis de compuestos especializados en estas plantas (Abraham et al., 2016).

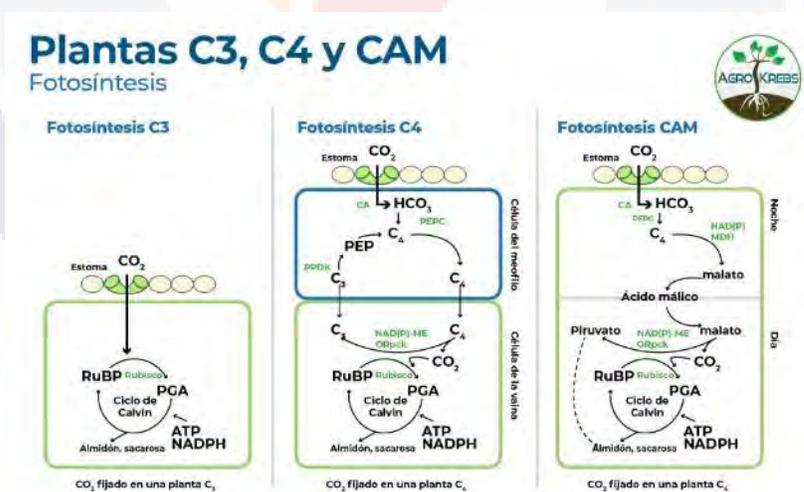
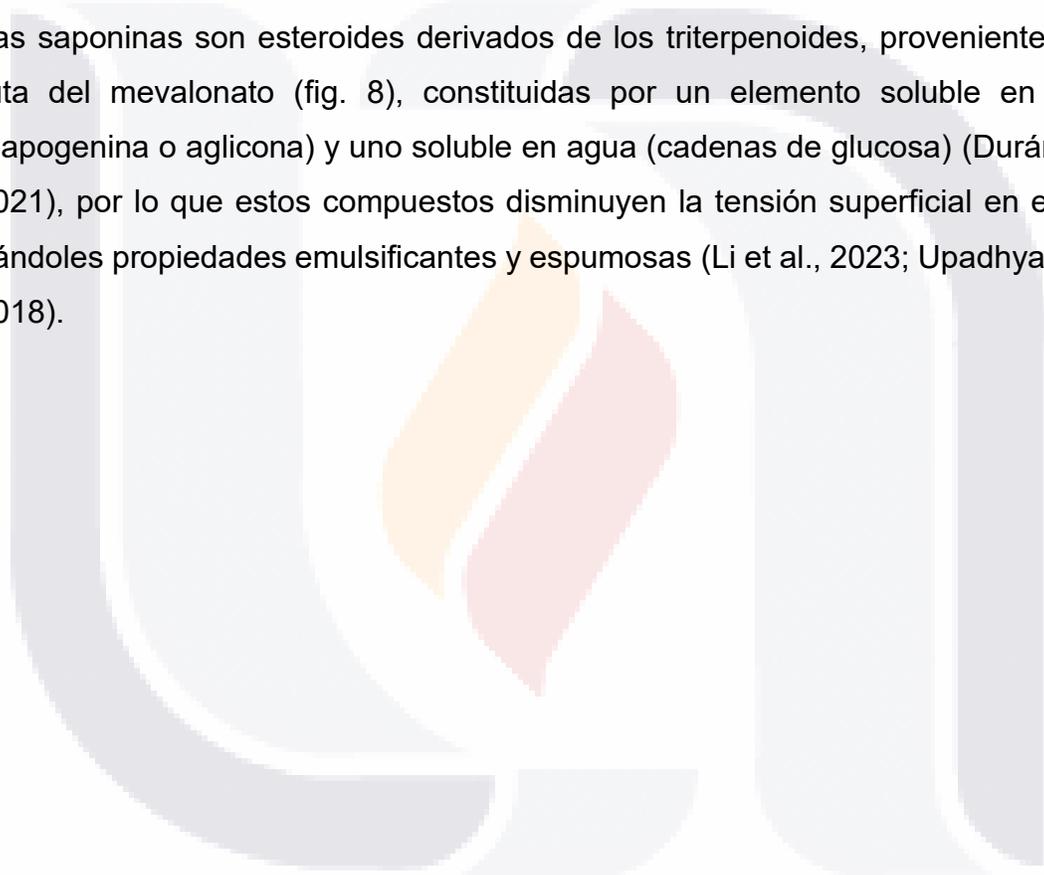


Figura 7. Diagrama del mecanismo fotosintético CAM comparado con C3 y C4. (Agrokrebs, s.f).

1.2.1. SAPONINAS

Las saponinas esteroidales se producen por lo general en plantas de las familias de la clase Monocotiledónea, como son Liliaceae, Agavaceae, Dioscoreaceae y Amaryllidaceae (Hernández et al., 2005). Las saponinas son una familia diversa de glucósidos triterpénicos o esteroidales, y su perfil cromatográfico puede variar ampliamente debido a las múltiples posibilidades de sustitución en sus agliconas y cadenas de azúcares (Góngora Chi et al., 2022).

Las saponinas son esteroides derivados de los triterpenoides, provenientes de la ruta del mevalonato (fig. 8), constituidas por un elemento soluble en lípidos (sapogenina o aglicona) y uno soluble en agua (cadenas de glucosa) (Durán et al., 2021), por lo que estos compuestos disminuyen la tensión superficial en el agua, dándoles propiedades emulsificantes y espumosas (Li et al., 2023; Upadhyay et al., 2018).



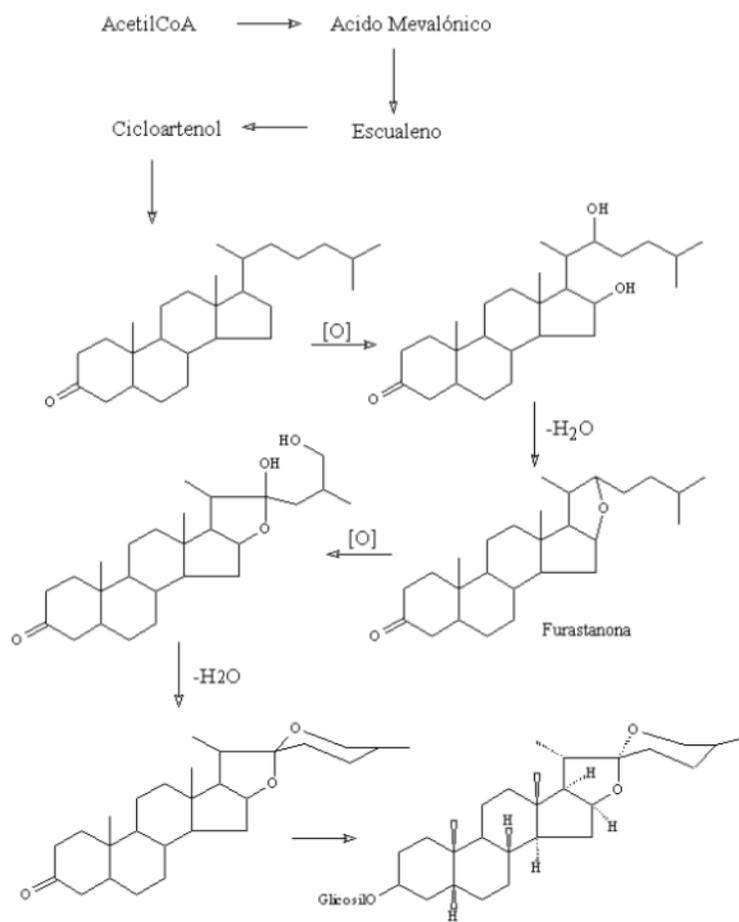


Figura 8. Origen y síntesis de saponinas esteroidales (Alcázar-Valle, 2016).

Dependiendo a su estructura, estas se pueden dividir en tipo espirostano y en furostano, las primeras constan de 27 carbonos mientras que las furostano constan de 26 carbonos con un enlace glicosilado en el C26 (fig. 9) (Alcázar-Valle, 2016; López-Luengo, 2001; Sidana et al., 2016)

La aglicona determina la clasificación de las saponinas, estas pueden ser esteroidales (C27) o triterpénicas (C30) siendo las esteroidales las que se encuentran en plantas monocotiledóneas como los agaves (Alcázar-Valle, 2016; Durán et al., 2021; Sparg et al., 2004).

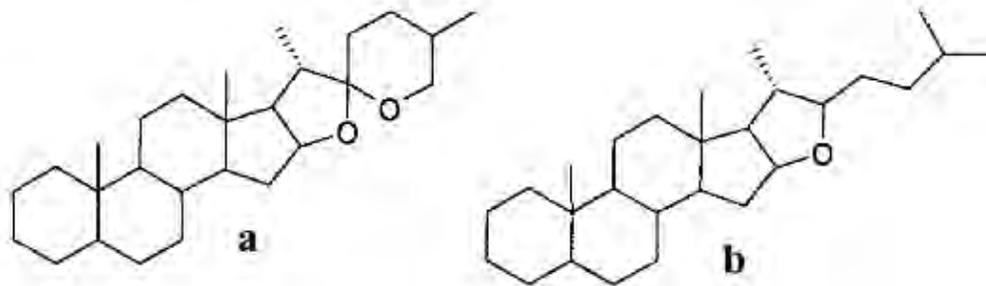


Figura 9. Estructura de las saponinas: a) espirostanos; b) furostanos.

(Alcázar-Valle, 2016)

Las saponinas actúan como moléculas de defensa de los agaves contra el crecimiento de hongos, levaduras y bacterias debido a su capacidad detergente (Alcázar-Valle, 2016) así como por su capacidad de incrementar la permeabilidad de las paredes celulares (Hernández et al., 2005).

La síntesis de las saponinas en el agave se realiza mayoritariamente en las hojas, que es en donde se ha reportado una mayor concentración de estas (Alcázar-Valle, 2016; Hernández et al., 2005; Pérez et al., 2013), derivado de una respuesta al estrés (Góngora-Chi et al., 2022); aunque también se ha reportado en menor proporción en las raíces y en las flores (Sidana et al., 2016).

En varias especies de agaves como *A. sisilana*, *A. tequilana*, *A. salmiana*, *A. durangensis* y algunas otras, se han reportado diferentes estructuras de saponinas que llegan a sintetizar en las hojas, la floración y las raíces (Alcázar-Valle, 2016; Almazán-Morales et al., 2022; Delgado-Alvarado et al., 2021; Durán et al., 2021; Hernández et al., 2005; Pérez et al., 2013; Sidana et al., 2016). Sin embargo, no se han reportado trabajos en donde se caractericen y cuantifiquen en los agaves de este estudio.

1.2.2. FRUCTANOS

Los fructanos son polímeros de fructosa que se forman a partir de una molécula inicial de sacarosa, y poseen un residuo de glucosa como grupo terminal. Se clasifican de acuerdo con el enlace entre los residuos de fructosilo (fructooligosacaridos) y a la glucosa en el grupo seis (Cruz-Cárdenas, 2015; González-Díaz et al., 2020). La diferencia estructural de los enlaces determina la eficiencia metabólica de la planta y su capacidad de ramificación y elongación al añadir residuos de fructooligosacáridos (García-Villalba et al., 2023; Regalado Rentería et al., 2021).

La 1-kestosa es el fructano tipo inulina más simple; se forma cuando una molécula de sacarosa transfiere su residuo de fructosa al residuo de fructosa de otra sacarosa mediante la enzima sacarosa:sacarosa 1-fructosiltransferasa (1-SST). Luego, a partir de la 1-kestosa se pueden formar fructanos como inulina con mayor grado de polimerización gracias a la acción de la enzima 1-FFT; o neoserias de inulina, levanos, neoserias de levanos, graminanos y agavinas (fig. 10). Una vez sintetizados, los fructanos se almacenan en las vacuolas celulares (González-Díaz et al., 2020).

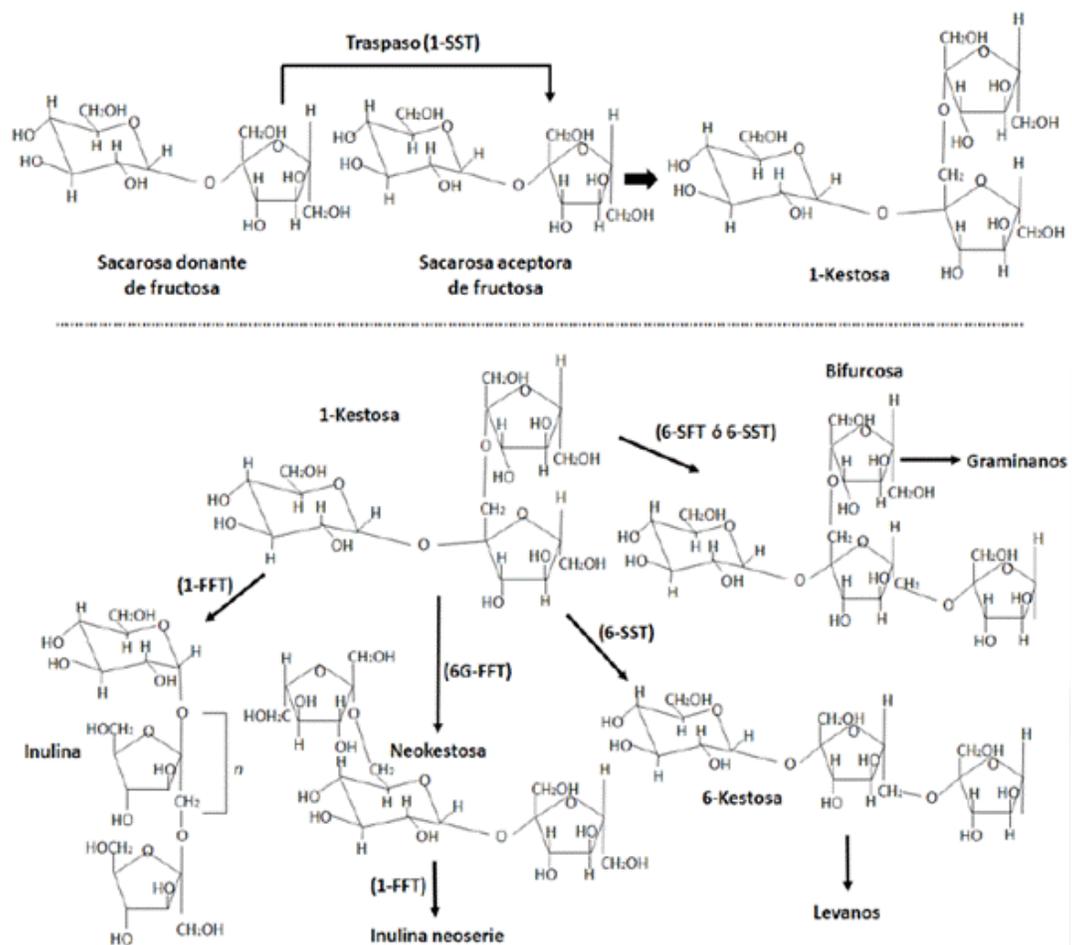


Figura 10. Síntesis de fructanos (González-Díaz et al, 2020).

Dentro de los fructanos que se encuentran en los agaves, están: los graminanos, con estructura ramificada y unidades de bifurcose con enlaces $\beta(2-1)$ y $\beta(2-6)$; las agavinas, con enlaces $\beta(2-1)$ y $\beta(2-6)$ en fructanos y neofructanos graminoides ramificados; y las inulinas y agavinas, polímeros lineales de fructosa con enlaces $\beta(2-1)$ y una glucosa en el extremo (González-Díaz et al., 2020).

Su degradación se lleva a cabo gracias a las enzimas exohidrolasas fructosilicas (EHF), las cuales liberan residuos de fructosa terminales para volverlas disponibles en los procesos que requieran energía (González-Díaz et al., 2020). Las EHF desempeñan un papel importante en el metabolismo de las plantas, especialmente durante procesos fisiológicos que demandan grandes cantidades de energía bajo

condiciones de estrés (González-Díaz et al., 2020). Además de ser una fuente esencial de carbono, los fructanos en plantas se han vinculado estrechamente con la tolerancia a diversos tipos de estrés, actuando como osmoprotector en condiciones adversas como calor, frío o estrés hídrico (González-Díaz et al., 2020).

Los fructanos son el principal producto de la fotosíntesis CAM en los agaves, los cuales son sintetizados y almacenados en los estomas. En donde su principal función es de almacenaje (Lopez et al., 2003). Los fructanos son almacenados en el tallo hasta su fase reproductora, donde son utilizados para la etapa de floración, donde alcanzan la madurez fisiológica plena (Regalado Rentería et al., 2021). Por ello, la concentración y composición de fructanos en agaves dependerá principalmente del estado fisiológico (edad) y órgano que se estudie (Márquez-López et al., 2022; Regalado Rentería et al., 2021).

Se ha observado que la estructura de los fructanos es dependiente de la especie, en diversos estudios en agaves se han encontrado estructuras similares en varias especies como la inulina y las agavinas (Ávila-Fernández et al., 2011; Godínez-Hernández et al., 2015; Lopez et al., 2003; Márquez-López et al., 2022). Dichos compuestos son utilizados en farmacéutica por sus efectos en la modulación del microbiota promoviendo el crecimiento de bacterias benéficas (Huazano-García et al., 2017; Jackson et al., 2023)

En *A. potatorum* se han observado que predominan los fructanos de tipo agavina con enlaces $\beta(2\rightarrow1)$ y $\beta(2\rightarrow6)$, lo que les da una estructura ramificada, siendo extraídos de una planta completa *ex vitro* (Márquez-López et al., 2022; Santiago-García et al., 2021).

Sin embargo, al igual que en el caso de las saponinas, no se dispone de información específica sobre la presencia, acumulación o comportamiento de los fructanos en *A. potatorum* en cultivos de tejido calloso.

1.3. CULTIVO DE TEJIDO CALLOSO IN VITRO

El tejido calloso puede definirse como parénquima indiferenciado y desorganizado, el cual se forma cuando las células vegetales comienzan a crecer en una forma desorganizada, y al unirse entre sí forman una masa amorfa (Bhatia, 2015), los cuales contienen pequeñas zonas de células meristemáticas, otorgando la capacidad de regeneración por embriogénesis u organogénesis (Smith, 2013).

Existen varios factores que inducen el tejido calloso, como lo son reguladores de crecimiento vegetal, lesiones o heridas y sobreexpresión de reguladores del ciclo celular. Las plantas tienen un potencial endógeno para generar tejido calloso como respuesta ante lesiones en órganos o tejidos (Efferth, 2019) formando una cicatriz para cubrir la lesión previniendo la pérdida de agua y la entrada de patógenos (Anaya-Dyck et al., 2010; Ikeuchi et al., 2013). La inducción por sobreexpresión de reguladores sucede cuando en un meristemo, un embrión o un ovulo, los reguladores del ciclo celular principales se sobren expresan induciendo la formación del callo (Ikeuchi et al., 2013).

La inducción por reguladores de crecimiento exógenos puede ser mediante el uso de auxinas y citoquininas.

La inducción por auxinas se produce por la represión de quinasas dependientes de ciclinas (CDKs) o por la transcripción de factores LBD (*lateral organ boundaries domain*), mientras que la inducción con citoquininas induce la expresión de ciclinas (Bhatia, 2015; Ikeuchi et al., 2013). Los reguladores de crecimiento vegetal se adicionan al medio de cultivo para inducir la respuesta deseada, en este caso, inducción de tejido calloso; pueden ser compuestos naturales o sintéticos. Estos reguladores de crecimiento se deben de aplicar de manera equilibrada, ya que el aumento de uno o de otro lleva a diferentes respuestas morfogénicas (Fehér, 2019).

El tejido calloso puede ser clasificado en subgrupos a partir de sus características macroscópicas y en su capacidad de regenerar parcialmente órganos (Bhatia, 2015; Ikeuchi et al., 2013). La clasificación por sus características macroscópicas se basa en la agrupación de las células, siendo friable o compacto; el callo friable es útil para

el establecimiento de suspensión de células en medio líquido (Bhatia, 2015). La clasificación por su capacidad de generación de órganos dependerá de regeneración de la raíz, embriones o brotes (Ikeuchi et al., 2013).

En el área de biotecnología, el estudio de la producción de tejido calloso *in vitro* es de interés debido a su potencial para propagación vegetal, ingeniería genética y producción de metabolitos secundarios. El uso de tejido calloso ha ganado mucho terreno en la industria debido a que maximiza la producción de biomasa en un periodo de tiempo más corto (Dabuwar et al., 2019).

1.4. BIORREACTORES

Los biorreactores de inmersión temporal han surgido como una herramienta para la obtención de mayor cantidad de biomasa a menor costo en comparación a un medio semisólido, ya que no requieren del agente gelificante (Chávez-Ortiz & Rodríguez-Ortega, 2022; Ramos-Castellá et al., 2014). Estos también permiten el escalamiento de la micropropagación controlando el pH, temperatura, aireación, tiempo de contacto con el medio y también la facilidad para la renovación del medio (Arredondo Ramírez et al., 2019; Ramos-Castellá et al., 2014; Valdiani et al., 2019). Se han reportado diferentes diseños o variantes de un biorreactor de inmersión temporal como el RITA®, SETIS™, inmersión por tanques gemelos, ebb-and-flow (reflujo) (Bello-Bello et al., 2021; Chávez-Ortiz & Rodríguez-Ortega, 2022; Mancilla-Álvarez et al., 2021). El mecanismo de los biorreactores se basa en mantener en contacto el explante con el medio por poco tiempo para evitar la hiperhidratación de estos (Ramos-Castellá et al., 2014).

En agaves se han realizado varios estudios sobre el uso de biorreactores de inmersión temporal para su micropropagación (tabla 1); no obstante, aún no hay estudios utilizando biorreactores para crecimiento o inducción de tejido calloso en este género de plantas. En otros grupos de especies vegetales se han utilizado los biorreactores para la producción de metabolitos en órganos modificados (Jin et al., 2020), obteniendo buenos rendimientos.

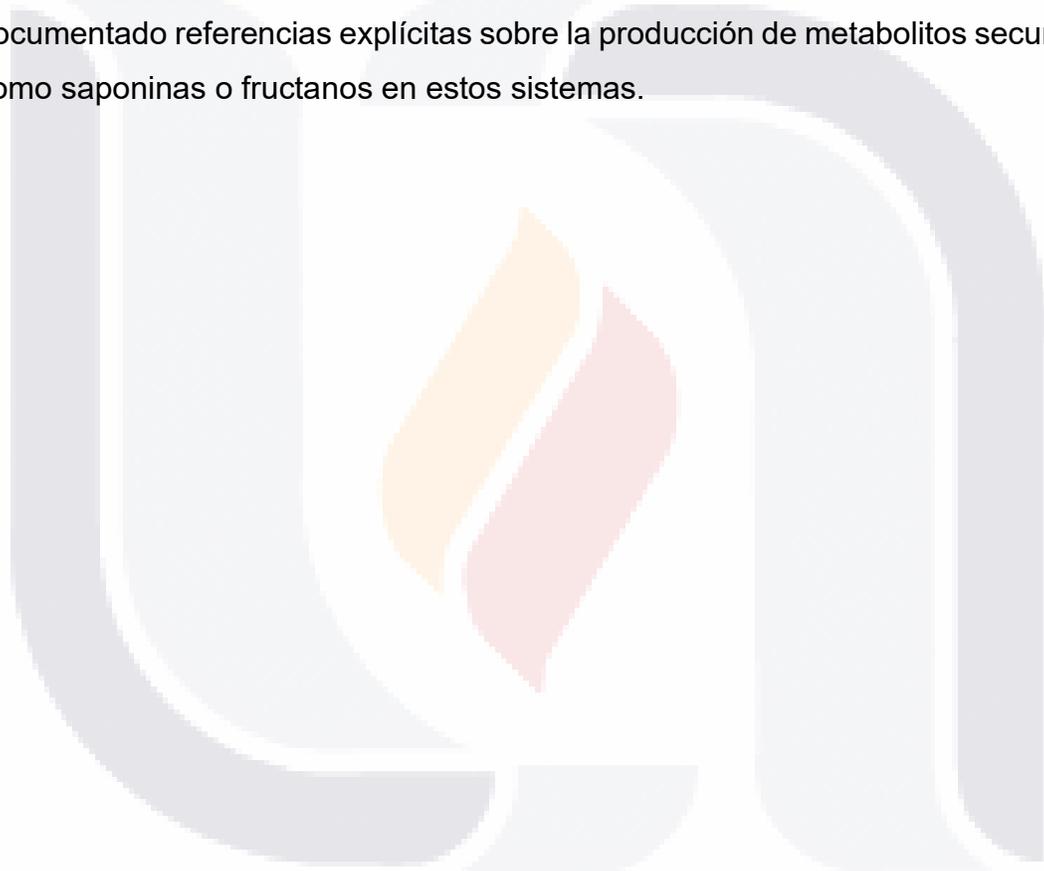
Tabla 1. Estudios en agaves utilizando biorreactores de inmersión temporal.

Especie	Tipo de biorreactor	Medio de cultivo	Tiempo de inmersión	Frecuencia de inmersión	Resultados	Referencia
<i>A. tequilana</i> Weber	Orbitabión®	MS con 2 mg/L 2,4-D y 0.3 mg/L BAP	1 min	24 y 48 h	Embriones por 1 g de callo: TI 24hrs: 89.6 TI 48hrs: 295.33	Portillo & Santacruz-Ruvalcaba, 2006
<i>A. marmorata</i>	NR	MS con 3 mg/L BAP y 3 mg/L AIA.	2 min	4, 8 y 12 h	Brotos por explante: TI 4: 10 TI 8: 20 TI 12: 17	Mancilla-Álvarez et al., 2024
	Tanques gemelos	MS con 6 mg/L de BA.	2 min	4 y 8 h	TI 8: 84% de explantes generaron brotes.	Martinez-Martinez et al., 2021
<i>A. potatorum</i> Zucc	NR	MS con 2 mg/L BA y 4% sacarosa	NR	NR	18 brotes por explante	Caamal-Velázquez et al., 2022
	Ebb-and-Flow	MS con 3 mg/L BAP y 3 mg/L AIA	2 min	12 h	29.76 brotes por explante	Correa-Hernández et al., 2022
<i>A. angustifolia</i> Haw	RITA®	MS con 10 mM KNO ₃ , 5 mM NH ₄ NO ₃ , 0.1µM 2,4-D y 44.4µM BA.	1 min	6 h	Evaluación de crecimiento de planta y de numero de brotes desarrollados	Monja-Mio et al., 2021
<i>A. guiengola</i> Gentry	Tanques gemelos	MS con 1 mg/L BA	1 min	6 h	43 brotes por explante	Chávez-Ortiz et al., 2021

TI: tiempo de inmersión; NR: no se reporta.

Se ha reportado el uso del tejido calloso como etapa previa para la embriogénesis, en los que la inducción de callo se realizó primero en medio semisólido (Sánchez-Calvo & Alvarenga-Venutolo, 2015). Este enfoque busca minimizar el estrés inicial y permitir una formación estructurada del callo antes de someterlo a condiciones más dinámicas como agitación en medio líquido.

En la mayoría de los estudios revisados, el objetivo principal es la propagación clonal mediante embriogénesis u organogénesis; no obstante, no se han documentado referencias explícitas sobre la producción de metabolitos secundarios como saponinas o fructanos en estos sistemas.



2. JUSTIFICACIÓN

La extracción directa de metabolitos como saponinas y fructanos de plantas adultas de *A. potatorum* y *A. guiengola* es inviable en las condiciones actuales. *A. potatorum* es una especie que no se reproduce asexualmente; su estatus de conservación es vulnerable, debido en gran medida a la extracción de individuos silvestres, principalmente para la producción de mezcal, pues este agave es objeto de poco o nulo manejo agrícola. *A. guiengola* es una especie micro endémica, amenazada, solo se utiliza como planta de ornato, por lo que es de poco interés económico y no hay muchos estudios sobre ella. Ambas especies tienen el potencial de utilizarse para la obtención de metabolitos de interés económico, pero antes es necesario desarrollar esquemas de producción de metabolitos alternativos al uso de ejemplares silvestres, que no impliquen aumentar la presión sobre sus ya muy comprometidas poblaciones naturales.

Este trabajo plantea el desarrollo de un protocolo de inducción y crecimiento de tejido calloso, para posteriormente evaluar si este tejido conserva la capacidad de síntesis de saponinas y fructanos, lo que abrirá la posibilidad de producir estos metabolitos en tejido calloso cultivado *in vitro*.

3. HIPÓTESIS

El uso de reguladores vegetales permitirá inducir el crecimiento de tejido calloso en *A. potatorum* y *A. guiengola*. Las condiciones como la renovación periódica del medio de cultivo, así como el uso de un biorreactor de tanques gemelos tendrán un efecto positivo en la cantidad de metabolitos, como fructanos y saponinas, sintetizados por el tejido calloso.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto del uso de un biorreactor de inmersión temporal de tipo tanques gemelos en el crecimiento del tejido calloso de *Agave potatorum* y *Agave guiengola*, así como en la producción y acumulación de saponinas y fructanos.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1 Evaluar la efectividad de biorreactores de inmersión temporal en la inducción y crecimiento de tejido calloso en *A. potatorum* y *A. guiengola*.
- 2 Evaluar el efecto de la renovación periódica del medio de cultivo en el desarrollo del tejido calloso de *A. potatorum* y *A. guiengola*.
- 3 Cuantificar saponinas y fructanos producidos en tejido calloso de *A. potatorum* y *A. guiengola*

5. INCIDENCIA, IMPACTO SOCIAL O AMBIENTAL ESPERADO

Este trabajo contribuye al cumplimiento de los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) de la Agenda 2030 de la ONU, en particular con el ODS 12 Producción y consumo responsables, que promueve el uso eficiente de los recursos naturales; y el ODS 15 Vida de ecosistemas terrestres, que aboga por la protección, restauración y uso sostenible de los ecosistemas, especialmente aquellos que albergan especies endémicas o en riesgo. Además, esta propuesta se alinea con el Convenio sobre la Diversidad Biológica (CDB), también respaldado por la ONU, que establece la necesidad de conservar la diversidad biológica mediante el uso de métodos sostenibles que incluyan la participación científica y comunitaria, al reducir la presión sobre poblaciones silvestres, ofreciendo alternativas biotecnológicas viables. El presente trabajo es un primer acercamiento al estudio de la potencial obtención de metabolitos de interés a partir de callos cultivados *in vitro* de *A. potatorum* y *A. guiengola*, dos especies de agaves endémicas de México cuya conservación está en riesgo. Los datos y protocolos generados en este trabajo constituyen un punto de partida para establecer, en trabajos futuros, una estrategia más amplia y optimizada para la producción *in vitro* de metabolitos de interés económico, evitando el uso de ejemplares silvestres de especies amenazadas o vulnerables.

6. METODOLOGÍA

6.1. PROPAGACIÓN DE MATERIAL VEGETAL

Para contar con suficientes brotes de *A. guiengola* y *A. potatorum*, se partió de cultivos ya establecidos *in vitro* del Banco de Germoplasma de la Unidad de Biotecnología Vegetal de la Universidad Autónoma de Aguascalientes.

Los explantes obtenidos del banco de germoplasma se sembraron en medio MS (Murashige & Skoog, 1962) adicionado con 30 g/L de sacarosa, 9 mg/L de agar y 2 mg/L de 6-benciladenina (BA) por 2 meses hasta que los brotes tuvieron un tamaño de 2 a 2.5 cm, los cuales se utilizaron para la generación de callo.

6.1.1. DESINFECCIÓN DE EXPLANTES

Durante la evaluación de la inducción de tejido caloso en medio semisólido se presentó contaminación al momento de realizar los subcultivos, por lo que fue necesario un proceso de desinfección para recuperar los explantes sembrados.

Para la desinfección de explantes se colocaron en un vaso de precipitado con una mezcla de agua corriente y dermoclean al 5%, en agitación continua. Posteriormente se enjuagaron tres veces con agua destilada. A continuación, los explantes se colocaron en una solución de Cloralex al 15% con 10 gotas de tween 20 y se dejaron en agitación durante 20 minutos. Después se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril. Una vez enjuagados los explantes, en la campana de flujo laminar se procedió a remover el tejido dañado por el procedimiento, y se sembraron en medio MS sin reguladores adicionado con 30 g/L de sacarosa y 9 g/L de agar.

6.2. EVALUACION DE DIFERENTES COMBINACIONES DE AUXINAS/CITOCININAS EN LA INDUCCIÓN DE TEJIDO CALLOSO EN MEDIO SEMISÓLIDO

Para la generación de callo se consideraron doce tratamientos más el tratamiento control, dichos tratamientos consistieron en medio MS adicionado 30 g/L de sacarosa, 9 g/L de agar y diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento (Tabla 2), los cuales se seleccionaron en base a estudios anteriores para la inducción de callo (Bautista-Montes et al., 2022; Reyes-Silva et al., 2022).

Tabla 2. Tratamientos para inducción de tejido calloso.

Auxinas \ Citocinina	0 mg/L	3 mg/L BA	7 mg/L BA
0 mg/L	Control	-	-
1 mg/L 2,4-D	T1	T5	T9
2 mg/L 2,4-D	T2	T6	T10
3 mg/L picloram	T3	T7	T11
3 mg/L ANA	T4	T8	T12

*2,4-D: ácido 2,4-diclorofenoxiacético. ANA: ácido 1-naftalenacético. BA: 6-benciladenina

Para la inducción de tejido calloso se utilizaron brotes de agave de 2.5 cm de largo, a los que se les cortaron las raíces y el largo de las hojas para utilizar solamente el tallo. Los tallos se inocularon en frascos con 60 mL de medio MS adicionado con 30 g/L de sacarosa y los reguladores de crecimiento vegetal, según lo indicado en la tabla 2. El pH del medio se ajustó a 5.7 y para solidificarlo se utilizaron 9 g/L de agar; posteriormente fue esterilizado en autoclave a 120 °C por 20 min. Para cada tratamiento se usaron cinco frascos de 250 mL de boca ancha, con dos explantes por frasco para *A. guiengola*, y tres explantes por frasco para *A. potatorum*.

Para el crecimiento los explantes se colocaron en el cuarto de incubación a 25 ± 2 °C con un fotoperiodo de 16 hrs luz y 8 hrs oscuridad, se usaron lámparas de luz blanca.

El experimento de la inducción de tejido calloso se llevó a cabo durante 60 días; cada quince días se registró el peso fresco de los explantes dentro de la campana de flujo laminar para mantener la asepsia. También se registró el porcentaje de explantes que presentaron otras respuestas, a saber, generación de brotes o raíces, vitrificación o necrosis.

6.3. EVALUACIÓN DE CRECIMIENTO DEL TEJIDO CALLOSO UTILIZANDO DIFERENTES SISTEMAS DE CULTIVO.

Una vez seleccionada la mejor combinación de reguladores de crecimiento vegetal para la inducción de tejido calloso, se evaluó el efecto que tienen los tres sistemas de cultivo (medio semisólido, medio líquido y BIT) en el crecimiento de tejido calloso a partir de callo.

Se consideraron tres tratamientos: cultivo en medio sólido, cultivo en medio líquido con inmersión permanente y cultivo en BITs de tipo tanque gemelo. En todos los casos se empleó medio MS adicionado con 30 g/L de sacarosa, en el caso de semisólido se adicionaron 9 g/L de agar, y para cada especie se utilizó una combinación auxinas y citocininas diferentes dependiendo de los resultados obtenidos en el paso anterior, en los cuales se observó que, con las siguientes concentraciones, se obtenía una mejor inducción de tejido calloso: *A. potatozum* 2 mg/L de 2,4-D con 3 mg/L de BA y para *A. guingola* 1 mg/mL 2,4-D y 3 mg/mL BA. Se montaron cinco replicas para semisólido y medio líquido en agitación, y seis réplicas para biorreactores.

Para la renovación, se consideraron tres replicas para cada sistema de cultivo, en donde, cada quince días se renovaba el medio de cultivo por uno fresco. En cada biorreactor o recipiente de cultivo se inoculó 1 g de tejido calloso; la evaluación de su crecimiento se llevó a cabo durante 60 días a partir del día de siembra inicial.

Cada quince días se registró el peso fresco de los callos; se pesaron dentro de la campana de flujo laminar para mantener la asepsia.

6.4. EVALUACIÓN DE INDUCCIÓN DEL TEJIDO CALLOSO UTILIZANDO DIFERENTES SISTEMAS DE CRECIMIENTO

Asimismo, se evaluó el efecto de tres sistemas de cultivo (medio semisólido, medio líquido y sistema BIT) sobre la inducción de tejido calloso a partir de explantes, con el objetivo de identificar el sistema más eficiente para maximizar la tasa de formación de callo y optimizar las condiciones morfogénicas del cultivo.

En todos los casos se empleó medio MS adicionado con 30 g/L de sacarosa, en el caso de semisólido se adicionaron 9 g/L de agar, utilizando la mejor combinación de auxinas/citocininas obtenida en el paso uno para cada especie: *A. potatorum* 2 mg/L de 2,4-D con 3 mg/L de BA y para *A. guiengola* 1 mg/mL 2,4-D y 3 mg/mL BA, con cinco replicas para semisólido y medio líquido en agitación, y seis réplicas para biorreactores. Para el caso de *A. guiengola*, se consideró un periodo de inmersión cada 4 hrs.

Los explantes utilizados fueron brotes de al menos 2 cm de altura; se colocó un explante por replica. Las mediciones se realizaron cada 15 días durante un periodo de 60 días.

6.5. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE SAPONINAS

6.5.1. PREPARACIÓN DE MATERIAL VEGETAL

Se colectaron tres hojas de ejemplares de aproximadamente 10 años de *A. potatorum* Zucc. del jardín árido anexo a la Unidad de Biotecnología Vegetal de la Universidad Autónoma de Aguascalientes. En el caso de *A. guiengola*, se obtuvieron las hojas de un de un ejemplar de 6 años cultivado en maceta. Para la limpieza y secado de las hojas se siguió la metodología propuesta por Durán et al. (2021), con algunas modificaciones. Las hojas se lavaron con agua destilada y posteriormente con etanol al 90%; luego se cortaron de manera transversal en tiras de 2 cm y se secaron en una estufa (Gallenkamp, UK) a 40 °C. Una vez alcanzado un peso constante, el materia vegetal se trituroó y se pesó (tabla 3).

Tabla 3. Peso fresco y seco de las hojas de *A. potatorum* y *A. guiengola*

	Peso fresco (g)	Peso seco (g)
Hoja <i>A. potatorum</i>	233.0	48.68
Hoja <i>A. guiengola</i>	47.0	2.13

El tejido caloso obtenido, se pesó y se llevó a secar en una estufa (Gallenkamp, UK) a 40 °C. Una vez alcanzado un peso constante, el materia vegetal se trituró y se pesó (Tabla 4).

Tabla 4. Peso fresco y seco de tejido caloso obtenido en los diferentes sistemas de cultivo.

			Peso fresco (g)	Peso seco (g)
<i>A. potatorum</i>	Biorreactor	Con renovación de medio	5.82	0.26
		Sin renovación de medio	3.53	0.27
	Medio líquido en agitación	Con renovación de medio	11.31	1.10
		Sin renovación de medio	3.14	0.16
	Semisólido	Con renovación de medio	21.09	1.28
		Sin renovación de medio	5.53	0.08
<i>A. guiengola</i>	Biorreactor	Con renovación de medio	1.89	0.13
		Sin renovación de medio	1.28	0.17
	Medio líquido en agitación	Con renovación de medio	2.93	0.19
		Sin renovación de medio	5.51	0.21
	Semisólido	Con y sin renovación de medio	2.49	0.20

6.5.2. EXTRACCIÓN DE SAPONINAS

Para el proceso de extracción se siguió la metodología propuesta por Durán et al., (2021). Se colocó el material seco y molido de *A. potatorum* en un matraz Erlenmeyer con agua desionizada en una relación 1:2 (p/v) durante 2 h para hidratar el material vegetal. A continuación, se agregó n-butanol en una relación 1:1 (v/v; agua: n-butanol) y se dejó agitando durante 24 h a temperatura ambiente. Se formó una mezcla bifásica. Para recuperar la fase orgánica, se incrementó el volumen de agua y se dejó en agitación por otras 24 h. Pasado este tiempo, la solución obtenida se filtró y se recuperó la fase orgánica decantando en un embudo de separación. La fase orgánica se concentró en un rotavaporador (Sev-prendo, México).

Para las muestras de tejido calloso obtenidas de los experimentos, el solvente que se utilizó fue metanol. El material seco y molido de tejido calloso, se colocó en matraces de 25 mL y se agregó metanol hasta cubrir por completo la muestra, agregando aproximadamente 15 mL a 30 mL por muestra. Una vez que la muestra estuviera cubierta por completo, se llevó a sonicator a 35 °C por 5 minutos. Pasado ese tiempo, se recupera la fase líquida con una pipeta Pasteur y un filtro.

Este proceso se repitió hasta que el extracto obtenido después del sonicator fuera casi transparente. El extracto obtenido se concentró en un rotavapor. Se registró el peso del extracto seco en una balanza y se registró el peso, posteriormente se almaceno en refrigeración a 4°C aproximadamente hasta su uso.

6.5.3. DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE SAPONINAS POR CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA

Para determinar la presencia de saponinas en las muestras, se utilizó la técnica de cromatografía en capa fina utilizando como fase móvil una solución de cloroformo, ácido acético glacial, metanol y agua en una relación 64:32:12:8 v/v, usando cromatofolios de aluminio recubiertos de silica gel 60 F254 en fase normal y como estándar, se utilizó saponinas del árbol de *Quillaja* sp. (Sigma-Aldrich S4521) con un contenido de sapogenina del 20-35%. Se utilizaron 10 µL del extracto de metanol recuperado de la extracción anterior.

6.5.4. CUANTIFICACION DE SAPONINAS POR ESPECTROFOTOMETRÍA

Para la cuantificación de saponinas se utilizó el método de ácido-sulfúrico-vainillina; adaptado de León-Roque et al. (2019) donde el extracto obtenido anteriormente se resuspendió en el volumen adecuado de metanol para llevar el extracto a una concentración de 5 mg/ml, excepto la muestra de penca de *A. potatozum*, que se llevó a una concentración de 1 mg/ml.

En un tubo eppendorf se colocó una solución de con 50 μ L de vainillina (8% p/v) y 400 μ L de ácido sulfúrico (72% p/v); a esa solución se le agregaron 50 μ L de los extractos concentrados. Posteriormente se incubaron a 60°C por 10 minutos en una incubadora. Pasado este tiempo, los tubos con la solución se llevaron a un baño de hielo durante 15 minutos. Inmediatamente, las muestras se colocaron en una placa y se obtuvo el valor de absorbancia en el lector de microplacas (Thermo Scientific, MULTISKAN Sky) a 538nm.

6.6. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE FRUCTANOS POR KIT MEGAZYME

Para la extracción y cuantificación de fructanos se utilizó el kit Megazyme ® NEOGEN.

Se pesaron de 90 a 100 mg de las muestras de hojas y callos previamente secados y molidos; cada muestra se colocó en un tubo de ensayo con 25 mL de agua destilada y con el estándar de D-fructosa; los controles de fructanos, levanos, inulinas y sacarosa se sometieron al mismo procedimiento. Los tubos se colocaron a baño maría a 100°C con la tapa suelta por 5 min. Posteriormente se mezclaron con ayuda de vórtex y se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Una vez fríos, se mezclaron nuevamente con vórtex y se colocaron en tubos eppendorf 2 mL de las muestras para centrifugar a 13000 rpm durante 5 minutos.

Se tomaron 200 μ L de cada muestra en un tubo eppendorf y se les agregó 200 μ L de una solución de amilasa, sucrasa y maltasa y se incubaron a 30 °C durante 30 min. Se agregaron 200 μ L de la solución de borohidruro de sodio a cada tubo, y se

llevaron a incubar a 40 °C por 30 min para completar la reacción de reducción de azúcares a azúcares alcohólicos. Se agregaron 500 µL de una solución de ácido acético glacial 200 mM, y se agitaron vigorosamente en vórtex.

De cada una de las muestras procesadas según lo descrito, se tomaron 3 alícuotas de 200 µL cada una y se colocaron en tubos a los que ya se había agregado 100 µL de una solución de fructanasa 1.5 mg/mL, y luego se les agregaron 100 µL de buffer de ácido acético 100 mM a pH 4.5 a cada tubo, se sellaron y se agitaron en vórtex. Después se taparon con parafilm y se incubaron a 40 °C por 30 min para completar la hidrólisis de fructanos a D-fructosa y a D-glucosa.

En seguida, a cada tubo se le agregaron 5 mL de solución de ácido p-hidroxibenzoico (PAHBAH) al 4 %, se agitaron en vórtex y se llevaron a baño maría a 95 °C durante 6 minutos. Pasado ese tiempo los tubos se llevaron a baño de hielo (18-20 °C) por 5 min. Finalmente, en espectrofotómetro se leyó la absorbancia a 410 nm de cada tubo y estándar.

Para calcular las concentraciones se realizó una corrección, considerando la absorbancia de los controles, utilizando la fórmula $\Delta A * \frac{54.5 \mu g}{Ab} * D * 61.9$, donde ΔA es la absorbancia de la muestra, Ab es la absorbancia del estándar de fructosa, D es el factor de dilución de las muestras (en caso de que se hayan diluido, se considera el volumen de dilución) y la constante 61.9 es el ajuste de los controles de sacarosa, levano e inulina.

7. RESULTADOS

7.1. EVALUACION DE DIFERENTES COMBINACIONES DE AUXINAS/CITOCININAS EN LA INDUCCIÓN DE TEJIDO CALLOSO EN MEDIO SEMISÓLIDO

El mejor tratamiento para la inducción de tejido calloso para *A. potatorum* fue la combinación de 3 mg/L BA y 2 mg/L de 2,4-D, ya que el 75% de los explantes generaron callo (fig. 11), solo el 8 % de los explantes generaron brotes, y tuvo un porcentaje muy bajo de explantes necrosados.

Se observa además que, en ausencia de citocinina, se obtiene un menor crecimiento de tejido calloso a diferencia de cuando se tienen en combinación con la auxina. De igual manera, con la concentración más alta de auxina (7 mg/L) hay una menor generación de tejido calloso (fig. 11).

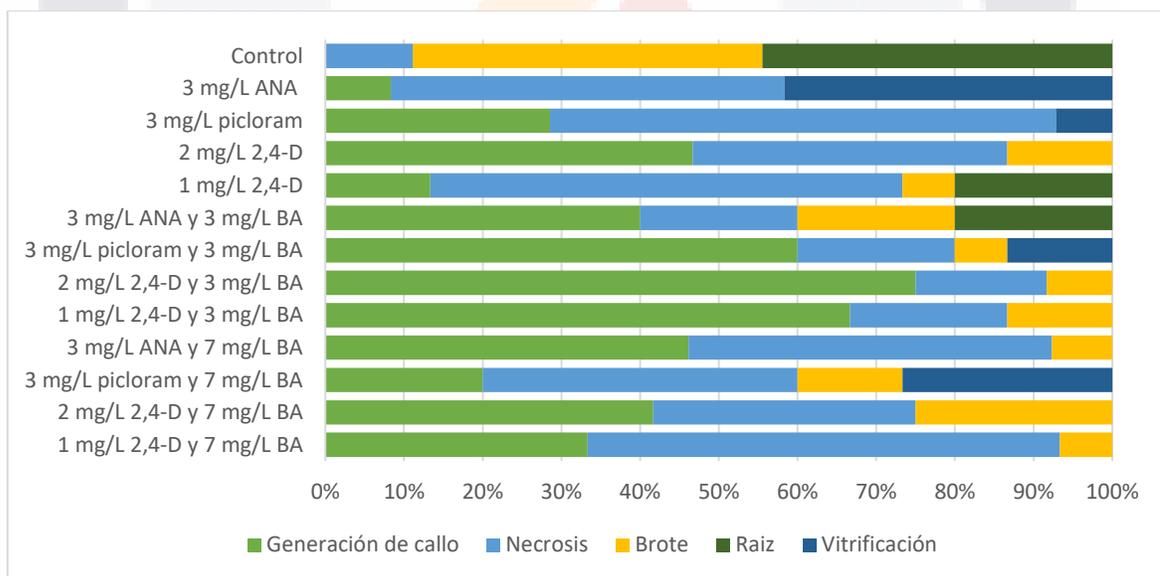


Figura 11. Respuestas morfogénicas de los explantes de *A. potatorum* a diferentes combinaciones y concentraciones de auxinas/citocininas. n=15

En *A. potatozum* en todas las combinaciones de auxinas/citocininas más del 20% de los explantes necrosaron, mientras que en los tratamientos con picloram se hiperhidrataron más del 10% de los explantes. También se presentó hiperhidratación del 47% de los explantes cuando solo se utilizó 3 mg/L de ANA.

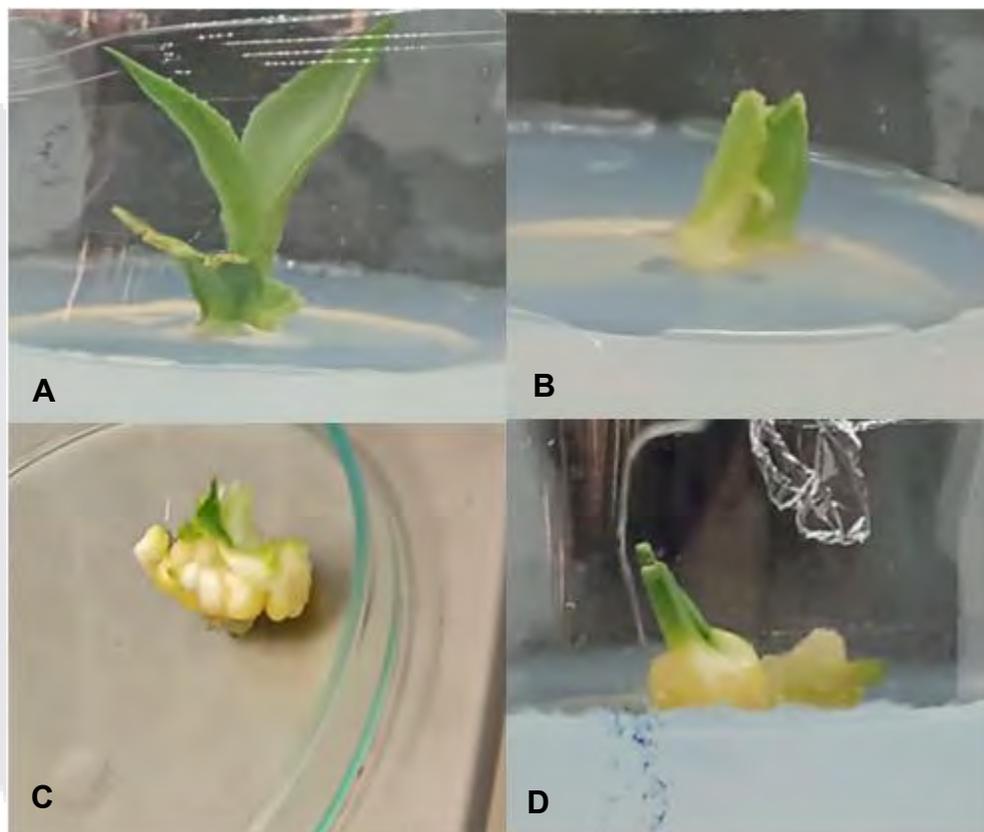


Figura 12. Respuestas morfológicas de los explantes de *A. potatozum* a diferentes tratamientos. A: control, sin auxinas/citocininas; B: 2 mg/L 2,4-D; C: 2 mg/L de 2,4-D y 3 mg/L BA; D: 2 mg/L de 2,4-D y 7 mg/L BA.

En cuanto al peso del tejido calloso generado en cada tratamiento, según la prueba de Tukey, no hubo diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos, pero sí de todos los tratamientos con respecto al control debido a que en este no hubo generación de tejido calloso (Fig. 13). El callo de mayor peso fue de 2.35 ± 0.89 g y se obtuvo con la combinación de 1 mg/L de 2,4-D con 3 mg/L de BA; mientras que

el de menor peso fue de 0.83 ± 0.20 g y se presentó en el tratamiento con 3 mg/L de ANA.

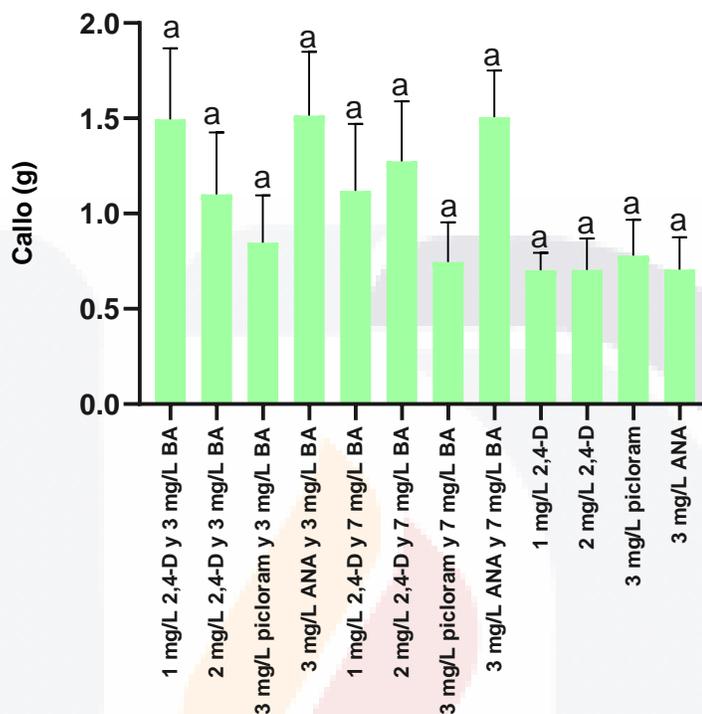


Figura 13. Peso promedio del tejido calloso de *A. potatoyum* después de 60 días. Letras iguales indican que no hubo una diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos según la prueba de Tukey con un nivel de significancia de $p > 0.05$. No se considera el control dado que no generó tejido calloso.

En *A. guineola* dos tratamientos indujeron formación de tejido calloso en más del 80% de los explantes: las combinaciones de 1 mg/L 2,4-D con 3 mg/L BA, y 3 mg/L ANA con 7 mg/L BA (fig. 14). Considerando que ambos tratamientos dan resultados similares, se optó por el tratamiento con las concentraciones de 1 mg/L 2,4-D y 3 mg/L BA.

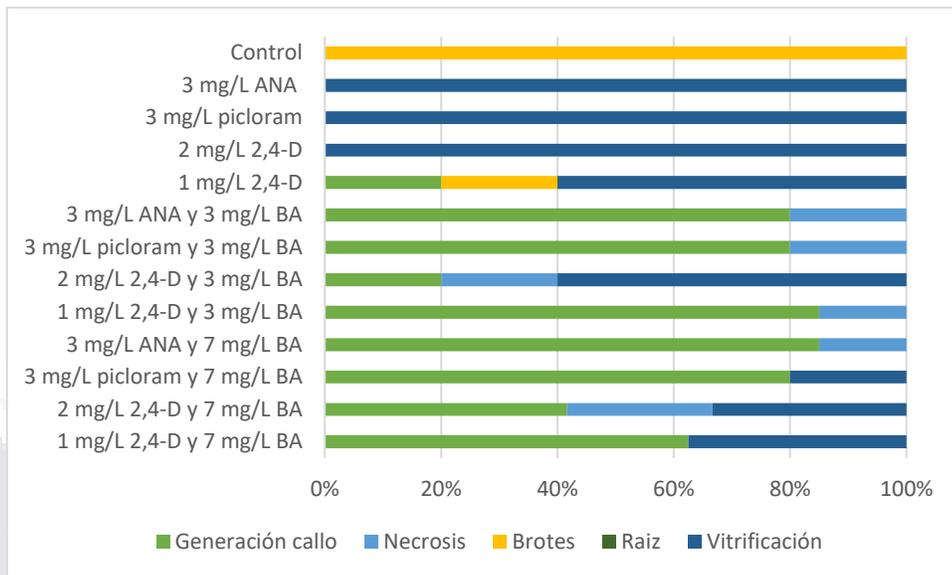


Figura 14. Respuestas morfogénicas de los explantes de *A. guineensis* a diferentes combinaciones y concentraciones de auxinas/citocininas. n=10

En *A. guineensis* todos los tratamientos que consistieron en combinaciones de auxina y citocinina produjeron callo; en los tratamientos sin auxinas/citocininas o que solo contenían auxinas, no hubo generación de callo, excepto con 1 mg/L de 2,4-D (Fig. 15). En los tratamientos donde solo se usaron auxinas se observó un 100% de hiperhidratación de los explantes.

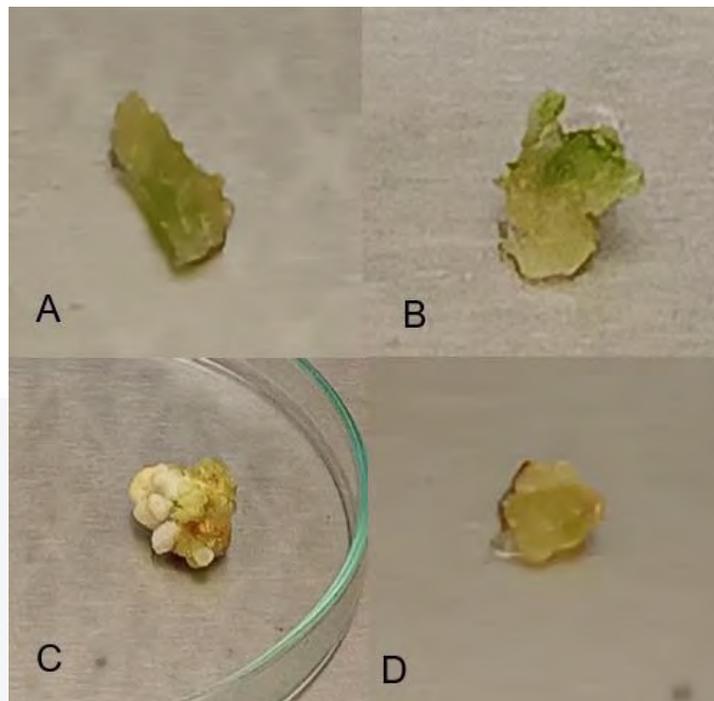


Figura 15. Diferentes respuestas morfogénicas de *A. guiengola*. A: Hiperhidratación de explante con 2 mg/L 2,4-D. B: Inducción de callo e hiperhidratación de explante con 1 mg/L 2,4-D y 7 mg/L BA. C: Tejido calloso con 1 mg/L 2,4-D y 3 mg/L BA. D: Tejido oxidado con 2 mg/L de 2,4-D y 3 mg/L BA

En *A. guiengola* no hubo diferencia estadísticamente significativa en el peso del tejido calloso generado entre los tratamientos que consistieron solo de auxinas y las combinaciones 2 mg/L de 2,4-D y 3 mg/L o 7 mg/L de BA. El resto de las combinaciones de BA con alguna auxina si mostraron una diferencia estadísticamente significativa (fig. 16).

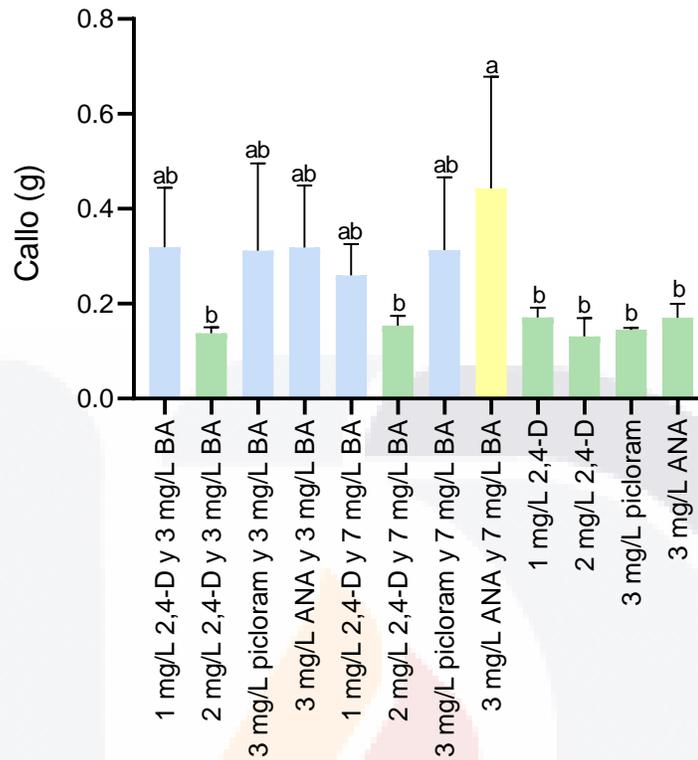


Figura 16. Peso promedio del tejido calloso de *A. guiengola* después de 60 días de siembra. Letras distintas indican que hubo una diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos según la prueba de Tukey con un nivel de significancia de $p > 0.05$. No se considera el control dado que no genero tejido calloso.

El callo de mayor peso fue de 0.44 ± 0.23 g, obtenido con la combinación de 3 mg/L ANA y 7 mg/L BA, mientras que el de menor peso, 0.13 ± 0.04 g, se obtuvo con 2 mg/L 2,4-D.

7.2. EVALUACIÓN DE CRECIMIENTO DEL TEJIDO CALLOSO UTILIZANDO DIFERENTES SISTEMAS DE CULTIVO.

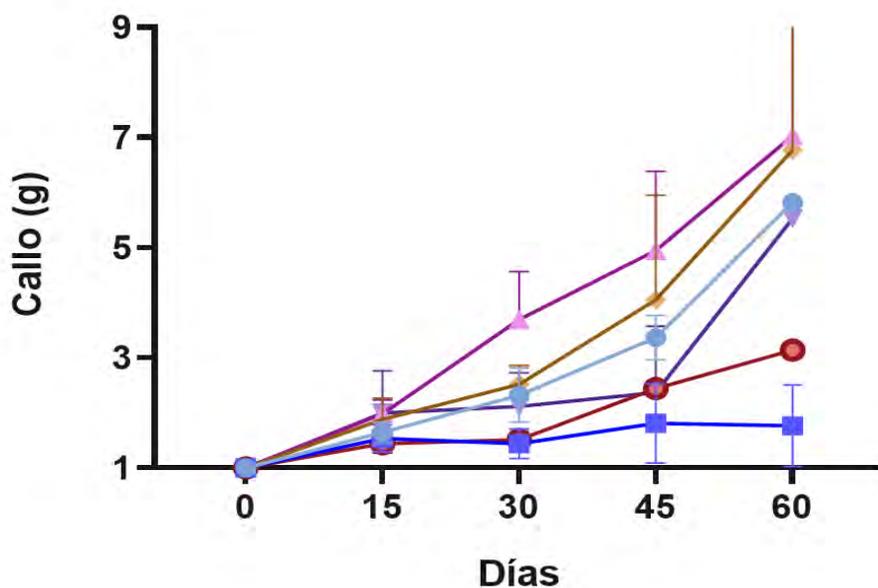
Después de definir las concentraciones óptimas de auxinas/citocininas para generar callo en medio semisólido, se realizó la cinética de crecimiento de callos en medio semisólido, en inmersión permanente y en biorreactores de inmersión temporal de tipo tanques gemelos, empleando medio adicionado con la mejor combinación de auxinas y citocininas para cada especie; en todos los casos se partió de 1 g de tejido calloso.

Para la evaluación de los sistemas de cultivo se consideró el porcentaje de necrosis, así como el incremento de tejido calloso. La prueba de Tukey, con una confianza del 95%, demostró que no hay diferencia significativa estadística en los diferentes sistemas de cultivo en cuando a crecimiento de callo para ambas especies.

En *A. potatorum*, en los tres sistemas de cultivo (medio semisólido, medio líquido y biorreactor de inmersión temporal) el peso del tejido calloso después de 60 días de cultivo fue de 1 a 2 veces mayor (tabla 5) en los tratamientos con renovación periódica del medio de cultivo en comparación con los tratamientos sin renovación del medio de cultivo. Y comparando los tres sistemas de cultivo empleando renovación periódica del medio de cultivo, tanto en medio líquido como semisólido hubo un mayor crecimiento de tejido calloso, que empleando biorreactores (fig. 17).

Tabla 5. Peso de tejido calloso de *A. potatorum* a los 60 días de cultivo.

Sistema	Con renovación de medio (g)	Sin renovación de medio (g)
Biorreactor	5.82	2.35
Medio líquido en agitación	6.77	3.14
Semisólido	7.03	5.53



- ▲ Semisolido sin renovación de medio
- Agitación sin renovación de medio
- Biorreactor sin renovación de medio
- ▲ Semisolido con renovación de medio
- ◆ Agitación con renovación de medio
- Biorreactor con renovación de medio

Figura 17. Cinética de crecimiento de tejido calloso de *A. potatozum* en diferentes sistemas de cultivo empleando medio MS adicionado con 3 mg/L BA y 2 mg/L de 2,4-D.

En biorreactores con renovación periódica de medio de cultivo se presentó un 66.6% de callos necrosados; mientras que en todos los sistemas sin renovación periódica de medio de cultivo se observó un 50% de necrosis (tabla 6).

Tabla 6. Porcentaje de tejido calloso necrosado en los diferentes sistemas de cultivo en *A. potatozum*.

Sistema	Porcentaje de necrosis	
	Con renovación de medio	Sin renovación de medio
Biorreactor	66.7%	33.3%
Medio líquido en agitación semisólido	0.0%	50.0%
	0.0%	50.0%

En *A. guiengola* los callos cultivados en biorreactores mostraron que a partir del día 15, el peso del tejido calloso empieza a decrements progresivamente hasta llegar a ser menor o igual a 1 g (fig. 18).

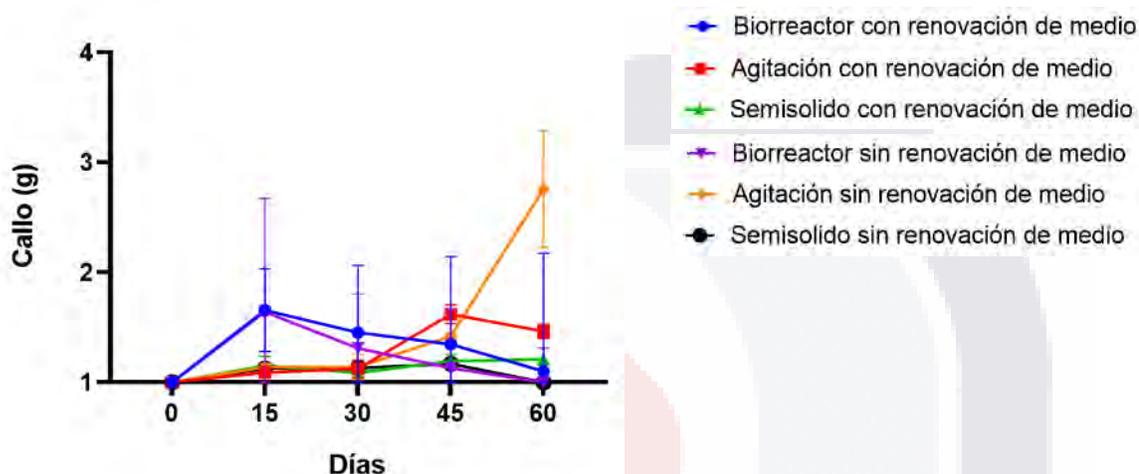


Figura 18. Cinética de crecimiento de tejido calloso de *A. guiengola* en diferentes sistemas de cultivo empleando medio MS adicionado con 3 mg/L BA y 1 mg/L de 2,4-D.

Solo se presentó necrosis en el 33.3% de los callos en biorreactor. El sistema de agitación sin renovación de medio de cultivo al final fue el que generó mayor cantidad de biomasa, ya que se presentó un valor atípico debido a que el callo nunca se disgregó (fig. 19).

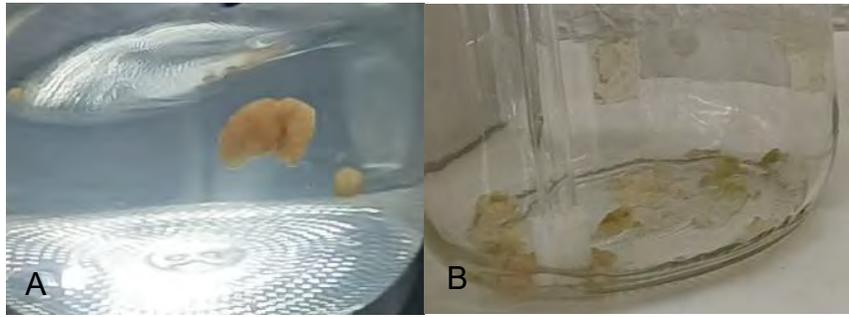


Figura 19. Callo de *A. guingola* en medio líquido con agitación (A) y en biorreactor (B); se puede apreciar la disgregación del tejido calloso cultivado en biorreactores.

7.3. EVALUACIÓN DE INDUCCIÓN DEL TEJIDO CALLOSO UTILIZANDO DIFERENTES SISTEMAS DE CULTIVO

Se realizó un experimento para evaluar la factibilidad de generar tejido calloso en un sistema distinto al cultivo en medio semisólido.

En *A. potatorum* solo se logró inducir tejido calloso en medio semisólido con renovación periódica de medio de cultivo. El peso promedio del tejido calloso obtenido fue de 0.055 g. En *A. guingola* se logró inducir tejido calloso en los tres sistemas (tabla 7).

En medio líquido con agitación con renovación periódica de medio de cultivo se indujo tejido calloso en el 100% de los explantes, y sin renovación periódica de medio de cultivo solo en un 50% de los explantes. En semisólido se tuvieron porcentajes de inducción del 50% y 66.7% de los explante. En ambos sistemas, medio semisólido o medio líquido en agitación, el peso promedio de los callos fue mejor cuando se renovó el medio de cultivo.

Tabla 7. Porcentaje de inducción de tejido caloso en los diferentes sistemas de cultivo en *A. guiengola* junto con el peso promedio.

Sistema	Porcentaje de brotes que generaron callo (%)	Peso promedio de los callos (g)
Biorreactor con renovación de medio de cultivo	33.3	0.03
Biorreactor sin renovación de medio de cultivo	0	0
Medio líquido con agitación con renovación de medio de cultivo	100	0.04
Medio líquido con agitación sin renovación de medio de cultivo	50.0	0.02
Semisólido con renovación de medio de cultivo	66.7	0.06
Semisólido sin renovación de medio de cultivo	50.0	0.01

En el caso del medio semisólido, el callo generado empezó a oxidarse en un lapso de 15 días, por lo cual no se obtuvo una cantidad de biomasa arriba de 1 g como en los experimentos anteriores.

7.4. DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE SAPONINAS POR CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA

Para la extracción de saponinas se emplearon las muestras de tejido caloso obtenidas de los tres diferentes sistemas de crecimiento vegetal y se dividió el tejido en dos categorías: si se realizó o no renovación periódica del medio de cultivo.

Se obtuvieron extractos de 12 muestras, con los que se realizó la cromatografía en capa fina. Se observan diferentes bandas en la placa cromatográfica reveladas con el reactivo anisaldehído (fig. 20). Debido a la alta concentración de la muestra 1 (hoja de *A. potatorum*) el concentrado se barrió hasta llegar al límite.

Debido a la presencia de diferentes tipos de saponinas, en algunas muestras se alcanzan a observar diferentes bandas. Las bandas del estándar de sapogeninas de *Quillaja* sp., y sus factores de retención calculados presentan similitud con las correspondientes a las muestras analizadas (fig.20).

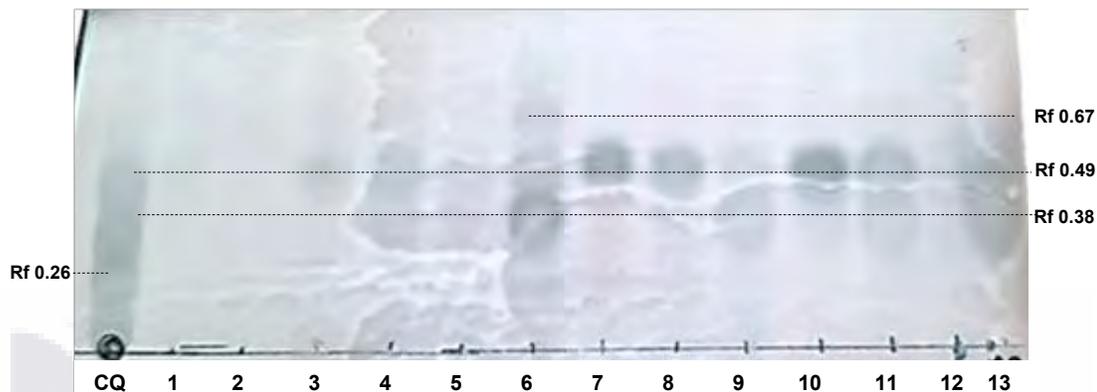


Figura 20. Cromatografía en capa fina en fase normal con una fase móvil de cloroformo, ácido acético glacial, metanol y agua (64:32:12:8 relación volumen/volumen) y factores de retención calculados (Rf). Control de saponinas de *Quillaja* sp. (CQ); Extractos de tejidos de *A. potatozum*: hoja de planta adulta (1), BIT-CR en metanol (2), BIT-CR en agua (3), BIT-SR (4), Medio líquido en agitación-CR (5), Medio líquido en agitación-SR (6), Semisólido-CR (7); Extractos de tejidos de *A. guingola*: hoja de planta adulta (8), Medio líquido en agitación-SR (9), Medio líquido en agitación-CR (10), BIT-SR (11), BIT-CR (12), Semisólido (13).

Tabla 8. Factor de retención de las bandas en la cromatografía de capa fina.

Muestra		Factor de retención			
		1	2	3	4
Control	Saponinas de <i>Quillaja</i> Sp.		0.49	0.38	0.26
	Hoja de planta - <i>ex vitro</i>		0.46		
<i>A. potatozum</i>	Biorreactor con renovación de medio de cultivo		0.49		
	Biorreactor con renovación de medio de cultivo*		0.49	0.38	
	Biorreactor sin renovación de medio de cultivo		0.49	0.38	
	Medio líquido con agitación con renovación de medio de cultivo		0.46	0.36	
	Medio líquido con agitación sin renovación de medio de cultivo	0.67	0.54	0.36	0.24
	Semisólido con renovación		0.54		
	Semisólido		0.54		
<i>A. guingola</i>	Hoja de planta - <i>ex vitro</i>		0.49		
	Medio líquido con agitación sin renovación de medio de cultivo		0.51	0.38	
	Medio líquido con agitación con renovación de medio de cultivo		0.54		
	Biorreactor sin renovación de medio de cultivo		0.49	0.41	
	Biorreactor con renovación de medio de cultivo		0.49		
	Semisólido combinado		0.49	0.36	
	Semisólido		0.49		

7.5. CUANTIFICACION DE SAPONINAS POR ESPECTROFOTOMETRÍA

Mediante espectrofotometría se determinó el contenido de saponinas en los extractos de ambas especies, empleando una curva de calibración con las concentraciones de 0 a 0.01 mg/mL con una R2 de 0.9 elaborada con el estándar de saponinas de *Quillaja sp.* (fig. 21). Con la ecuación $y = 6.5052 \cdot x + 0.1233$ y las lecturas de absorbancia de los extractos, obtenidas por triplicado, se determinó el contenido de saponinas y se realizó el análisis estadístico (tabla 9).



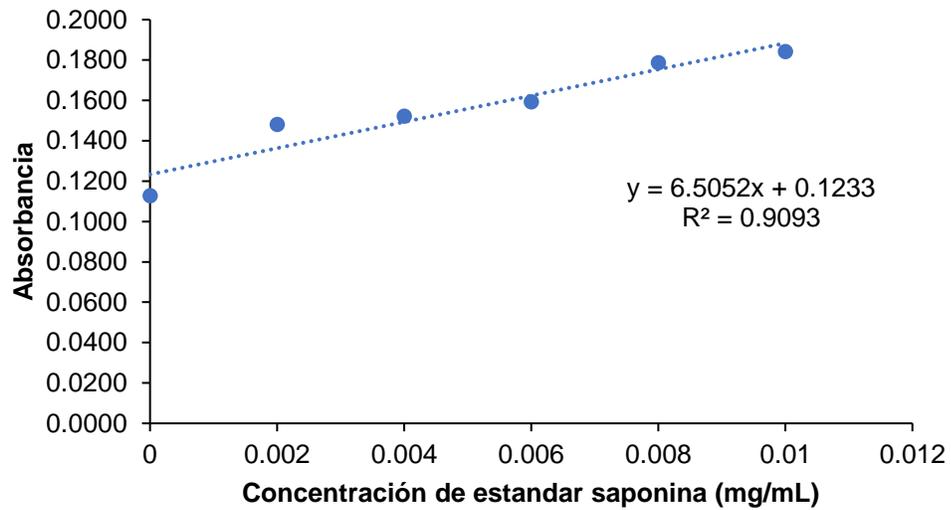


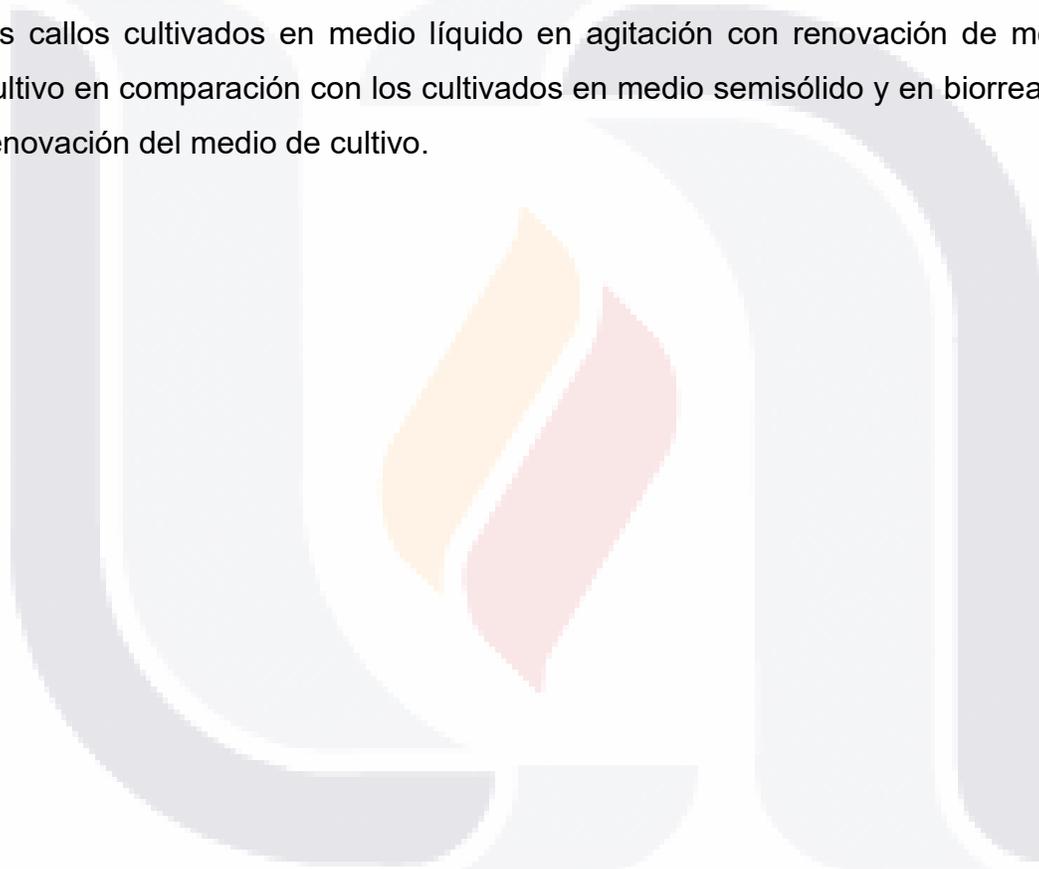
Figura 21. Curva de calibración de saponina *Quillaja* sp. para cálculos de concentración de saponinas en las muestras a evaluar

Tabla 9. Contenido de saponinas en tejido caloso de *A. potatozum* y *A. guiengola* en diferentes sistemas de cultivo.

Especie	Tratamiento	Contenido de saponinas (mg/g de extracto)
<i>A. potatozum</i>	Hoja de planta - <i>ex vitro</i>	40.68 ± 6.01 ^a
	Semisólido con renovación de medio de cultivo	2.57 ± 0.29 ^b
	Medio líquido con agitación con renovación de medio de cultivo	1.41 ± 1.64 ^b
	Medio líquido con agitación sin renovación de medio de cultivo	2.53 ± 0.31 ^b
	Biorreactor sin renovación de medio de cultivo	1.80 ± 0.88 ^b
<i>A. guiengola</i>	Hoja de planta - <i>ex vitro</i>	4.17 ± 0.18 ^a
	Semisólido con renovación de medio de cultivo	1.21 ± 0.83 ^{bc}
	Medio líquido con agitación con renovación de medio de cultivo	2.69 ± 0.31 ^{ab}
	Medio líquido con agitación sin renovación de medio de cultivo	2.50 ± 0.64 ^{ac}
	Biorreactor con renovación de medio de cultivo	2.65 ± 0.58 ^{ac}
	Biorreactor sin renovación de medio de cultivo	1.01 ± 0.20 ^c

La concentración de saponinas de la hoja de un ejemplar *ex vitro* de *A. potatozum* en suelo fue al menos 10 veces mayor a la concentración de saponinas en tejido calloso de cualquiera de los sistemas de cultivo evaluados. No hubo diferencias significativas en la concentración de saponinas de callos de los diferentes sistemas de cultivo con y sin renovación de medio.

Por otro lado, en *A. guineola* la concentración de saponinas en la hoja de una planta *ex vitro* tuvo una diferencia significativa en la concentración de saponinas de los callos cultivados en medio líquido en agitación con renovación de medio de cultivo en comparación con los cultivados en medio semisólido y en biorreactor sin renovación del medio de cultivo.



7.6. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE FRUCTANOS POR KIT MEGAZYME

La hoja de *A. potatorum* presentó mayor cantidad de fructanos (10%) que el tejido calloso en cualquiera de los sistemas de cultivo, que se encuentran entre 0.7 % y 1.8 % . En cambio, en *A. guiengola* no hubo una diferencia significativa en la cantidad de fructanos en la hoja del individuo *ex vitro* y los callos cultivados *in vitro* (tabla 10).

Tabla 10. Contenido de fructanos en hojas y tejido calloso de *A. potatorum* y *A. guiengola* en diferentes sistemas de cultivo.

Especie	Tratamiento	Contenido de fructanos (% de peso de fructanos/peso de tejido)
<i>A. potatorum</i>	Hoja de planta - <i>ex vitro</i>	10.32 ± 1.43 ^a
	Semisólido con renovación de medio de cultivo	1.81 ± 0.06 ^b
	Medio líquido con agitación con renovación de medio de cultivo	0.98 ± 0.09 ^b
	Medio líquido con agitación sin renovación de medio de cultivo	0.70 ± 0.13 ^b
	Biorreactor sin renovación de medio de cultivo	1.37 ± 0.59 ^b
	Biorreactor sin renovación de medio de cultivo	0.75 ± 0.06 ^b
<i>A. guiengola</i>	Hoja de planta - <i>ex vitro</i>	2.17 ± 0.15 ^a
	Semisólido con renovación de medio de cultivo	4.45 ± 2.70 ^a
	Medio líquido con agitación con renovación de medio de cultivo	0.43 ± 0.13 ^a
	Medio líquido con agitación sin renovación de medio de cultivo	2.10 ± 0.44 ^a
	Biorreactor con renovación de medio de cultivo	0.32 ± 0.02 ^a
	Biorreactor sin renovación de medio de cultivo	2.43 ± 0.25 ^a

8. DISCUSIÓN

Inducción de tejido calloso con diferentes concentraciones de auxina/citocinina

Diversos estudios han demostrado que la concentración y balance de auxinas/citocininas son determinantes en la inducción y proliferación de tejido calloso, ya que modulan la expresión de genes asociados a la dediferenciación celular y división mitótica (Dhir et al., 2014; Fehér, 2019; Reyes-Zambrano et al., 2016; Smith, 2013). En algunas especies se ha reportado que la adición de auxinas al medio de cultivo es suficiente para inducir tejido calloso; pero en general, se suelen utilizar combinaciones de auxinas y citocininas para inducir la formación de tejido calloso, como reportan algunos estudios en agaves donde se genera tejido calloso principalmente para embriogénesis somática (Ángeles Vázquez et al., 2023; Espino et al., 2018; González-Oramas et al., 2002). Dentro de las auxinas, ha demostrado ser particularmente eficaz el 2,4-D, considerado uno de los inductores más eficientes en la formación de callo para embriogénesis en agaves (Dhir et al., 2014; Reyes-Zambrano et al., 2016). En estudios para propagación por embriogénesis de diferentes especies de agaves se ha reportado que la inducción de tejido calloso depende fundamentalmente de la aplicación exógena de auxinas y citocininas (Arzate-Fernández & Mejía-Franco, 2011; Portillo & Santacruz-Ruvalcaba, 2006).

Esta eficacia se debe a su capacidad para estimular la división celular e influir de forma indirecta en la regulación del ciclo celular. Lo cual se logra mediante la activación de la expresión de ciclinas, lo que a su vez desencadena la acción de quinasas necesarias durante la fase de crecimiento, promoviendo el inicio de un nuevo ciclo celular (Sánchez-Calvo & Alvarenga-Venutolo, 2015).

En este estudio, la ausencia de citocininas en el medio de cultivo condujo a una formación de callo muy limitada en *A. potatorum* o incluso nula como en el caso de *A. guiengola*, lo que demuestra la necesidad de estas auxinas/citocininas en el proceso de callogénesis en las especies estudiadas.

En *A. potatorum*, la concentración de 2 mg/L de 2,4-D y 3 mg/L de BA indujo formación de tejido calloso en el mayor porcentaje de explantes (75%), por lo que se comprueba que en esta especie las concentraciones de auxinas y citocininas equilibradas favorecen la inducción del callo. En cambio, en *A. guiengola*, esta misma combinación de auxinas/citocininas resultó en un porcentaje de inducción mucho más bajo (20%); las mejores concentraciones para inducción de tejido calloso en *A. guiengola* fueron 1 mg/L de 2,4-D con 3 mg/L de BA, y 3 mg/L de ANA con 7 mg/L de BA, en ambas se tuvo una inducción de callo en el 85% de los explantes.

Esto sugiere diferencias en la sensibilidad de cada especie a los auxinas/citocininas o en la regulación de rutas metabólicas clave (Reyes-Zambrano et al., 2016). Tales diferencias podrían estar relacionadas a que la afinidad a los auxinas/citocininas por los receptores hormonales varía entre especies, lo cual incide en la formación del tejido calloso (Ikeuchi et al., 2013) y otras respuestas morfogénicas como lo son hiperhidratación, necrosis, generación de brote y de raíz.

Sin embargo, aunque las concentraciones bajas o moderadas de 2,4-D tienen efectos positivos, se ha reportado que concentraciones altas de auxinas/citocininas pueden inhibir o afectar negativamente la formación de tejido calloso (Reyes-Zambrano et al., 2016). Se ha reportado que altas concentraciones de 2,4-D inducen necrosis tisular, probablemente por la generación de especies reactivas de oxígeno (Özkul et al., 2016); en otros casos se presenta hiperhidratación (Polivanova & Bedarev, 2022), como se observó en *A. guiengola*.

En suma, se observó que para *A. guiengola* la combinación de diferentes citocininas y auxinas genera una buena respuesta en la inducción de tejido calloso; no hay rizogénesis ni formación de brotes, lo cual es positivo en este caso, pues justamente se busca generar callo, entonces no es deseable la organogénesis. Sin embargo, se observó una fuerte tendencia a la hiperhidratación.

Mientras que en *A. potatorum* la hiperhidratación fue muy poco frecuente, en cambio, si se presentó necrosis en todos los tratamientos, incluso el control.

Evaluación de crecimiento de tejido calloso utilizando diferentes sistemas de cultivo

Diversos estudios han demostrado la eficiencia de los BIT para la micropropagación, principalmente por permitir la obtención de una mayor cantidad de biomasa a menor costo (Chávez-Ortiz & Rodríguez-Ortega, 2022; Ramos-Castellá et al., 2014). Estos sistemas permiten una mejor difusión de nutrientes y gases hacia los tejidos vegetales, lo cual puede ser favorable para la proliferación de estructuras como el callo o los brotes (Murthy et al., 2014). Por ello, se decidió evaluar la conveniencia de usar el sistema de biorreactores de inmersión temporal para el crecimiento de tejido calloso, en comparación con otros dos sistemas: el uso de medio semisólido, y el uso de medio líquido en inmersión permanente, agregando las variable de la renovación del medio de cultivo de forma periódica.

En *A. potatozum*, en los tres sistemas de cultivo se observó que la renovación del medio favoreció significativamente el crecimiento de la biomasa. Este comportamiento se explica porque, sin la renovación del medio, los nutrientes se agotan progresivamente y pueden acumularse compuestos tóxicos generados por los propios tejidos vegetales, lo cual limita el crecimiento celular; en cambio, la disponibilidad constante de nutrientes, la eliminación de compuestos excretados en el medio y la oxigenación adecuada promueven un crecimiento más activo del tejido (Murthy et al., 2014).

La cinética de crecimiento del tejido calloso en *A. potatozum* utilizando biorreactores mostró un menor incremento de biomasa en comparación con el medio semisólido y el medio líquido en agitación, acompañado de un mayor porcentaje de necrosis. Este comportamiento puede atribuirse a múltiples factores, como el daño mecánico ocasionado por el flujo de aire, el tiempo de inmersión inadecuado que puede provocar hipoxia o estrés hídrico, y la disgregación del tejido causada por el movimiento mecánico. La sensibilidad del callo a estas condiciones puede estar relacionada con su grado de diferenciación y su estructura anatómica, que lo hace

más susceptible al estrés físico (Ikeuchi et al, 2013). Se sugiere evaluar sistemas de renovación automatizados o menos invasivos para reducir este impacto

En *A. guiangola* el crecimiento del tejido calloso tuvo un comportamiento diferente, ya que, en los días 15 y 30, empezó a decrecer en los biorreactores (tanto con y sin renovación del medio), siendo ligeramente mayor el decremento cuando no había renovación del medio de cultivo. Esto puede deberse a varios factores como el daño mecánico y la disgregación de tejido, así como a la falta disponibilidad de nutrientes debido a los periodos de inmersión (cada 4hrs). En semisólido y agitación, el decrecimiento fue a los días 45 y 60. Se observó además que el crecimiento es similar tanto con renovación como sin renovación de medio de cultivo, a excepción de medio líquido en agitación, donde el callo no se disgregó y estuvo en constante contacto con los nutrientes, por lo que se obtuvo un mayor crecimiento.

En ambas especies, la renovación del medio de cultivo fue un factor determinante para el crecimiento del tejido calloso. Sin embargo, se observó en *A. potatozum* una respuesta significativamente superior, acumulando mayor biomasa y teniendo un mejor rendimiento cuando se renovaba el medio de cultivo. Por otro lado, *A. guiangola* presentó una disminución de biomasa del tejido en ausencia de renovación, lo que sugiere estrés fisiológico que puede llevar a necrosis. Estas diferencias en las respuestas entre las dos especies podrían deberse a variaciones en la capacidad metabólica, tolerancia a la acumulación de metabolitos secundarios tóxicos y eficiencia en la asimilación de nutrientes (Cañal et al., 2001).

Cabe mencionar que en este estudio se presentaron varias complicaciones al manejar el tejido calloso. Una de ellas fue la necesidad de adaptar un filtro que impidiera que el tejido disgregado se desplazara del recipiente que contenía el tejido vegetal hacia el recipiente que contenía el medio de cultivo líquido. Este problema es común en tejidos friables, ya que su fragmentación puede interferir con la eficiencia del sistema, obstruir los tubos o alterar el volumen efectivo de inmersión.

Inducción de callo en diferentes sistemas de crecimiento

En *A. potatozum* no se presentó inducción de tejido calloso en medio líquido con agitación ni en biorreactores. Para esta especie lo más adecuado es un protocolo en dos pasos. Primero inducir la formación de tejido calloso en medio semisólido y segundo, transferir el callo a medio líquido con agitación para su crecimiento óptimo.

En cambio, en *A. guiengola* se obtuvo un 100% de inducción más alto cuando los explantes se colocaron en medio líquido con agitación y con renovación del medio de cultivo. En contraste, en medio semisólido con renovación del medio se obtuvo un 67%, y en el biorreactor, solo un 33%. Este comportamiento se puede asociar a que el callo empieza a generarse en la zona donde se cortó el explante, ya que está en contacto directo con el medio de cultivo (Smith, 2013). Además, la disponibilidad continua de nutrientes (que se logra con la renovación del medio de cultivo) y la mayor área de contacto del explante con el medio (gracias al uso de medio líquido) favorecen los procesos de dediferenciación y proliferación celular.

Evaluación cualitativa de saponinas

El estándar de saponina de *Quillaja* sp. contenía diferentes sapogeninas, las cuales se observaron en la cromatografía en capa fina, lo cual es consistente con la complejidad estructural de este tipo de compuestos. Esta diversidad estructural ha sido ampliamente documentada (Góngora Chi et al., 2022) y se traduce en la aparición de varias señales en análisis cromatográficos cuando se emplean extractos crudos o estándares no purificados.

En la cromatografía de capa fina, en la muestra de callo de *A. potatozum* cultivado en medio líquido en agitación, sin renovación de medio de cultivo, se observó una banda que no se corresponde con ninguna del estándar, lo que sugiere que se trata de una saponina distinta a las presentes en *Quillaja* sp. Esto es congruente con una característica relevante de los metabolitos secundarios, que suelen ser sintetizados por unas pocas especies cercanamente emparentadas, en algunos casos incluso por una sola especie. Por otra parte, se ha reportado biosíntesis diferencial de saponinas inducida por condiciones del cultivo *in vitro*, como el tipo

de medio, la concentración hormonal, el estrés osmótico o el origen genético del explante (Góngora Chi et al., 2022), fenómeno particularmente relevante en tejidos no diferenciados como el callo, lo que podría explicar que este compuesto apareciera solo en una muestra de callo de *A. potatozum*, y no en callos cultivados en otras condiciones ni en la planta adulta.

El factor de retención (Rf) permitió identificar las bandas con mayor concentración relativa en las muestras. La intensidad del color verde observado en una de las bandas cromatográficas fue interpretada como indicativa de saponinas de tipo esterooidal, basándose en la colorimetría obtenida tras revelado con p-anisaldehído. Esta observación coincide con lo reportado donde se han caracterizado saponinas esteroidales en especies vegetales cultivadas *in vitro* (Pereo-Vega, 2015).

Cabe señalar que la producción de metabolitos secundarios, como las saponinas, en tejidos cultivados *in vitro* puede estar influida tanto por factores internos (como la variabilidad genética residual entre explantes) como por factores externos (como el tipo de regulador de crecimiento, la duración del cultivo y la presencia de elicitores). Por ello, la aparición de múltiples bandas en la cromatografía de capa fina podría también reflejar una respuesta adaptativa del tejido calloso ante el entorno artificial del cultivo, activando rutas biosintéticas particulares.

Este tipo de análisis es fundamental para evaluar el potencial del cultivo *in vitro* no solo en la propagación vegetal, sino también como plataforma biotecnológica para la producción de diferentes compuestos de interés.

Cuantificación de saponinas

En *A. potatozum* la concentración promedio de saponinas en el tejido calloso obtenido a partir de los tres sistemas de cultivo fue considerablemente menor en comparación con el contenido registrado en las hojas de una planta adulta. Este resultado es consistente con lo reportado en la literatura, ya que las saponinas cumplen funciones clave en los mecanismos de defensa de las plantas, particularmente como agentes antimicrobianos y repelentes de herbívoros (Alcázar-Valle, 2016; Hernández et al., 2005). Su concentración, por tanto, está

estrechamente ligada a factores ecológicos y fisiológicos, como las condiciones de crecimiento, la exposición a estrés ambiental, y la madurez de la planta.

En este estudio, la hoja de *A. potatorum* utilizada como control fue recolectada de una planta adulta cultivada al aire libre, en condiciones mínimas de manejo (jardín de la Universidad Autónoma de Aguascalientes). Este entorno, al ser más cercano a un hábitat natural y presentar mayor exposición a estímulos externos, puede inducir una mayor acumulación de metabolitos secundarios como respuesta adaptativa. Además, la edad avanzada de la planta representa otro factor importante, ya que muchas saponinas se acumulan en mayor cantidad conforme la planta madura, alcanzando niveles óptimos en órganos diferenciados como las hojas.

El tejido calloso, al tratarse de un tejido no diferenciado cultivado *in vitro* en condiciones altamente controladas y con mínima exposición a factores de estrés, tiende a tener una biosíntesis reducida de metabolitos secundarios (Murphy, 2003; Ozyigit et al., 2023).

El contenido de saponinas en la hoja de *A. guiengola* fue similar al de la mayoría de las muestras de tejido calloso, excepto en aquellas cultivadas en biorreactores sin renovación del medio y en medio semisólido, donde se observaron niveles aún más bajos. En el caso de los biorreactores sin renovación, factores como la turbulencia excesiva, la acumulación de metabolitos tóxicos y la disminución progresiva de nutrientes tal vez generaron un entorno desfavorable para la biosíntesis de metabolitos secundarios, además de favorecer la necrosis del tejido. Asimismo, el suministro excesivo de oxígeno puede tener efectos contraproducentes, ya que una alta oxigenación puede interferir con la disponibilidad y absorción de nutrientes esenciales (Georgiev et al., 2009; Murthy et al., 2014).

Cabe señalar que el contenido de saponinas en la hoja de *A. guiengola* fue considerablemente menor en comparación con el ejemplar de *A. potatorum* cultivado al aire libre. La planta de la cual se obtuvo la muestra se encontraba en un ambiente interior, cultivada en maceta y con un manejo más controlado, además de

ser más joven. Estas condiciones, al no representar un entorno estresante para la planta, probablemente no estimularon significativamente la producción de saponinas. Por otra parte, el contenido de saponinas varía entre las distintas especies de agaves (Alcázar-Valle, 2016; Monterrosas-Brisson et al., 2013; Sidana et al., 2016).

Por otro lado, los medios líquidos con agitación generan un estrés mecánico constante sobre las células, el cual, en niveles moderados, puede actuar como un estímulo para la producción de metabolitos secundarios, al activar vías de defensa celular (Murthy et al., 2014) . Esto explica por qué los sistemas con agitación y renovación del medio mostraron mejores resultados en cuanto a la acumulación de saponinas: estos sistemas aseguran una buena oxigenación, disponibilidad constante de nutrientes, y eliminación de compuestos inhibitorios.

En cambio, una mala optimización de los biorreactores, caracterizada por tiempos de inmersión inadecuados, daño mecánico excesivo, alta oxigenación y falta de renovación del medio, puede inducir un estrés perjudicial, limitando la viabilidad del tejido y reduciendo la producción de compuestos bioactivos. De forma similar, el medio semisólido mostró limitaciones importantes en la difusión de nutrientes y gases, lo que afectó negativamente la síntesis de saponinas.

Extracción y cuantificación de fructanos.

En *A. potatorum* el porcentaje de fructanos en el tejido calloso obtenido a partir de los tres sistemas de cultivo fue considerablemente menor en comparación con el contenido registrado en las hojas de una planta adulta. Este resultado coincide con la literatura, ya que la cantidad de fructanos depende de la etapa de vida del agave, y se va incrementando con la edad de la planta (Márquez-López et al., 2022), hasta que alcanza el momento nutricional, metabólico y fisiológico para comenzar el proceso de floración. El ejemplar de *A. potatorum* del que se tomó la hoja ya alcanzó la talla definitiva y aparentemente en un corto plazo comenzará su floración.

En *A. guiengola* se tuvo un comportamiento diferente ya que no hubo diferencia estadística significativa entre el contenido de fructanos del tejido calloso y la planta

en suelo, teniendo un porcentaje de contenido similar. El ejemplar del que se tomó el tejido es una planta relativamente joven (5-6 años) cultivada en maceta, por lo que no ha alcanzado la talla adulta. De ahí la diferencia en el porcentaje de fructanos en las hojas de plantas en suelo de *A. guineola* y *A. potatorum*.



9. CONCLUSIONES

En *A. guiengola* dos tratamientos indujeron formación de tejido calloso en más del 80% de los explantes, fueron las combinaciones de 1 mg/L 2,4-D con 3 mg/L BA, y 3 mg/L ANA con 7 mg/L BA. Para inducción y crecimiento de tejido calloso de *A. guiengola* el sistema más apropiado es el uso de medio líquido en agitación, pues en estas condiciones se logró inducir callogénesis en el 100% de los explantes, y se presentó un mayor crecimiento del tejido calloso.

El mejor tratamiento para la inducción de tejido calloso para *A. potatozum* fue la combinación de 3 mg/L BA y 2 mg/L de 2,4-D.

El medio líquido con agitación propició un mayor crecimiento de tejido calloso en *A. potatozum*. La renovación periódica del medio de cultivo si fue efectivo para el crecimiento de biomasa del tejido calloso en todos los sistemas de cultivo.

Los biorreactores no resultaron un sistema conveniente para la inducción ni para el crecimiento del tejido calloso en ninguna de las especies estudiadas debido a la disgregación del tejido por el efecto cizalla, causando después la necrosis del tejido.

El tejido calloso de ambas especies mantuvo la capacidad metabólica para sintetizar tanto saponinas como fructanos.

No hubo una diferencia significativa en el contenido de fructanos del tejido calloso de *A. potatozum* y *A. guiengola* cultivado en los diferentes sistemas; tampoco hubo una diferencia significativa en la concentración de saponinas del tejido calloso de *A. potatozum* cultivado en los diferentes sistemas.

El sistema de cultivo en *A. guiengola* tuvo efecto en la concentración de saponinas en el tejido calloso; en el sistema de cultivo de medio líquido con agitación y con renovación del medio de cultivo se obtuvo una mayor concentración de saponinas a comparación de los otros sistemas. Se propone que en investigaciones posteriores se explore el uso de elicitores para inducir una mayor producción tanto de saponinas como fructanos en el tejido calloso.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Abdalla, N., El-Ramady, H., Seliem, M. K., El-Mahrouk, M. E., Taha, N., Bayoumi, Y., Shalaby, T. A., & Dobránszki, J. (2022). An Academic and Technical Overview on Plant Micropropagation Challenges. *Horticulturae*, 8(8), 677. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8080677>
- Abraham, P. E., Yin, H., Borland, A. M., Weighill, D., Lim, S. D., De Paoli, H. C., Engle, N., Jones, P. C., Agh, R., Weston, D. J., Wullschleger, S. D., Tschaplinski, T., Jacobson, D., Cushman, J. C., Hettich, R. L., Tuskan, G. A., & Yang, X. (2016). Transcript, protein and metabolite temporal dynamics in the CAM plant Agave. *Nature Plants*, 2(12), 16178. <https://doi.org/10.1038/nplants.2016.178>
- Alcázar-Valle, E. M. (2016). *Caracterización de saponinas de Agave durangensis y Agave salmiana, y su efecto en la pared y membrana celular de Kluyveromyces marxianus y Saccharomyces cerevisiae* [Tesis de doctorado]. CIATEJ.
- Alducin-Martínez, C., Ruiz Mondragón, K. Y., Jiménez-Barrón, O., Aguirre-Planter, E., Gasca-Pineda, J., Eguiarte, L. E., & Medellín, R. A. (2022). Uses, Knowledge and Extinction Risk Faced by Agave Species in Mexico. *Plants*, 12(1), 124. <https://doi.org/10.3390/plants12010124>
- Almazán-Morales, A., Moreno-Godínez, Ma. E., Hernández-Castro, E., Vázquez-Villamar, M., Mora-Aguilera, J. A., Cabrera-Huerta, E., & Alvarez-Fitz, P. (2022). Phytochemical profile and in vitro activity of Agave angustifolia and A. cupreata extracts against phytopathogenic fungi. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, 40(2). <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2202-6>
- Alvarado-Loza, E., Orozco-Hernández, R., Ruíz-García, I., Paredes-Ibarra, F., & Fuentes-Hernández, V. (2017). El 2% de inulina de agave en el alimento del conejo afecta positivamente la digestibilidad y microbiota intestinal. *Abanico Veterinario*, 7(3). <https://doi.org/10.21929/abavet2017.73.6>

Álvarez- Sánchez, M. E., Velázquez-Mendoza, J., Maldonado-Torres, R., Almaguer-Vargas, G., & Solano-Agama, A. L. (2010). Diagnóstico de la fertilidad y requerimiento de cal de suelos cultivados con agave azul (*Agave tequilana weber*). *Terra Latinoamericana*, 28(3), 287–293. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57316064012>

Anaya-Dyck, J. M., Ochoa-Meza, A., Martínez-Heredia, D., & Moreno-Salazar, S. F. (2010). *Organogénesis indirecta de Agave Parviflora, una especie en peligro y con alto potencial económico*.

Andrade, J. L., Barrera, E. de la, Reyes García, C., Ricalde, M. F., Vargas Soto, G., & 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. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57708102>

Ángeles Vázquez, B. V., Álvarez Cervantes, J., Tovar Jiménez, X., & Rodríguez Garay, B. (2023). Plant regeneration from indirect somatic embryogenesis of *Agave salmiana* otto ex Salm-Dyck subsp. *salmiana* using zygotic embryo obtained by in-casa pollination as explants. *Polibotánica*, 0(56). <https://doi.org/10.18387/polibotanica.56.9>

Arredondo Ramírez, C. A., Arellano Ostoa, G., Ayala de la Vega, J., & Aguilar Juárez, I. (2019). Propuesta de diseño y automatización de biorreactor para sistemas de inmersión temporal / Bioreactor Design and Automation Proposal for Temporary Immersion Systems. *CIBA Revista Iberoamericana de las Ciencias Biológicas y Agropecuarias*, 8(15), 72–88. <https://doi.org/10.23913/ciba.v8i15.88>

Arzate-Fernández, A., & Mejía-Franco, R. (2011). Capacidad Embriogénica de callos inducidos en ejes embrionarios cigóticos de *Agave angustifolia* Haw. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 34, 101–106. <https://doi.org/10.35196/rfm.2011.2.101>

- Ávila-Fernández, Á., Galicia-Lagunas, N., Rodríguez-Alegría, M. E., Olvera, C., & López-Munguía, A. (2011). Production of functional oligosaccharides through limited acid hydrolysis of agave fructans. *Food Chemistry*, *129*(2), 380–386. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.04.088>
- Bautista-Montes, E., Hernández-Soriano, L., & Simpson, J. (2022). Advances in the Micropropagation and Genetic Transformation of Agave Species. *Plants*, *11*(13), 1757. <https://doi.org/10.3390/plants11131757>
- Bello-Bello, J. J., Schettino-Salomón, S., Ortega-Espinoza, J., & Spinoso-Castillo, J. L. (2021). A temporary immersion system for mass micropropagation of pitahaya (*Hylocereus undatus*). *3 Biotech*, *11*(10), 437. <https://doi.org/10.1007/s13205-021-02984-5>
- Bhatia, S. (2015). Chapter 2 - Plant Tissue Culture. En S. Bhatia, K. Sharma, R. Dahiya, & T. Bera (Eds.), *Modern Applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences* (pp. 31–107). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802221-4.00002-9>
- Caamal-Velázquez, J. H., Pérez-de-León, A. V., Alamilla-Magaña, J. C., Tejeda-Sartorius, O., & Chanatasig-Vaca, C. I. (2022). Cost analysis of Agave potatorum Zucc, produced in vitro by direct organogenesis. *Agro Productividad*. <https://doi.org/10.32854/agrop.v15i10.2228>
- Camacho, C., M.Sc. Yunel Pérez-Hernández, Valdivia Avila, A., Rubio Fontanills, Y., & C. Leticia Fuentes-Alfonso, D. (2020). *Evaluación fitoquímica, antibacteriana y molusquicida de extractos de hojas de Agave spp.* 32, 390–405.
- Cañal, J. M., Rodríguez, R., Fernández, B., Sánchez-Tames, R., & Majada, J. P. (2001). Fisiología del cultivo in vitro. *Biotecnología Vegetal*, *1*(3–9).
- Chávez-Ortiz, L. I., Morales-Domínguez, J. F., Rodríguez-Sahagún, A., & Pérez-Molphe-Balch, E. (2021). In Vitro Propagation of Agave guiengola Gentry Using Semisolid

Medium and Temporary Immersion Bioreactors. *Phyton*, 90(3), 1003–1013.
<https://doi.org/10.32604/phyton.2021.012862>

Chávez-Ortiz, L. I., & Rodríguez-Ortega, M. E. (2022). Propagación de plantas en biorreactores de inmersión temporal. En J. F. Morales Domínguez (Ed.), *Algunas aplicaciones biotecnológicas en plantas y microalgas* (Primera).

CONABIO. (2021). *Diversidad biológica Magueyes: Biodiversidad Mexicana*. Biodiversidad Mexicana.
<https://www.biodiversidad.gob.mx/diversidad/alimentos/magueyes/diversidad-magueyes>

Correa-Hernández, L., Baltazar-Bernal, O., Sánchez-Páez, R., & Bello-Bello, J. J. (2022). In vitro multiplication of agave tobala (*Agave potatorum* Zucc.) using Ebb-and-Flow bioreactor. *South African Journal of Botany*, 147, 670–677.
<https://doi.org/10.1016/j.sajb.2022.03.009>

Cruz-Cárdenas, C. I. (2015). *Estudio de fructanos en Musa* [Tesis de doctorado]. Centro de Investigación Científica de Yucatán.

Dabuwar Benjamin, E., Adamu Ishaku, G., Andrew Peingurta, F., & Samuel Afolabi, A. (2019). Callus Culture for the Production of Therapeutic Compounds. *American Journal of Plant Biology*, 4(4), 76.
<https://doi.org/10.11648/j.ajpb.20190404.14>

De la Torre, L., Cummins, I., & Logan-Hines, E. (2018). Agave americana and Furcraea andina: Key Species to Andean Cultures in Ecuador. *Botanical Sciences*, 96(2), 246–266. <https://doi.org/10.17129/botsci.1813>

Delgado-Alvarado, E. A., Ávila-Reyes, J. A., Torres-Ricario, R., Naranjo-Jiménez, N., Chaidez-Ayala, A. I., & Almaraz-Abarca, N. (2021). Caracterización fitoquímica de *Agave shrevei* Gentry. *e-CUCBA*, 8(16), 56–59.
<https://doi.org/10.32870/ecucba.vi16.200>

- Dhir, R., Shekhawat, G. S., & Alam, A. (2014). Improved Protocol for Somatic Embryogenesis and Calcium Alginate Encapsulation in *Anethum graveolens* L.: A Medicinal Herb. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 173(8), 2267–2278. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-1032-x>
- Durán, A. G., Benito, J., Macías, F. A., & Simonet, A. M. (2021). Agave steroidal saponins as potential bioherbicides. *Agronomy*, 11(12). <https://doi.org/10.3390/agronomy11122404>
- Efferth, T. (2019). Biotechnology Applications of Plant Callus Cultures. *Engineering*, 5(1), 50–59. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.eng.2018.11.006>
- Eguiarte, L. E., Jiménez Barrón, O. A., Aguirre-Planter, E., Scheinvar, E., Gámez, N., Gasca-Pineda, J., Castellanos-Morales, G., Moreno-Letelier, A., & Souza, V. (2021). Evolutionary ecology of Agave: distribution patterns, phylogeny, and coevolution (an homage to Howard S. Gentry). *American Journal of Botany*, 108(2), 216–235. <https://doi.org/10.1002/ajb2.1609>
- Espino, A. A., Sánchez-Mendoza, L., Dimas-Estrada, H. E., Ramirez-Alvarado, D., & Gomez-Leyva, J. (2018). Evaluación de dos auxinas en la inducción de callo embriogénico en vitroplántulas de Agave tequilana weber variedad azul. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 21(2). <https://doi.org/10.56369/tsaes.2342>
- Espinosa-Leal, C. A., Puente-Garza, C. A., & García-Lara, S. (2018). In vitro plant tissue culture: means for production of biological active compounds. *Planta*, 248(1), 1–18. <https://doi.org/10.1007/s00425-018-2910-1>
- Espinoza-Barrera, L. A. (2015). Generalidades e importancia de los agaves en México. *Desde el Herbario CICY*, 7, 161–164. https://www.cicy.mx/Documentos/CICY/Desde_Herbario/2015/2015-10-22-Espinosa_Barrera-Generalidades_e_importancia_de_los_agaves_en_Mexico.pdf

- Fehér, A. (2019). Callus, Dedifferentiation, Totipotency, Somatic Embryogenesis: What These Terms Mean in the Era of Molecular Plant Biology? *Frontiers in Plant Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00536>
- Figueredo, C. J., Casas, A., González-Rodríguez, A., Nassar, J. M., Colunga-GarcíaMarín, P., & Rocha-Ramírez, V. (2015). Genetic structure of coexisting wild and managed agave populations: implications for the evolution of plants under domestication. *AoB Plants*, plv114. <https://doi.org/10.1093/aobpla/plv114>
- Forseth, I. N. (2010). The Ecology of Photosynthetic Pathways. *The Nature Education: Knowledge Project*, 3(4).
- Gallardo-Valdez, J. (2017). Brevario Mezcalero. ISBN: 978-607-97548-1-5.
- García-Depraect, O., Rafael Osuna-Laveaga, D., & León-Becerril, E. (2020). A Comprehensive Overview of the Potential of Tequila Industry By-Products for Biohydrogen and Biomethane Production: Current Status and Future Perspectives. En *New Advances on Fermentation Processes*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.88104>
- García-Mendoza, A. (2002). *Distribution of Agave (Agavaceae) in Mexico*. 74, 177–187.
- García-Mendoza, A., & Galván-V., R. (1995). Riqueza de las familias Agavaceae y Nolinaceae en México. *Botanical Sciences*, 56, 7–24. <https://doi.org/10.17129/botsci.1461>
- García-Mendoza, A. J. (2007). Los agaves de México. *Ciencias UNAM, Julio-Septiembre(087)*, 14–23.
- García-Mendoza, A. J. (2010). Revisión taxonómica del complejo Agave Potatorum zucc. (agavaceae): nuevos taxa y neotipificación. *Acta Botanica Mexicana*, 91, 71–93. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57412477008>
- García-Mendoza, A. J., & Franco-Martínez, I. S. (2018). *Actualización de la información de las especies y subespecies de magueyes de Oaxaca, con*

énfasis en las especies mezcaleras. Informe final SNIB-CONABIO proyecto No. NE012.

<http://www.conabio.gob.mx/institucion/proyectos/resultados/InfNE012.pdf>

García-Mendoza, A. J., & Sandoval-Gutiérrez, D. (2019). *Agave guiengola*. *The IUCN Red List of Threatened Species 2019: e.T22486574A2248658*.
<https://doi.org/10.2305/IUCN.UK.2019>

García-Villalba, W. G., Rodríguez-Herrera, R., Ochoa-Martínez, L. A., Rutiaga-Quiñones, O. M., Gallegos-Infante, J. A., & González-Herrera, S. M. (2023). Agave fructans: a review of their technological functionality and extraction processes. *Journal of Food Science and Technology*, 60(4), 1265–1273.
<https://doi.org/10.1007/s13197-022-05375-7>

Gentry, H. S. (1960). A New Agave from Oaxaca, Mexico. *Brittonia*, 12(2), 98.
<https://doi.org/10.2307/2805209>

Georgiev, M. I., Weber, J., & Maciuk, A. (2009). Bioprocessing of plant cell cultures for mass production of targeted compounds. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 83(5), 809–823. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2049-x>

Gil-Marín, J. A., Rodríguez, R., Jasso-Cantú, D., & Zermeño, A. (2006). Resistencia estomática, transpiración y potencial hídrico en sábila con diferentes condiciones ambientales. *Terra Latinoamericana*, 24(3), 355–365.
<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57311103007>

Giraldo-Cañas, D. (2020). Una especie nueva de Agave (Asparagaceae: Agavoideae) de Colombia. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 91(1), 913274.
<https://doi.org/10.22201/ib.20078706e.2020.91.3274>

Godínez-Hernández, C. I., Aguirre-Rivera, J. R., Juárez-Flores, B. I., Ortiz-Pérez, M. D., & Becerra-Jiménez, J. (2015). Extraction and characterization of Agave salmiana Otto ex Salm-Dyck fructans. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, XXII(1), 59–72.
<https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2015.02.007>

- Góngora Chi, G. J., Lizardi Mendoza, J., López Franco, Y., López Mata, M., & Quihui Cota, L. (2022). Métodos de extracción, funcionalidad y bioactividad de saponinas de Yucca: una revisión. *Biotechnia*, 25(1), 147–155. <https://doi.org/10.18633/biotechnia.v25i1.1800>
- González-Díaz, R. L., Rodríguez-Gómez, F. del C., & Cortés-Romero, C. (2020). Exohidrolasas fructosílicas y su importancia en el metabolismo de fructanos en Agave tequilana Weber var. azul. *Revista Colombiana de Química*, 49(3), 3–12. <https://doi.org/10.15446/rcq.v49n3.84882>
- González-Oramas, G., Alemán-García, S., Barredo, F., & Robert-García, M. (2002). Embriogénesis somática en Agave fourcroydes Lem. *Instituto de Biotecnología de las Plantas*, 2(1).
- Guerra de León, J. O., Nogueiras Lima, C., Laguna Granja, A., & De Rojas Pérez, M. (2007). Estudio de las ceras obtenidas de hojas del Agave Brittoniana T. *Revista Cubana de Química*, XIX(1), 62–64. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=443543706019>
- Hasnain, A., Naqvi, S. A. H., Ayesha, S. I., Khalid, F., Ellahi, M., Iqbal, S., Hassan, M. Z., Abbas, A., Adamski, R., Markowska, D., Baazeem, A., Mustafa, G., Moustafa, M., Hasan, M. E., & Abdelhamid, M. M. A. (2022). Plants in vitro propagation with its applications in food, pharmaceuticals and cosmetic industries; current scenario and future approaches. *Frontiers in Plant Science*, 13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1009395>
- Hernández, R., Lugo, E. C., Díaz, L., & Villanueva, S. (2005). Extracción y cuantificación indirecta de las saponinas de agave lechuguilla Torrey. *e-Gnosis*, 3, 0. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=73000311>
- Huazano-García, A., Shin, H., & López, M. (2017). Modulation of Gut Microbiota of Overweight Mice by Agavins and Their Association with Body Weight Loss. *Nutrients*, 9(9), 821. <https://doi.org/10.3390/nu9090821>

Ikeuchi, M., Sugimoto, K., & Iwase, A. (2013). Plant Callus: Mechanisms of Induction and Repression. *The Plant Cell*, 25(9), 3159–3173. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.116053>

Jackson, P. P.J., Wijeyesekera, A., Williams, C. M., Theis, S., van Harselaar, J., & Rastall, R. A. (2023). Inulin-type fructans and 2'fucosyllactose alter both microbial composition and appear to alleviate stress-induced mood state in a working population compared to placebo (maltodextrin): the EFFICAD Trial, a randomized, controlled trial. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 118(5), 938–955. <https://doi.org/10.1016/j.ajcnut.2023.08.016>

Jiménez-Pérez, N. D. C., Hernández-Jiménez, O. A., & García-Mendoza, A. J. (2021). *Agave guadarramae* (Asparagaceae: Agavoideae), una especie nueva del sureste de México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 92(0), 923726. <https://doi.org/10.22201/ib.20078706e.2021.92.3726>

Jin, H., Yu, Y., Hu, S., Quan, X., & Wu, S. (2020). Effect of nitrogen concentration, source, and phosphate concentration on accumulation of biomass and calycosin-7-O- β -D-glucoside in *Astragalus membranaceus* adventitious roots. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 56(4), 407–414. <https://doi.org/10.1007/s11627-020-10072-1>

Kancab-Uc, R. A. (2016). *Diseño de un protocolo para la propagación in vitro de Agave Parviflora torr. mediante organogénesis directa*. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C.

León-Roque, N., Aguilar-Tuesta, S., Quispe-Neyra, J., Mamani-Navarro, W., Alfaro-Cruz, S., & Condezo-Hoyos, L. (2019). A green analytical assay for the quantitation of the total saponins in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) based on macro lens-coupled smartphone. *Talanta*, 204, 576–585. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.06.014>

- Li, Y., Yang, H., Li, Z., Li, S., & Li, J. (2023). Advances in the Biosynthesis and Molecular Evolution of Steroidal Saponins in Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(3), 2620. <https://doi.org/10.3390/ijms24032620>
- Lopez, M. G., Mancilla-Margalli, N. A., & Mendoza-Diaz, G. (2003). Molecular Structures of Fructans from Agave tequilana Weber var. azul. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(27), 7835–7840. <https://doi.org/10.1021/jf030383v>
- López-Luengo, M. T. (2001). Saponósidos. *Offarm*, 20(6), 124–129. <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-saponosidos-13015492>
- López-Romero, J. C., González-Ríos, H., Valenzuela-Melendres, M., Ayala-Zavala, J. F., & Meza-Callado, A. G. (2023). Compuestos químicos, capacidad antioxidante y antimicrobiana de dos extractos metanólicos de hojas de Agave angustifolia. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 10(NEIII). <https://doi.org/10.19136/era.a10nNEIII.3644>
- Mancilla-Álvarez, E., Pérez-Sato, J. A., Núñez-Pastrana, R., Spinoso-Castillo, J. L., & Bello-Bello, J. J. (2021). Comparison of Different Semi-Automated Bioreactors for In Vitro Propagation of Taro (*Colocasia esculenta* L. Schott). *Plants*, 10(5), 1010. <https://doi.org/10.3390/plants10051010>
- Mancilla-Álvarez, E., Spinoso-Castillo José, L., Muñoz-Márquez Trujillo, R. A., Palacios-Pardo, K. F., & Bello-Bello Jericó, J. (2024). Temporary immersion bioreactor as an efficient method for in vitro propagation of Agave marmorata. *South African Journal of Botany*, 169, 6–11. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2024.04.011>
- Márquez-López, R. E., Santiago-García, P. A., & López, M. G. (2022). Agave Fructans in Oaxaca's Emblematic Specimens: Agave angustifolia Haw. and Agave potatorum Zucc. *Plants*, 11(14), 1834. <https://doi.org/10.3390/plants11141834>

- Martinez-Martinez, S. Y., Arzate-Fernandez, A. M., Álvarez-Aragon, C., Martínez-Velasco, I., & Norman-Mondragon, T. (2021). Regeneración de plantas de agave Marmorata Roelz en sistemas de inmersión temporal, mediante organogénesis y embriogénesis somática. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 24(3). <https://doi.org/10.56369/tsaes.3472>
- Martinez-Rodriguez, A., Beltran-Garcia, C., Valdez-Salas, B., Santacruz-Ruvalcaba, F., Di Mascio, P., & Beltran-Garcia, M. J. (2022). Micropropagation of Seed-Derived Clonal Lines of the Endangered Agave marmorata Roezl and Their Compatibility with Endophytes. *Biology*, 11(10), 1423. <https://doi.org/10.3390/biology11101423>
- Monja-Mio, K. M., Olvera-Casanova, D., Herrera-Alamillo, M. Á., Sánchez-Teyer, F. L., & Robert, M. L. (2021). Comparison of conventional and temporary immersion systems on micropropagation (multiplication phase) of Agave angustifolia Haw. 'Bacanora'. *3 Biotech*, 11(2), 77. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02604-8>
- Montañez-Soto, J., Venegas-González, J., Vivar-Vera, M., & Ramos-Ramírez, E. (2011). Extracción, caracterización y cuantificación de los fructanos contenidos en la cabeza y en las hojas del Agave tequilana Weber azul. *Bioagro*, 23(3), 199–206. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=85721149007>
- Monterrosas-Brisson, N., Ocampo, M., Jiménez-Ferrer, E., Jiménez-Aparicio, A., Zamilpa, A., Gonzalez-Cortazar, M., Tortoriello, J., & Herrera-Ruiz, M. (2013). Anti-Inflammatory Activity of Different Agave Plants and the Compound Cantalasonin-1. *Molecules*, 18(7), 8136–8146. <https://doi.org/10.3390/molecules18078136>
- Mora-López, J. L., Reyes-Agüero, J. A., Flores-Flores, J. L., Peña-Valdivia, C. B., & Aguirre-Rivera, J. R. (2011). Variación morfológica y humanización de la sección Salmianae del género Agave. *Agrociencia*, 45(4), 465–477.

- Murphy, T. M. (2003). Cell, Tissue and Organ Culture | Cell Culture and Secondary Metabolites. En *Encyclopedia of Rose Science* (pp. 99–106). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B0-12-227620-5/00107-5>
- Murthy, H. N., Lee, E.-J., & Paek, K.-Y. (2014). Production of secondary metabolites from cell and organ cultures: strategies and approaches for biomass improvement and metabolite accumulation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 118(1), 1–16. <https://doi.org/10.1007/s11240-014-0467-7>
- Nava-Cruz, N. Y., Medina-Morales, M. A., Martinez, J. L., Rodriguez, R., & Aguilar, C. N. (2015). Agave biotechnology: an overview. *Critical Reviews in Biotechnology*, 35(4), 546–559. <https://doi.org/10.3109/07388551.2014.923813>
- Omodamiro, O., Rachel Majekodunmi, O., & Obeagu, E. (2024). *Diuretic Activity of Ethanolic Root Extract and Fractions of Agave Sasilana in Albino Rats*. 2, 16–27.
- Ortegón-Campos, I. G. (2005). *Variación en el contenido y composición de las ceras epicuticulares de Cnidoscolus aconitifolius en tres tipos de vegetación de la Península de Yucatán* [Tesis]. Centro de Investigación Científica de Yucatán.
- Osuna-Laveaga, D. R., García-Depraect, O., Vallejo-Rodríguez, R., López-López, A., & León-Becerril, E. (2020). Integrated Ozonation-Enzymatic Hydrolysis Pretreatment of Sugarcane Bagasse: Enhancement of Sugars Released to Expedited Ozone Ratio. *Processes*, 8(10), 1274. <https://doi.org/10.3390/pr8101274>
- Özkul, M., Özel, Ç. A., Yüzbaşıoğlu, D., & Ünal, F. (2016). Does 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) induce genotoxic effects in tissue cultured Allium roots? *Cytotechnology*, 68(6), 2395–2405. <https://doi.org/10.1007/s10616-016-9956-3>
- Ozyigit, I. I., Dogan, I., Hocaoglu-Ozyigit, A., Yalcin, B., Erdogan, A., Yalcin, I. E., Cabi, E., & Kaya, Y. (2023). Production of secondary metabolites using tissue

culture-based biotechnological applications. *Frontiers in Plant Science*, 14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1132555>

Pereo-Vega, G. D. (2015). *Actividad antibacteriana in vitro del extracto butanólico del tallo de Yucca Baccata e identificación de sus fracciones con saponinas*. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo.

Pérez, A. J., Calle, J. M., Simonet, A. M., Guerra, J. O., Stochmal, A., & Macías, F. A. (2013). Bioactive steroidal saponins from Agave offoyana flowers. *Phytochemistry*, 95, 298–307. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2013.06.020>

Pérez España, V. H., Cuervo Parra, J. A., Aparicio Burgos, J. E., Morales Ovando, M. A., & Romero Cortes, T. (2022). Importancia de la capa cuticular durante la colonización del hongo causante de la negrilla en Agave salmiana Otto ex Salm-Dyck ssp. salmiana. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 13(70). <https://doi.org/10.29298/rmcf.v13i70.1265>

Pérez-España, V. H., Cuervo-Parra, J. A., Aparicio-Burgos, J. E., Morales-Ovando, M. A., & Romero-Cortes, T. (2022). Importancia de la capa cuticular durante la colonización del hongo causante de la negrilla en Agave salmiana Otto ex Salm-Dyck ssp. salmiana. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 13(70). <https://doi.org/10.29298/rmcf.v13i70.1265>

Polivanova, O. B., & Bedarev, V. A. (2022). Hyperhydricity in Plant Tissue Culture. *Plants*, 11(23), 3313. <https://doi.org/10.3390/plants11233313>

Portillo, L., & Santacruz-Ruvalcaba, F. (2006). Factibilidad de uso de un nuevo sistema de inmersión temporal (orbitabion®) para embriogénesis somática de agave Tequilana Weber cultivar azul. *Boletín Nakari*, 17, 43–48.

Powers, D. E., & Backhaus, R. A. (1989). In vitro propagation of Agave arizonica Gentry & Weber. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 16(1), 57–60. <https://doi.org/10.1007/BF00044072>

- Ramos-Castellá, A., Iglesias-Andreu, L. G., Bello-Bello, J., & Lee-Espinosa, H. (2014). Improved propagation of vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) using a temporary immersion system. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 50(5), 576–581. <https://doi.org/10.1007/s11627-014-9602-8>
- Regalado Rentería, E., Godínez-Hernández, C. I., Aguirre Rivera, J. R., Camacho Ruíz, R. M., & Juárez Flores, B. I. (2021). Caracterización de fructanos de tallos de *Agave salmiana* Otto ex Salm Dyck y *A. tequilana* F.A.C. Weber en madurez fisiológica plena. *Botanical Sciences*, 99(2), 388–397. <https://doi.org/10.17129/botsci.2641>
- Reyes-Silva, A. I., Nuñez-Palenius, H. G., Ocampo, G., & Pérez-Molphe-Balch, E. (2022). Regeneración in vitro de *Agave wocomahi* Gentry (Asparagaceae). *Revista Fitotecnia Mexicana*, 45(4), 493. <https://doi.org/10.35196/rfm.2022.4.493>
- Reyes-Zambrano, S. J., Lecona-Guzmán, C. A., Barredo-Pool, F. A., Ambrosio Calderón, J. D., Abud-Archila, M., Rincón-Rosales, R., Ruiz-Valdiviezo, V. M., & 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. <https://doi.org/10.4067/S0717-66432016000100014>
- Romero-Galvan, J. R. (2018). *El Maguey*. Espacio Cultural Nepantla.
- Sánchez-Calvo, L., & Alvarenga-Venutolo, S. (2015). Callogénesis y establecimiento del cultivo de células en suspensión de *Uncaria tomentosa* (Willd.) D.C. (uña de gato). *Tecnología en Marcha*, 28(1), 105–120. https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0379-39822015000100105
- Sánchez-Galindo, L. M. (2010). *Estudio de la morfo-estructura de dos variedades mexicanas de agave (Agave angustifolia Haw y Agave tequilana Weber)*

caracterizadas mediante microscopía óptica, tratamiento digital de imágenes y conceptos de dimensión fractal. [Tesis]. Universidad de la Sabana.

- Santiago-García, P. A., Mellado-Mojica, E., León-Martínez, F. M., Dzul-Cauich, J. G., López, M. G., & García-Vieyra, M. I. (2021). Fructans (agavins) from *Agave angustifolia* and *Agave potatorum* as fat replacement in yogurt: Effects on physicochemical, rheological, and sensory properties. *LWT*, *140*, 110846. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110846>
- Sidana, J., Singh, B., & Sharma, O. P. (2016). Saponins of Agave: Chemistry and bioactivity. *Phytochemistry*, *130*, 22–46. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2016.06.010>
- Smith, R. H. (2013). Callus Induction. En *Plant Tissue Culture* (pp. 63–79). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415920-4.00006-2>
- Soto-Rodríguez, L. D. (2020). *Identificación de metabolitos en mosto y mezcal de Agave potatorum Zucc., mediante UHPLC-QTOF.* Universidad Tecnológica de la Mixteca.
- Sparg, S. G., Light, M. E., & van Staden, J. (2004). Biological activities and distribution of plant saponins. *Journal of Ethnopharmacology*, *94*(2–3), 219–243. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.05.016>
- Starr, G. D. (2022). Agaves of Oaxaca: Part Two *Agave ellemeetiana*, *agave guiengola*, and *Agave gypsicola*. *Cactus and Succulent Journal*, *94*(1). <https://doi.org/10.2985/015.094.0102>
- Steinmacher, D. A., Clement, C. R., & Guerra, M. P. (2007). Somatic embryogenesis from immature peach palm inflorescence explants: towards development of an efficient protocol. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *89*(1), 15–22. <https://doi.org/10.1007/s11240-007-9207-6>
- Téllez Torres, A. G., Jiménez Rodríguez, J. Á., González Caballero, O., Juárez Pérez, W. R., Martínez Martínez, S., & Chávez Ávila, V. M. (2023). Cultivo in

vitro de *Agave potatorum*, especie amenazada endémica de México. *Botanical Sciences*, 101(3), 883–894. <https://doi.org/10.17129/botsci.3279>

Upadhyay, S., Jeena, G. S., Shikha, & Shukla, R. K. (2018). Recent advances in steroidal saponins biosynthesis and in vitro production. *Planta*, 248(3), 519–544. <https://doi.org/10.1007/s00425-018-2911-0>

Valdiani, A., Hansen, O. K., Nielsen, U. B., Johannsen, V. K., Shariat, M., Georgiev, M. I., Omidvar, V., Ebrahimi, M., Tavakoli Dinanai, E., & Abiri, R. (2019). Bioreactor-based advances in plant tissue and cell culture: challenges and prospects. *Critical Reviews in Biotechnology*, 39(1), 20–34. <https://doi.org/10.1080/07388551.2018.1489778>

Vargas-Valencia, A. J. (2017). *Micropropagación de Agave guiengola Gentry, especie endémica amenazada del estado de Oaxaca, México*. Universidad Nacional Autónoma de México.