



**UNIVERSIDAD MICHOCANA DE SAN  
NICOLÁS DE HIDALGO**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO-  
BIOLÓGICAS**

**Laboratorio de Nutrición Vegetal  
para obtener el grado de  
Maestra en Ciencias en Biología Experimental**

**“Evaluación del efecto del sistema de inmersión temporal (SIT) en  
el enraizamiento y aclimatación de plantas de *Agave cupreata*”**

**Tesi**

**Que presenta  
BIRMANIA RODRÍGUEZ HEREDIA**

**Director: Dr. en C. Josué Altamirano Hernández**

Sinodales: Dr. en C. Rafael Salgado Garciglia  
Dr. en C. Eduardo Valencia Cantero  
Dr. en C. Jesús Campos García  
Dr. en C. Alfonso Luna Cruz

Morelia, Michoacán a marzo de 2023

## **Agradecimientos y dedicatorias**

Quiero expresar mi gratitud a la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo por permitirme acceder a sus recursos y facilidades, lo que me ha permitido realizar mi investigación de manera más efectiva y eficiente.

Agradezco a mis compañeros de estudio, amigos y familiares por su apoyo constante, motivación y comprensión. Sin su aliento y aliento, esta investigación no hubiera sido posible.

Agradezco a mi director/a de tesis, por su orientación, paciencia y sabiduría en todo el proceso de investigación. Sus consejos y sugerencias me han llevado a mejorar mi trabajo y mi forma de pensar.

Quiero agradecer especialmente a mis revisores por su ayuda en la revisión de mi trabajo y sus valiosos comentarios. Sus aportes han sido fundamentales para mejorar la calidad de mi tesis.

Por último, pero no menos importante, quiero agradecer a todos los participantes de mi estudio por su tiempo y disposición a colaborar en mi investigación. Sus aportes han sido invaluable para la obtención de resultados significativos.

# Contenido

Índice de tablas.....	5
Índice de figuras.....	6
Resumen.....	9
Summary.....	10
1. Introducción.....	11
2. Antecedentes.....	13
2.1 El agave.....	13
2.2 Usos del agave.....	15
2.3 Producción de agave en Michoacán.....	18
2.3.1 <i>A. cupreata</i> .....	18
2.4 Cultivo de tejidos: propagación <i>in-vitro</i> .....	20
2.5 Factores que influyen en la micropropagación.....	22
2.6 Enraizamiento y adaptación a condiciones <i>ex-vitro</i> .....	25
2.7 Propagación <i>in-vitro</i> de agave.....	27
2.8 Limitaciones actuales de la micropropagación y el cultivo en medio líquido. .....	28
2.9 Sistemas de micropropagación.....	30
2.10 Propagación en medio líquido.....	30
2.11 Micropropagación en biorreactores.....	31
2.12 Sistemas de inmersión continua.....	32
2.13 Sistemas de inmersión temporal (SIT).....	32
3. Justificación.....	37
4. Hipótesis.....	38
5. Objetivo General.....	39
5.1 Objetivos particulares.....	39
6. Materiales y métodos.....	40
6.1 Establecimiento de <i>A. cupreata</i> de sistema de cultivo semisólido <i>in-vitro</i> .....	42
6.2 Establecimiento y fase de multiplicación vegetal.....	44
6.3 Enraizamiento de los brotes micropropagados de <i>A. cupreata</i> .....	45
6.4 Análisis del efecto de luz y sistema de cultivo en el contenido de pigmentos fotosintéticos en plántulas de <i>A. cupreata</i> .....	47
Tabla 1. Modelos de predicción para contenido de pigmentos fotosintéticos basados adquisición de imagen.....	48

6.5 Aclimatación .....	49
7.Resultados .....	50
7.1 Establecimiento del cultivo <i>in-vitro</i> de <i>A. cupreata</i> en medio semisólido.....	50
7.2 Establecimiento y fase de multiplicación en sistema de cultivo tradicional semisólido. ...	53
Tabla 2. Número y longitud de brotes axilares generados de <i>A. cupreata</i> después de 60 días de exposición usando en combinación BAP y Ci en cultivo <i>in-vitro</i> .....	57
7.3 Enraizamiento de los brotes micropropagados de <i>A. cupreata</i> .....	58
Tabla 3. Número de raíces generadas después de 30 días de exposición usando en AIB y 2,4-D en enraizamiento <i>in-vitro</i> de <i>A. cupreata</i> . .....	58
7.4 Enraizamiento en sistema de inmersión temporal (SIT) .....	59
Tabla 4. Efecto del sistema de cultivo en el desarrollo de los brotes de <i>A. cupreata</i> en etapa de enraizamiento .....	61
7.5 Influencia del tipo de luz en el crecimiento y desarrollo de <i>A. cupreata</i> durante la fase de enraizamiento <i>in-vitro</i> .....	63
Tabla 5. Diferencia del tipo de luz en el efecto del sistema de cultivo en el desarrollo de brotes de <i>A. cupreata</i> en enraizamiento.....	63
7.6 Efecto del sistema de cultivo y tipo de luz en el contenido de pigmentos fotosintéticos en plántulas de <i>A. cupreata</i> . .....	63
7.7 Adaptación <i>ex-vitro</i> de plántulas de <i>A. cupreata</i> .....	68
8.Discusión .....	73
8.1 Germinación de semillas. ....	73
8.2 Establecimiento de cultivo micropropagación y multiplicación de brotes. ....	75
8.3 Enraizamiento de los brotes micropropagados de <i>A. cupreata</i> .....	77
8.4 Enraizamiento en sistema de inmersión temporal .....	78
8.5 Efecto de la iluminación y sistema de cultivo en el desarrollo radicular y aéreo de los brotes de <i>A. cupreata</i> .....	79
8.6 Efecto de luz y sistema de cultivo en el contenido de pigmentos fotosintéticos en plantas de <i>A. cupreata</i> . .....	80
7.7 Adaptación <i>ex-vitro</i> de plántulas de <i>A. cupreata</i> .....	82
8.Conclusiones .....	84
9.Referencias bibliográficas. ....	86

## Índice de tablas

Tabla 1. Modelos de predicción para contenido de pigmentos fotosintéticos basados adquisición de imagen.....	48
Tabla 2. Número y longitud de brotes axilares generados de <i>Agave cupreata</i> después de 60 días de exposición usando en combinación BAP y Ci en cultivo <i>in-vitro</i> .....	57
Tabla 3. Número de raíces generadas después de 30 días de exposición usando en AIB y 2,4-D en enraizamiento <i>in-vitro</i> de <i>Agave cupreata</i> .....	58
Tabla 4. Efecto del sistema de cultivo en el desarrollo de los brotes de <i>Agave cupreata</i> en etapa de enraizamiento .....	61
Tabla 5. Diferencia del tipo de luz en el efecto del sistema de cultivo en el desarrollo de brotes de <i>Agave cupreata</i> en enraizamiento .....	63

## Índice de figuras

Figura 1. Diagrama general del metabolismo de las crasúláceas (CAM). Fase nocturna ingresa CO <sub>2</sub> por los estomas abiertos, se convierte en malato por el fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) y se almacena en la vacuola. Fase diurna, se produce CO <sub>2</sub> por la descarboxilación y uso de la ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa. Utilizando el CO <sub>2</sub> almacenado en la vacuola los estomas se mantienen cerrados (García et al. 2014).....	14
Figura 2. Distribución por región de los principales tipos de agave aprovechados comercialmente en México (Guzmán-Pedraza & Contreras-Esquivel, 2018, COMERCAM 2022) .	18
Figura 4. Tipos de sistema de inmersión temporal. A) Sistema BIOMINT® de balance, B) Sistema de flujo y reflujo de inmersión total del material vegetal y renovación de medio, C) Sistema RITA® de inmersión parcial del material vegetal y renovación de medio, C) Sistema Setis® de inmersión completa por transferencia de medio neumática con o sin renovación de medio.	34
Figura 5. Diagrama de la metodología utilizada en este estudio.	41
Figura 6. Diagrama de una planta de <i>A. cupreata</i> utilizada para la obtención de explantes. A) Explante basal para la multiplicación.	44
Figura 7. Características morfométricas de las semillas de <i>A. cupreata</i> . A) Semillas blancas o con bordes blancos, sin embrión y sin endospermo. B) Semillas negras potencialmente viables. C) Tamaño y caracteres morfológicos de las semillas seleccionadas.	50
Figura 8. Porcentaje final germinativo (media ± d.e, n=100) de los tratamientos (C) semillas control (Sb) semillas en imbibición. (Eq) escarificación química. (Em) escarificación mecánica. Las medias que no comparten letra son significativas ( <i>test LSD fisher p&lt;0.05</i> ).	51
Figura 9. Tasa de germinación expresada en índice de germinación, valores promedio entre tratamiento (media ± d.e. n=100). (C) semillas control (Sb) semillas en imbibición (Eq) escarificación química. (Em) escarificación mecánica. Las letras que no comparten letras son significativas, ( <i>test LSD Fisher p&lt;0.05</i> ).	51
Figura 11. A) Germinación de plántulas bajo tratamiento de escarificación química a los 14 días. B) Crecimiento de las plántulas después de 28 días de incubación.	52
Figura 10. Longitud de las plántulas en respuesta a los tratamientos de estimulación de la germinación ( <i>media ± d.e. n=100</i> ). (C) Semillas control, (Sb) Semillas en imbibición. (Eq) escarificación química. (Em) Escarificación mecánica.	52
Figura 12, Establecimiento in-vitro de plantas de <i>A. cupreata</i> . (A). Semillas germinadas in-vitro, barra=1cm. (B). Semillas establecidas en contenedor de cultivo, barra=2cm. (C). Planta madre, barra=2cm (D). Explante para multiplicación. (E). Generación de brotes, barra=2cm.	53
Figura 13. Multiplicación de brotes de <i>A. cupreata</i> . A. Tejido calloso generado en los brotes del tratamiento con 1.5mg/L BAP + 1.5 mg/L Ci, barra=1cm. B. Signos de necrosis en hojas y tejido calloso en los brotes, barra=1cm. C-B. Brotes generados con el tratamiento con 1.5mg/L BAP + 1.5 mg/L Ci, barra=2.5cm	54

Figura 14. a) Modelo cuadrático para la optimización de número de brotes con 6-Bencilaminpurina (A) y de la Cinetina en *A.cupreata* (B). AB término de interacción entre BAP y Ci. AA, término cuadrático para BAP; BB es el término cuadrático para el Ci. b) Efectos individuales de BAP y Ci sobre en la longitud de brote..... 55

Figura 15. Modelo cuadrático de optimización de concentración auxinas para la longitud de brote. 6-Bencilaminpurina (A) y de la Cinetina (B). AB término de interacción entre la BAP y Ci; AA. término cuadrático para BAP; BB. término cuadrático para el Ci. (b) Efectos individuales de BAP y Ci sobre en la longitud de brote en *A.cupreata*. ..... 55

Figura 17. a) Gráfica de efectos estandarizados para el efecto del ácido indol-butírico (AIB) y 2,4-ácido diclorofenoxyacético (2,4-D) en raíces de *A.cupreata*. A. 2,4- ácido diclorofenoxyacético. B. ácido indol-butírico. AB interacción entre AIB y 2,4-D; (AA) término cuadrático para 2,4- D. (BB) término cuadrático para AIB. (b) Efectos principales de AIB y 2,4-D sobre en la longitud de brote 59

Figura 18. Sistema de Inmersión temporal para enraizamiento de *A. cupreata*. A. Diseño de sistema de inmersión temporal. B Brotes en luz fluorescente. C. Brotes en luz LED. C. Brotes en contenedor SIT. .... 60

Figura 19. Efecto del tipo de cultivo en plántulas de *A. cupreata*. A. Plántula cultivada en sistema de inmersión temporal, frecuencia de inmersión 1minx72h. B. Plántula cultivada en sistema de inmersión temporal, frecuencia de inmersión 1minx24h. C. Plántula cultivada en sistema de inmersión temporal, frecuencia de inmersión 1minx8h. D. Cultivo en medio semisólido..... 60

Figura 20. Efecto del tipo de iluminación en plántulas de *A. cupreata*. A. Plántula cultivada en sistema de inmersión temporal, frecuencia de inmersión 1minx72h bajo luz LED. B. Plántula cultivada en sistema de inmersión temporal, frecuencia de inmersión 1minx72h bajo luz fluorescente. C. Plántula cultivada en sistema de medio semisólido bajo luz fluorescente. D. Plántula cultivada en sistema de medio semisólido bajo luz LED..... 64

Figura 22. Contenido de carotenoides en mg/g de peso fresco. SS. sistema semisólido. SIT-8 sistema de inmersión 1min x 8h. SIT-24 sistema de inmersión 1min x 24h. SIT-72 sistema de inmersión 1min x 72h. LED-SS tratamiento con luz LED de medio semisólido. LED-72 tratamiento con luz LED sistema de inmersión 1min x72h. Las medias que no comparten letra son significativas, (Tukey  $p < 0.05$ ). Datos muestran media  $\pm$  DE, (n=96). ..... 65

Figura 21. Contenido de clorofila en mg/g de peso fresco. SS. sistema semisólido. SIT-8 sistema de inmersión 1min x 8h. SIT-24 sistema de inmersión 1min x 24h. SIT-72 sistema de inmersión 1min x 72h. LED-SS tratamiento con luz LED de medio semisólido. LED-72 tratamiento con luz LED sistema de inmersión 1min x72h. Las medias que no comparten letra son significativas, (Tukey  $p < 0.05$ ).. 65

Figura 23. Radio de contenido clorofila/carotenoides de brotes enraizados de *A. cupreata*. SS. sistema semisólido. SIT-8 sistema de inmersión 1min x 8h. SIT-24 sistema de inmersión 1min x 24h. SIT-72 sistema de inmersión 1min x 72h. LED-SS tratamiento con luz LED de medio semisólido. LED-72 tratamiento con luz LED sistema de inmersión 1min x72h. Las medias que no comparten letra son significativas, (Tukey  $p < 0.05$ ). Datos muestran *media  $\pm$  DE*, (n=96)..... 66

Figura 24. Radio de contenido clorofila/carotenoides de hojas de brotes enraizados de *A. cupreata*. SS. sistema semisólido. SIT-8 sistema de inmersión 1min x 8h. SIT-24 sistema de inmersión 1min x 24h. SIT-72 sistema de inmersión 1min x 72h. LED-SS tratamiento con luz LED de medio

semisólido. LED-72 tratamiento con luz LED sistema de inmersión 1min x72h. Las medias que no comparten letra son significativas, (Tukey $p<0.05$ ) $n=96$ .....	67
Figura 25. Porcentaje de plántulas sobrevivientes del proceso de aclimatación. SS. sistema semisólido. SIT-8 sistema de inmersión temporal frecuencia 1minx8h. SIT-24 sistema de inmersión temporal frecuencia 1minx24h. SIT-72 sistema de inmersión temporal frecuencia 1minx72h, (Tukey $P<0.05$ ) $n=200$ .....	68
Figura 26. A-B. Efecto del sistema de cultivo en la fase de aclimatación de <i>A. cupreata</i> en el número de hojas totales a los 60 días de aclimatación. SS medio semisólido. SIT-8 frecuencia de inmersión 1minx8h. SIT-24 frecuencia de inmersión 1 minx24h. SIT-72 frecuencia de inmersión 1minx72h. (A-C) Medio de cultivo SS vs. SIT. (D-E) Comparación del tipo de luz y medio de cultivo. Datos muestran media $\pm$ DE, ( $n=200$ ). ....	69
Figura 27. Efecto del sistema de cultivo en la concentración de clorofila (mg/g) de peso fresco de <i>A. cupreata</i> a los 60 días de aclimatación. SS medio semisólido. SIT-8 frecuencia de inmersión 1minx8h. SIT-24 frecuencia de inmersión 1 minx24h. SIT-72 frecuencia de inmersión 1minx72h. (A-C) Medio de cultivo SS vs. SIT. (D-E) Comparación del tipo de luz y medio de cultivo. Datos muestran media $\pm$ DE, ( $n=200$ ).....	70
Figura 28. Efecto del medio de cultivo en la formación de raíces durante la fase de aclimatación en <i>A. cupreata</i> a los 60 días de aclimatación. (SS). sistema semisólido. (SIT-8) sistema de inmersión temporal frecuencia 1minx8h. (SIT-24) sistema de inmersión temporal frecuencia 1minx24h. (SIT-72) sistema de inmersión temporal frecuencia 1minx72h. (SSLED) Luz fluorescente en medio semisólido. (LED-72) Luz LED en sistema de inmersión temporal frecuencia 1minx72h. Datos muestran media $\pm$ DE, ( $n=200$ ).....	71
Figura 29. Efecto del medio de cultivo en la formación de raíces a los 60 días de la fase de aclimatación. SS. sistema semisólido. SIT-8 sistema de inmersión temporal frecuencia 1minx8h. SIT-24 sistema de inmersión temporal frecuencia 1minx24h. SIT-72 sistema de inmersión temporal frecuencia 1minx72h. SSLED Luz fluorescente en medio semisólido. LED-72. Luz LED en sistema de inmersión temporal frecuencia 1minx72h. Datos muestran media $\pm$ DE, ( $n=200$ ).....	72

# “Evaluación del efecto del sistema de inmersión temporal (SIT) en el enraizamiento y aclimatación de plantas de *Agave cupreata*”

Licenciado en Biotecnología Birmania Rodríguez Heredia

## Resumen

En México existe una demanda extensa para el establecimiento y cultivo de áreas de producción para plantaciones de agave, especialmente dentro de las zonas de denominación de origen para la producción de mezcal. La micropropagación es un método eficiente para la producción de grandes cantidades de plantas con caracteres homogéneos y libres de plaga, pero los métodos tradicionales se encuentran limitados para escalación comercial por las propiedades del medio semisólido, que generan plantas con caracteres morfológicos inmaduros para su supervivencia *ex-vitro* después de la multiplicación. La producción de plantas en biorreactor y medio líquido es una alternativa que ha llamado la atención de estudios recientes, sin embargo, no hay biorreactores especializados para la producción de plantas, y en particular de agave. En la presente investigación se desarrolló un biorreactor basado en el principio de sistema de inmersión temporal (SIT) para evaluar su capacidad para producir plantas de *A. cupreata* con caracteres desarrollados capaces de superar las etapas de adaptación a condiciones *ex -vitro* y compararlo con los métodos de producción tradicional. Se estableció un método de propagación *in-vitro* a partir de semillas, utilizando las fitohormonas bencilaminopurina (BAP) y cinetina (Ci) en medio semisólido con sales de Murashige y Skoog (MS). Se probaron los efectos del sistema de inmersión temporal en el enraizamiento y en la aclimatación *ex -vitro* bajo luz fluorescente y luz LED. Los parámetros de peso fresco, número de raíces, longitud, tamaño de brote y apariencia general de la planta fueron evaluados. Además, el contenido de pigmentos fotosintéticos como clorofila, carotenoides, relación clorofila/carotenoides, contenido de N, así como el porcentaje de supervivencia, también fueron determinados. Los resultados muestran que el biorreactor es significativamente más efectivo para el enraizamiento y de *A. cupreata*, obteniendo plántulas con mayor cantidad, número de raíces y desarrollo de la parte apical. No se encontraron diferencias significativas respecto al tipo de luz, donde en SIT se observó mejor desarrollo radical, apical y tasa de supervivencia superior. Exceptuando una disminución en el contenido de carotenoides, el sistema de inmersión temporal en luz LED facilitó un aumento en el contenido de clorofila en hojas, contenido de N y relación clorofila/carotenoides. Consecuentemente, la tasa de supervivencia aumento de 50% en medio semisólido a 87% en SIT a la etapa de aclimatación. En general, los resultados muestran que el sistema de inmersión temporal es una forma estable y viable para la producción de plantas propagadas *in-vitro* de *A. cupreata*, aptas para el trasplante y aclimatación.

*Palabras clave: Sistema de Inmersión temporal, A. cupreata, micropropagación, enraizamiento, aclimatación.*

# Effect of the temporary immersion system (SIT) on the rooting and acclimatization of *A. cupreata* plants”

Biotech. Birmania Rodríguez Heredia

## Summary

In Mexico there is an extensive demand for the establishment and cultivation of production areas for agave plantations, especially within the denomination of origin zones for the production of mezcal. Micropropagation is an efficient method for the production of large quantities of plants with homogeneous characters and free from pests. But the traditional methods are limited for commercial scaling by the properties of the semisolid medium, which generate plants with immature morphological characters for their *ex-vitro* survival after multiplication. The production of plants in a bioreactor and liquid medium is an alternative that has drawn the attention of recent studies, however, there are no specialized bioreactors for its production.

A bioreactor based on the principle of temporary immersion system (SIT) has been developed to evaluate its ability to produce *A. cupreata* plants with developed characteristics capable of overcoming the stages of adaptation to *ex-vitro* conditions and to compare it with traditional production methods.

An *in-vitro* propagation method was established from seeds using the BAP and Ci auxins in a semisolid medium. The effects of the temporary immersion system on rooting and acclimatization were tested *ex -vitro* under fluorescent light and LED light. Fresh weight, number of roots, length, shoot size, and general appearance of the plant were evaluated. In addition, the content of photosynthetic pigments; chlorophyll, carotenoids, chlorophyll/carotenoids ratio, N content was measured and survival percentage was evaluated.

The results show that the bioreactor is significantly ( $p<0.05$ ) more effective for rooting and for *A. cupreata*, obtaining seedlings with a greater quantity, number of roots and development of the apical part. No significant differences were found regarding the type of light, where in SIT better root and apical development and higher survival rate were observed ( $p\leq 0.05$ ).

Except for a decrease in carotenoid content, the temporary immersion system in LED light facilitated an increase in leaf chlorophyll content ( $p<0.05$ ), N content, and chlorophyll/carotenoid ratio. Consequently, the survival rate increased from 50% in semisolid medium to 87% in SIT at the acclimatization stage. In general, our results show that the temporary immersion system is a stable and viable way.

*Keywords: Temporary immersion system, A. cupreata, micropropagation, rooting, acclimatization.*

# 1. Introducción

El agave es una planta suculenta de origen mexicano que se distribuye ampliamente en terrenos áridos y semiáridos debido a su alta capacidad de adaptación a diferentes condiciones ambientales (García-Moya *et al.*, 2010). Diversas especies de agave que proliferan en zonas de escasa cantidad de lluvia obtienen energía a través del metabolismo del ácido crasuláceo debido a que les permite que la apertura de estomas, el intercambio de gases y el almacenamiento de CO<sub>2</sub> se realice durante la noche, lo que reduce la pérdida de agua por menor transpiración (Escamilla-Treviño, 2011).

Debido a su resiliencia y disponibilidad, el agave es un recurso que ha formado parte crucial en el desarrollo económico y cultural del territorio mexicano. Su uso abarca la producción de textiles, sustrato, biorremediación, biocombustibles, ornamentales o la industria alimentaria (Nava-Cruz *et al.*, 2014). Aunque en México existen alrededor de 159 especies, la agricultura especializada se centra en las denominadas “Maguey” debido a que contienen una savia rica en azúcares fermentables. Estos fructanos son el componente principal en la elaboración de bebidas destiladas, que se obtienen a partir de la cocción del tallo y la base de las hojas (Santos-Zea *et al.*, 2012).

Dependiendo del tipo de maguey y procesamiento empleado en la elaboración de la bebida destilada se produce una versión diferente de lo que se denomina como mezcal (García Vásquez 2018). De esta forma, existe una amplia variedad de mezcal y se clasifican a partir del tipo de agave utilizado para su elaboración.

En los últimos 10 años la producción de mezcal ha aumentado 48%. Esta es la razón por la cual, de acuerdo con el sistema de información agroalimentaria de consulta (SIACON), la producción y siembra de agave mezcalero aumentó de 301790 toneladas por 4700 hectáreas a 303382 toneladas por 5360 hectáreas (Fonseca Varela & Chalita Tovar, 2021). Sin embargo, existe un creciente aumento en la demanda y oferta en la agroindustria del mezcal (Monja-Mio *et al.*, 2019) por lo que aún con los avances y progreso en las técnicas de cultivo, prevalecen constantes limitaciones y retos en la cadena de producción.

Existen prácticas agronómicas especiales establecidas para aumentar la eficiencia de cultivo, el volumen de biomasa y contenido de fructanos (Somerville *et al.*, 2004). Las técnicas de cultivo *in-vitro* como la micropropagación de agave, ofrecen la oportunidad de multiplicar y acelerar el desarrollo del tejido vegetal, obteniendo un alto rendimiento de plantas durante todo el año en espacios reducidos (Puente-Garza *et al.*, 2017).

La propagación vegetal de los agaves consiste en dos métodos, la organogénesis directa e indirecta. Ya que se busca la homogeneidad de características, así como mayor volumen de producción de las plantas, se ha hecho especial enfoque en el

método de organogénesis directa a partir de brotes adventicios o axilares. Usando reguladores de crecimiento como las auxinas y citocininas en conjunto con medios de cultivos nutritivos que comúnmente tienen una consistencia sólida o semisólida, se ha logrado la multiplicación de los brotes en poco tiempo (Rodríguez-Garay & Rodríguez-Domínguez, 2018).

Sin embargo, el proceso de micropropagación tradicional aplicado tiene destacadas desventajas. El uso de medios sólidos o semisólidos ralentiza el manejo y aumenta su costo, provocando que la automatización de las tecnologías de producción dificulte la escalación comercial con procesos complejos y generalmente lentos (Ramos-Castellá *et al.*, 2014).

Estudios recientes enfocan su atención en la implementación de medios líquidos que permiten sortear varias de las desventajas de la micropropagación tradicional. Aumenta el área de multiplicación, las condiciones de cultivo son más uniformes, simplifica el manejo de los cultivos y disminuye el tiempo de producción (Hvoslef-Eide & Preil, 2004).

La introducción de los sistemas de inmersión temporal junto con el uso de biorreactores modificados para cultivo vegetal tiene como principio el acceso regular y contacto uniforme de las plantas con el medio de cultivo mejorando las condiciones de desarrollo y crecimiento, lo que, a su vez, facilita la semi automatización de los procesos de producción, reduciendo costos y aumentando la capacidad de cultivo (Ramírez-Mosqueda & Iglesias-Andreu, 2016).

El uso de sistemas de inmersión temporal ha sido utilizado en *A. tequilana* (Monjamio *et al.*, 2020) pero carece de optimizaciones para el cultivo de otras especies de agave. Con esto en mente, este estudio se desarrolló enfocado en la aplicación de tecnologías como la micropropagación y la implementación del sistema de inmersión temporal para estudiar su viabilidad para mejorar la calidad y desarrollo de plantas de *A. cupreata*. Identificando y midiendo la variabilidad de respuesta *in-vitro* seguido de la comparación de resultados con la información existente, este proyecto demuestra el potencial de la integración sistema de inmersión temporal y medio líquido para la micropropagación de agave en comparación al proceso tradicional aportando información para el establecimiento de protocolos de cultivo optimizados para el cultivo de agave.

## 2. Antecedentes

### 2.1 El agave

#### 2.1.1 Taxonomía y distribución.

El agave es una planta suculenta monocotiledónea (Gross et al., 2013). El número de especies incluidas en *Agave* ss, varía dependiendo de cómo se delimite, pero se estima que existen alrededor de 265 especies, los cuales se dividen en tres subgéneros reconocidos *A. sub. Agave*, *A. sub. Littea* y *A. sub. Manfreda* (Thiede et al., 2019). El Agave se encuentra distribuido alrededor del mundo, pero especialmente entre el norte de México, el sur de los Estados Unidos y Colombia (García-Vidal et al., 2003).

Estudios de reloj molecular rastrean su origen en América de 8 a 10 millones años atrás y en base a los rangos de evolución de dos genes diferentes se puede identificar un pico de especiación que coincide con las condiciones climáticas secas en el centro de México (Jiménez-Barron et al., 2020). El 75% de las especies de agave a nivel internacional son endémicas del país, la plasticidad genética, tolerancia ecológica, capacidad de dispersión y la variabilidad de interacciones con otros organismos, entre otros, son algunos de los factores que favorecen esta distribución (Good-Avila et al., 2006).

#### 2.1.2 Fisiología

Las plantas de agave pueden llegar a medir 1.8 cm de alto, tienen forma de roseta rodeada de gruesas hojas lanceoladas que terminan en punta, y llega a pesar 250kg (García-Moya et al. 2010). Regularmente las plantas de agave tienden a formar un sistema de raíces fibrosas adventicias que surgen a partir de la base del tallo, generalmente son poco profundas, permaneciendo verticalmente dentro de los 40 cm superiores del suelo. Este sistema de raíces se compone de raíces ancla de 2-4 mm de diámetro y pueden extenderse hasta 5 m, estas se suberizan y a su vez, producen raíces secundarias pequeñas a lo largo de la longitud principal con varios pelos radiculares (Davis et al., 2010)

Los agaves tienen un tallo fibroso y grueso que actúa como almacén de carbohidratos para obtener energía. La mayoría de los agaves tardan alrededor de 5-8 años en alcanzar la madurez y su ciclo de vida se extiende hasta los 20 años, que es cuando culmina en la floración (Martínez S. et al., 2005).

El agave tiene dos formas de reproducción; asexual a través de brotes de meristemos apicales en rizomas que crecen alrededor de la planta madre generando nuevos individuos, o sexual que ocurre con la emergencia de largas inflorescencias que miden de 3-8 m de alto donde se da la producción de semillas que tienen una diseminación aérea (Piven et al., 2001).

Los agaves se caracterizan por su prevalencia en lugares donde escasea el agua, especialmente zonas áridas o semiáridas y muestran una alta eficiencia en el uso del agua y asimilación de carbono. Como consecuencia de sus características morfológicas y anatómicas; limitada superficie, volumen, baja conductancia cuticular y baja densidad de estomas, se minimiza la pérdida de agua (Gross *et al.*, 2013).

Adicionalmente, el agave se clasifica dentro de las plantas con metabolismo del ácido crasuláceo (CAM). En las plantas con metabolismo CAM o C4 (Figura 1), la enzima PEPCase captura el CO<sub>2</sub> atmosférico en las células del mesófilo. En las plantas CAM, esto ocurre en diferentes momentos durante la noche, cuando los estomas están abiertos y el malato se transporta y almacena en la vacuola. Durante el día, el malato almacenado se exporta al citosol y se descarboxila, liberando CO<sub>2</sub> que está disponible para la Rubisco en el cloroplasto para la fotosíntesis. En las plantas Agave, no se conoce la vía exacta para la descarboxilación del malato, pero los productos podrían ser piruvato o PEP, ambos liberan CO<sub>2</sub> para la fotosíntesis o pueden ser utilizados para la biosíntesis de productos de almacenamiento como fructanos y azúcares solubles (Nobel & Hartssock, 1978; Nobel & Hartssock, 1979; Borland *et al.*, 2014 Escamilla-Treviño, 2011).

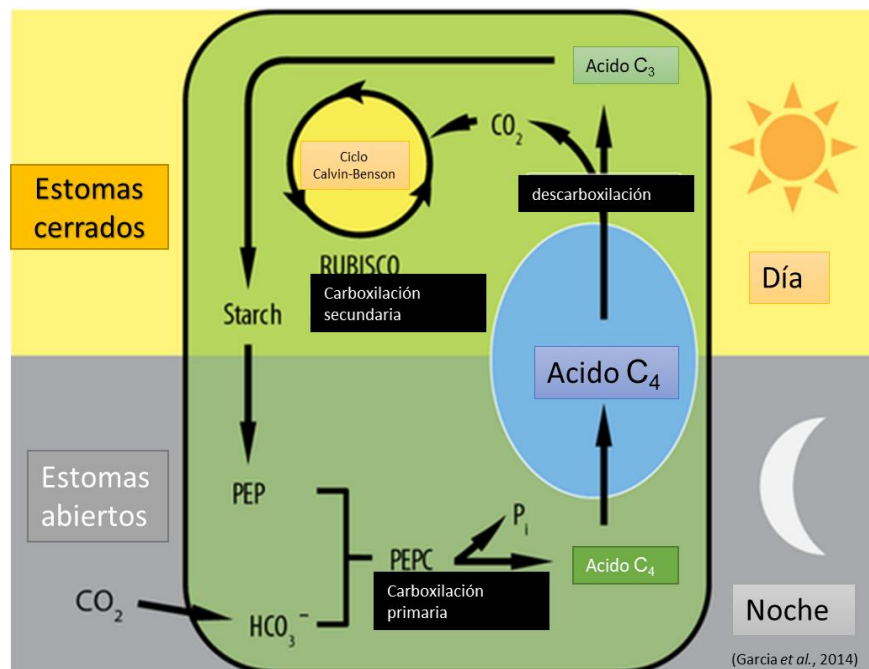


Figura 1. Diagrama general del metabolismo de las crasuláceas (CAM). Fase nocturna ingresa CO<sub>2</sub> por los estomas abiertos, se convierte en malato por el fosoenolpirvato carboxilasa (PEPC) y se almacena en la vacuola. Fase diurna, se produce CO<sub>2</sub> por la descarboxilación y uso de la ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa. Utilizando el CO<sub>2</sub> almacenado en la vacuola los estomas se mantienen cerrados (García *et al.* 2014).

## 2.2 Usos del agave

En México, el agave es la planta de mayor importancia, solo después del maíz, en el desarrollo cultural y agrícola (Plascencia de la Torre & Peralta G., 2018). Biológica, ecológica y económicamente la influencia del agave en la cultura mesoamericana representa un hito en el desarrollo y supervivencia de diferentes culturas de las civilizaciones indígenas (Pérez-Zavala *et al.*, 2020).

El agave era un alimento básico en la dieta tan temprano como 9000 años antes del presente, en el centro de México, incluso antes de que el maíz y los frijoles fueron domesticados. Se ha documentado su uso prehistórico como plantas silvestres y cultivadas para alimento, fibra y para bebidas fermentadas donde el cultivo de agave continúa como parte de sistemas agrícolas tradicionales y comerciales en la época moderna (Parker *et al.*, 2010).

En la actualidad, además de los usos tradicionales, se han investigado y desarrollado nuevas aplicaciones para el agave. Se han identificado *A. rzedowskiana*, *A. impressa*, *A. ornithobroma*, *A. schidigera* y *A. angustifolia* y *A. tequilana* como especies con actividad antibacteriana y antioxidante (Ahumada-Santos *et al.*, 2013). En 2010 las investigaciones de Mousumi *et al.*, demostraron la efectividad de *A. sisalana* para reducir la presión arterial, como antiséptico y su capacidad para detener el crecimiento bacteriano en el estómago.

En *A. ornithobroma*, una de las especies de agave con más diversidad de fitoquímicos, se han investigado las propiedades inmunomoduladoras, antifúngicas, anti parasíticas y antiinflamatorias de varios de sus metabolitos, como triterpenos, esteroides, taninos, cumarinas volátiles, flavonoides, alcaloides y cardiotónicos (Nava-Cruz *et al.*, 2014).

*Agave spp.* se ha utilizado como fuente para la producción de cortisona ya que la hecogenina, una saponina presente en hojas maduras de *A. sisalana* puede ser utilizada para manufacturar cortisona a gran escala (Tewari *et al.*, 2014).

Fructooligosacáridos presentes en *A. salmiana* favorecen el crecimiento de probióticos. Investigaciones recientes realizadas por Martínez-Gutiérrez *et al.*, (2017), mostraron que el crecimiento de *Lactobacillus acidophilus* en sustrato con *A. salmiana* disminuye el pH y aumentan la producción de lactato.

La demanda de fibras de plantas naturales ha experimentado un crecimiento rápido en el mercado en años recientes ya que existen considerables ventajas comparadas con fibras tradicionales, incluyendo, baja densidad, menor costo, prevalencia, procesamiento sencillo y bajo impacto ambiental. Investigaciones recientes se han enfocado en los beneficios del uso de fibras naturales provenientes del agave para el reforzamiento de algunos materiales (El Oudiani *et al.*, 2017).

Fibras de *A. americana* extraídas de la corteza de la planta han sido utilizadas como refuerzo de compuestos poliméricos (Madhu *et al.*, 2020). Se han desarrollado

resinas termoplásticas como polietilenos lineales de baja densidad y de alta densidad y polipropileno reforzado con distintas relaciones de fibras crudas de agave, obteniendo materiales con alta elasticidad y alta tolerancia al estrés (Annandarajah *et al.*, 2018).

Estudios actuales investigan el efecto de métodos de modificación como ultrasonido o tratamiento con plasma en fibras de *A. tequilana*, para la producción de materiales biodegradables y películas de almidón hidrofóbicas (Sifuentes-Nieves *et al.*, 2021).

El agave tiene potencial como materia prima bioenergética además de diversas ventajas como bajo consumo de agua, alta productividad en tierra semiárida, tolerancia a las temperaturas y resistencia a sequía gracias a su metabolismo CAM (Pérez-Pimienta *et al.*, 2017). *A. deserti* y *A. americana* tienen un alto potencial de conversión en biocombustibles y se plantean como una alternativa que puede ayudar a satisfacer la enorme demanda de transporte con baja emisión de carbono ya que son ricas en fructanos con un rango de 96 a 314 g/L de fructuosa y glucosa fermentable (Lu & Wyman, 2021).

Actualmente el pretratamiento de agave es el enfoque para la producción de biocombustibles, incluyendo tecnologías especiales para la remoción de lignina para aumentar el rendimiento de escarificación y fermentación. Adicionalmente, estos procesos de producción de biocombustibles obtenidos a partir de agave como etanol, n-butanol, metano e hidrogeno incluyen cierto valor agregado a los productos como enzimas, ácido láctico y ácido succínico en altas cantidades (Mielenz *et al.*, 2015).

Usos alternativos también incluyen la biorremediación, fibras de *A. angustifolia* se usan como materia prima para la remoción de metales pesados de agua a través de procesos de bioadsorción. *A. angustifolia* representa una estrategia de bajo costo y viable debido a que se utilizan desechos de la producción de tequila (Flores-Trujillo *et al.*, 2020). El uso de hojas de *A. tequilana* como sustrato de cultivo mejora la capacidad de degradación de *Fusarium verticillioides* de lindanos, eliminando la fase *lag* de crecimiento, viabilidad y aumento de pH del medio que ayuda a evitar la toxicidad de los derivados de ácido benzoico que se liberan durante la degradación del lindano (Guillén-Jiménez *et al.*, 2012).

De igual forma, el bagazo de agave se ha utilizado para la fabricación de nanofibras de celulosa. Estas nanofibras se han aplicado a procesos de purificación de agua, ayudando a la remoción de hasta un 27% de ciprofloxacina que es un contaminante emergente de la industria farmacéutica (Rangel, 2019).

Existe un gran interés en la inulina y jarabes de alta fructuosa debido a sus beneficios ya que tienen un bajo índice glicémico además de funcionar como prebiótico intestinal. Subproductos de agave son ricos en polisacáridos de tipo inulina e inulinasas que son enzimas necesarias para la producción de jarabes fructuosados (Cruz-Guerrero *et al.*, 2009).

### **2.2.1 Producción de Agave en México**

En México las bebidas alcohólicas tradicionales obtenidas a partir del agave han tenido un considerable impacto en la vida cotidiana, obteniendo reconocimiento nacional e internacional. Para su producción, se explotan diversas especies de agaves en la industria de bebidas alcohólicas no destiladas y destiladas volviendo a México un centro importante de domesticación y diversidad en numerosos cultivos (Colunga-García & Zizumbo-Villarreal, D. 2006).

Se tienen registros de bebidas fermentadas de agave desde el primer contacto europeo, donde se reconoce que existían dos tipos de bebidas culturalmente significativas; una elaborada con la inflorescencia de agave típica de la zona centro de México y otra usando los jugos de los tallos de agave, típico de la zona oeste (Zizumbo-Villareal *et al.*,2009).

Durante los últimos años el cultivo del agave para la producción de mezcal en México, se ha convertido en una actividad agrícola cada vez más importante. El valor promedio anual del agave ha aumentado a una tasa del 19.76% desde 2013 (Fonseca Varela & Chalita Tovar, 2021). Según cifras del consejo regulador del tequila CRT, las exportaciones tequileras incrementaron 29.7% en comparación con enero del 2021, al pasar de 20.5 a 26.6 millones de litros (CRT, 2023.)

En la explotación a nivel comercial, el cultivo del agave se concentra principalmente en agave pulquero, mezcalero y tequilero (Guzmán-Pedraza & Contreras-Esquivel, 2018), (figura 3). Debido a la demanda de consumo, la producción de mezcal se limita a determinados estados del país, principalmente el estado de Oaxaca (COMERCAM 2022). Regionalmente los estados de Michoacán, Guanajuato, Jalisco y Nayarit se concentra el cultivo de agave tequilero, mientras que la

extensión territorial de centro y norte se especializa en el cultivo de agave pulquero (Guzmán-Pedraza & Contreras-Esquivel, 2018).

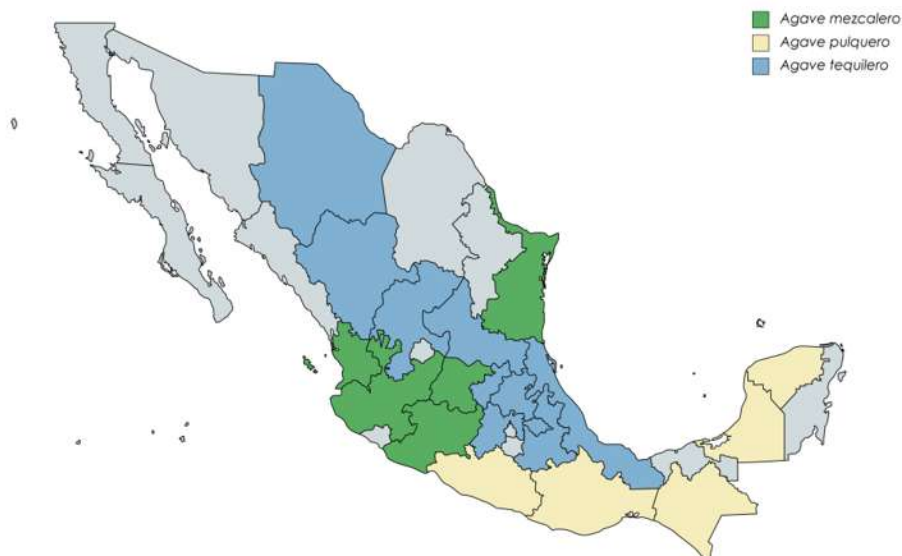


Figura 2. Distribución por región de los principales tipos de agave aprovechados comercialmente en México (Guzmán-Pedraza & Contreras-Esquivel, 2018, COMERCAM 2022) .

### 2.3 Producción de agave en Michoacán

Se calcula que en Michoacán hay más de siete millones de plantas de agave, 500 productores de agave, con una producción de 800 mil litros de tequila y 300 mil litros de mezcal (Salinas & Alcaraz, 2021). Aproximadamente el 12.5 % sólo lo cosecha, pero también realizan prácticas de selección de agaves para producción de semillas, propagación de agaves en viveros y trasplante de las plantas entre otras (Figueredo *et al.*,2014).

#### 2.3.1 *A. cupreata*

En Michoacán la especie mezcalera más cultivada es *A. cupreata*, una especie endémica de la cuenca del río balsas, prevalecen en ecosistemas secos como el bosque tropical seco, considerados entre aquellos más afectados por la deforestación, invasión y cosecha ilegal (Aguirre-Dugua & Eguiarte, 2013).

Las plantas de *A. cupreata* tienen forma de roseta simple, caulescente, verde brillante con hojas lanceoladas con el margen crenado. Sus flores son amarillas tubulares de 55 a 60 cm de largo y están dispuestas en inflorescencias comúnmente

llamadas escapos, alcanza la madurez sexual entre los 7-15 años (Avendaño-Arrazate *et al.*, 2015).

Se ha observado que *A. cupreata* no produce bulbos o brotes laterales como otras especies de Agave (Gentry, 1982), y para su reproducción dependen totalmente de la producción de semillas. Las semillas se encuentran en capsulas localizadas en las puntas de las inflorescencias y son dispersadas vía aérea. Un individuo de *A. cupreata* puede producir hasta 50 000 semillas viables con una tasa de germinación del 95% (Aguirre-Dugua & Eguiarte, 2013).

Al igual que otras especies de agave, *A. cupreata* se cultiva por su piña, el gran tallo bulboso que se cosecha para la producción de mezcal y otras bebidas alcohólicas. Las piñas de *A. cupreata* se cosechan típicamente cuando la planta tiene alrededor de 8 a 12 años y pueden pesar hasta 50 kilogramos (Sánchez-González *et al.*, 2020).

*A. cupreata* es conocida por su perfil de sabor complejo, que se caracteriza por notas de humo, tierra y fruta. A menudo se describe como teniendo un aroma dulce y floral, con un sabor ligeramente amargo y ahumado que perdura en el paladar. Este perfil de sabor se debe en parte a las condiciones de crecimiento únicas en las que se cultiva *A. cupreata*, así como a los métodos de producción tradicionales utilizados para hacer mezcal de esta especie (Méndez-Rodríguez *et al.*, 2018)

A pesar de su perfil de sabor único, *A. cupreata* es relativamente desconocida fuera de México y no se cultiva tan ampliamente como algunas otras especies de agave. Esto se debe en parte al hecho de que es más difícil de cultivar que algunas otras especies, requiere condiciones de crecimiento específicas y un período de maduración más prolongado antes de que se puedan cosechar las piñas. Sin embargo, *A. cupreata* está ganando popularidad entre los aficionados al mezcal y cada vez se busca más por su perfil de sabor único y su significado cultural (Vargas-Ponce *et al.*, 2009).

En la actualidad la especie también enfrenta amenazas por la pérdida de hábitat, la sobreexplotación y el cambio climático. Como resultado, ha sido clasificada como "vulnerable" por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) y está protegida por la ley mexicana, algunos de los esfuerzos de conservación que se han hecho para proteger la especie incluyen el establecimiento de áreas protegidas, así como programas para promover prácticas de cosecha sostenible y fomentar el cultivo de *A. cupreata*. (Reyes-Chilpa *et al.*, 2018).

### **2.3.1 Manejo del *A. cupreata* en Michoacán**

Debido a ciclo de vida de los agaves, las tasas de crecimiento de poblaciones silvestres son menores del 3-5% anual, lo que se agrava tomando en cuenta la disminución de polinizadores. Se ha reportado que en regiones como Oaxaca y Guerrero poblaciones silvestres de *A. cupreata* están en riesgo de desaparición a mediano plazo (Avendaño-Arrazate *et al.*, 2015).

En Michoacán los agaves crecen naturalmente en los bosques regionales y aunque algunas comunidades han comenzado a cultivarlos en los últimos 20-25 años, se ha olvidado la necesidad de asegurar una provisión sostenible de la materia prima del mezcal (Torres *et al.*, 2015).

Las poblaciones silvestres de *A. cupreata* están siendo diezgadas debido a que los individuos maduros se cosechan justo antes de su floración, cuando la concentración de azúcar está en su máximo, para producir mezcal en destilerías artesanales (Martínez-Palacios *et al.*, 2011), lo cual evita la reproducción natural de la especie.

Los productores tradicionales de mezcal, liderados por la demanda del mercado, han excedido sus capacidades de producción pequeña y tradicional, causando una extracción excesiva de sus recursos silvestres y cultivados, así como de otros materiales esenciales necesarios para la producción de mezcal, particularmente leña y agua de manantial. Los programas gubernamentales no tienen en cuenta ni los problemas de suministro de recursos, los programas y las normas de gestión de las poblaciones de agave silvestre, ni el establecimiento de agaves y plantaciones de especies leñosas (Torres *et al.*, 2015). Por lo tanto, los estudios para establecer las bases de una producción sostenible a largo plazo son una prioridad en Michoacán y otras áreas de México.

Debido a su lento crecimiento, y a las particularidades de su ciclo vital, los agaves son especies difíciles de manejar. El cultivo de agave por métodos convencionales en el campo o en el invernadero requiere grandes áreas e inversión financiera. Las áreas de plantaciones comerciales están aumentando, por lo tanto, la necesidad de un mayor número de plantas sanas y de calidad están entrando en alta demanda. El manejo agrícola involucra el control del estrés biótico, como enfermedades, insectos o plagas. Las suculentas como el agave son muy susceptibles a pudriciones causadas por bacterias y hongos (Delgado-Lemus *et al.*, 2014).

Ya que la mayoría de los agaves son propagados a través de los rizomas y brotes axilares que se desarrollan a la periferia de la planta madre, que se producen en mayor medida cuando las inflorescencias han fallado en producir semillas viables. se buscan herramientas que puedan reproducir el proceso de forma más rápida, fácil y a bajo costo (Rodríguez-Garay & Rodríguez-Domínguez, 2018).

#### **2.4 Cultivo de tejidos: propagación *in-vitro***

Existen herramientas biotecnológicas desarrolladas para satisfacer las demandas del mercado, estas técnicas facilitan la manipulación de germoplasma, que incluye: reproducción clonal, generación de genotipos novedosos, adquisición de metabolitos, almacén y protección de recursos genéticos (Domínguez Rosales *et al.*, 2008).

Sin embargo, debido a sus ventajas, la propagación *in-vitro* también conocida como micropropagación, es la principal técnica utilizada para la generación de millones de plántulas de diferentes especies cada año (George *et al.*, 2008). Este método se considera eficiente, ya que permite que cualquier órgano y tejido de las plantas obtenida de un cultivo pueda ser utilizado como material de multiplicación. La micropropagación combina rendimiento y estabilidad, además se caracteriza por un poseer ritmo de crecimiento más rápido y una mejor condición. En investigaciones de Kulus (2014), se señala que algunas suculentas tardan en crecer 1 cm en 4 años en la naturaleza o 3 años en el invernadero, mientras que, bajo condiciones *in-vitro* permite acelerar su crecimiento de tres a siete veces más.

El proceso consiste en tomar pequeñas piezas del individuo vegetal a las cuales se les denomina explantes, para colocarlas en medios nutritivos sintéticos, asépticos, y en ambientes estrictamente controlados (García-Mendoza & Chávez-Rendón, 2013). Y aprovecha el potencial de totipotencialidad, que es la capacidad de crecimiento celular y desarrollo de organismos multicelulares (Gupta *et al.*, 2020).

A través de factores exógenos (hormonales, ambientales y nutricionales las células de los explantes adquieren una nueva condición, donde la capacidad de división puede ser readquirida (desdiferenciación). Luego de este estado se pueden expresar nuevos patrones de diferenciación celulares que pueden llevar a la formación de nuevas estructuras organizadas, en un proceso morfogénico que ocurre *de novo* denominado organogénesis (Amoo *et al.*, 2009)

En general, el proceso de micropropagación se divide en seis etapas distintas:

a) Elección del explante; dónde se selecciona una planta con caracteres deseables para su propagación. b) Desinfección; a partir del material vegetal seleccionado en la etapa a, se toma una parte específica llamado explante, esta se desinfecta y se cultiva en condiciones asépticas. c) Diferenciación y multiplicación de los explantes a ser micropropagados, que requiere las concentraciones de nutrientes y reguladores de crecimiento adecuadas para optimizar el desarrollo del vegetal en las condiciones mencionadas. El objetivo de esta etapa es permitir y aumentar rápidamente el número de propágulos a través de embriogénesis somática, brotes axilares o formación adventicia de brotes, el material se puede someter a diversos ciclos subcultivándolo en medio de proliferación o pasar directamente a la siguiente etapa. d) Enraizamiento de explantes micropropagados; En esta fase, la planta se acondiciona para generar raíces para su trasplante, esta etapa es fundamental para generar estructuras morfológicas capaces de resistir el cambio a condiciones *in vitro*. e) Aclimatación de las plantas obtenidas, que requiere estudiar la óptima composición del sustrato a utilizar, ensayando suelo y mezclas para cultivo, previo al trasplante definitivo al suelo, En esta etapa las plántulas se adaptan a condiciones *in vivo*, en algunos casos, se puede llegar a desarrollar por completo el sistema radicular de la planta durante esta etapa (Torres, 1989; Krikorian, 1995; Bhojwani & Dantu, 2013; Amine Mazri & Meziani, 2015).

Las técnicas de micropropagación han permitido el avance en la biotecnología vegetal. Se han desarrollado estudios de control químico y hormonal de la regeneración celular que han permitido establecer conocimiento de aspectos básicos y aplicados de la organogénesis y embriogénesis somática. Como resultado de estos avances, se ha desarrollado la micropropagación práctica y producción de plantas libres de virus, generación plantas haploides, cultivo y regeneración de protoplastos, producción de metabolitos secundarios o cultivo celular a gran escala en biorreactores, entre otros (Loberant, & Altman 2010).

Uno de los principales factores que afectan negativamente los cultivos y provoca grandes pérdidas económicas es la contaminación ya sea por bacterias u hongos. Estos microorganismos limitan la producción, son difíciles de eliminar y se propagan rápidamente. La micropropagación mantiene el material en condiciones axénicas durante todo el proceso, lo que da origen a plantas libres de enfermedades (Sharaf *et al.*, 2011).

Adicionalmente, semillas con baja viabilidad o germinación retardada pueden ser tratadas para romper el estado de dormancia. La micropropagación hace uso de técnicas simbióticas como sistemas de micorrización o asimbióticas, como pretratamientos de escarificación o imbibición para mejorar el rendimiento de germinación de especies problemáticas como *Pistacia vera* L. (Benmahioul, 2017), *Amomum tsao-ko* (Khuat *et al.*, 2022) o *Primula species* (Li *et al.*, 2018).

## **2.5 Factores que influyen en la micropropagación**

### ***Medio de cultivo.***

El medio de cultivo tiene una influencia importante en el crecimiento de los explantes ya que la modificación del medio facilita diversas respuestas en el desarrollo. Existen distintas composiciones empleadas como medio basal; medio Gamborg B5 y B5 modificado, medio WPM (Woody Plant Medium), medio Driver y Kunyuki para especies leñosas, pero el medio más común es el medio Murashige & Skoog o medio MS (Pérez-Tornero & Burgos, 2000). El medio MS contiene una combinación de macro y micro nutrientes que aportan los minerales necesarios e importantes para el desarrollo de células vegetales (Murashige & Skoog 1962).

### ***Fuente de carbono***

El medio de cultivo suplementado con sacarosa es la fuente de carbono más utilizada debido a su bajo costo, accesibilidad, estabilidad a altas temperaturas y es fácilmente asimilable para las plantas. Además de la sacarosa, la fructuosa y glucosa también ha demostrado capacidad para aumentar la longitud de brotes (Phillips & Garda, 2019). Por otra parte, la adición de sulfato de adenina o extracto de levadura favorece la formación de callo y reduce la necrosis y oxidación de los brotes (Hassan & Zayed, 2018).

### **Reguladores de crecimiento.**

El uso de reguladores de crecimiento es parte integral de la micropropagación ya que aumentan la producción y calidad de las plantas. Los reguladores de crecimiento son compuestos químicos que modifican o regulan procesos fisiológicos (Gupta et al., 2020). Tienen acción específica, son fácilmente asimilables y viajan fácilmente a través de los tejidos cuando se usan en concentraciones bajas. Hay diversas clases de reguladores como; citocininas, auxinas, giberelinas, etileno y ácido abscísico (Mahaveer Suman *et al.*, 2017). Las auxinas en niveles elevados favorecen la formación de meristemas *del novo* en brotes ya que son necesarias para la división celular y desempeñan funciones importantes en el establecimiento y la actividad de los meristemas de raíces o brotes, promueven la división celular, así como su diferenciación (Hill & Schaller, 2013). Las plantas producen auxinas de forma natural como ácido indol butírico (IBA) y ácido indol-3-acético (IAA). Estas auxinas se producen típicamente en las raíces y tallos de las plantas. Sin embargo, en la micropropagación se suelen utilizar auxinas sintéticas como 2, 4-diclorofenoxiacético (2, 4-D) y ácido naftaleno acético (NAA) (Yasmin *et al.*, 2022).

Las citocininas controlan numerosos procesos fisiológicos y de desarrollo de las plantas. La elección de la citocininas es uno de los factores más críticos en el desarrollo de protocolos para el cultivo *in-vitro* de plantas. La N6-benciladenina (BA) es actualmente una de las citocininas más utilizadas, debido a su eficacia y costo relativamente bajo (Faisal et al., 2018). Sin embargo, el uso de esta citocininas en procedimientos de micropropagación puede producir trastornos fisiológicos como hiperhidricidad, necrosis apical, senescencia, inhibición de enraizamiento y problemas de aclimatación. Estos han requerido la búsqueda de alternativas a BA para mantener tasas de proliferación razonables y una calidad de planta aceptable. El descubrimiento de un nuevo grupo de citocininas aromáticas, las topolinas, ha abierto nuevas posibilidades para su uso en la micropropagación de numerosas especies. Estos compuestos pueden considerarse una alternativa a la N6-benciladenina (BA), la trans-zeatina (tZ), la N6-isopenteniladenina (iP) y la kinetina (KIN) (San José *et al.*, 2021).

En el cultivo celular vegetal el balance entre las auxinas y las citocininas controla el crecimiento *in-vitro* y la respuesta de diferenciación en los tejidos vegetales. La alteración de los niveles de auxinas aplicadas exógenamente o combinaciones de auxinas y citocininas en el medio de cultivo estimula la organogénesis indirecta, la formación de callo o generación de embriones somáticos a partir de explantes (Sharma., 2017).

Por ejemplo, *A. fourcroydes* se ha cultivado *in-vitro*, pero ha mostrado un comportamiento recalcitrante durante las etapas de multiplicación y enraizamiento. La combinación de 6-bencilaminopurina (BAP) (0,75 mg/L) y ácido indolbutírico (IBA) (1,0 mg/L) en lugar de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) mejoró significativamente la supervivencia y la producción de explantes durante el

establecimiento de brotes. La combinación de tiazurón (TDZ) (0.5 o 0.75 mg/L) con BAP (1.0 mg/L) e IBA (1.0 mg/L) en el medio basal aumentó la tasa de multiplicación del henequén y aceleró significativamente la ruptura de la latencia de las yemas. Para mejorar el enraizamiento de los brotes micropropagados, se probó la adición de IBA y ácido naftilacético (NAA). La mejor eficiencia de enraizamiento se obtuvo cuando se complementó el medio basal con 0.5 o 0.75 mg/L de NAA, dando un 100% de explantes enraizados y un promedio de 9.40 y 11.55 raíces por explante, respectivamente (Vilchez Perozo & Albany de Vilchez, 2014).

### **Agente gelificante**

Los rápidos avances en el área de la micropropagación han creado una creciente demanda por agentes gelificantes. El medio de cultivo sólido o semisólido más utilizado son los sistemas que emplean agar o agarosa, pero en años recientes, nuevos agentes gelificante nuevos han sido introducidos. Por ejemplo, Plantgar™ o Phytigel™ (Bellini & Giordani, 1997). Recientes investigaciones proponen geles de alginato para la micropropagación, sin embargo, el uso de medios líquidos presenta una ventaja por su facilidad de manejo y bajos costos (Draget *et al.*, 1989).

### **Aeración y humedad**

La respuesta de los tejidos vegetales *in-vitro* puede verse significativamente afectada por la capacidad de intercambio de gases y el constituyente gaseoso en el recipiente de cultivo. Las investigaciones actuales identifican al dióxido de carbono, oxígeno y etileno como los constituyentes más influyentes en el desarrollo del explante se ha llegado a la conclusión que la humedad relativa óptima en el recipiente debe ser de 98%-100% (Gupta *et al.*, 2020)

### **Luz**

Aunque la luz solar natural se puede utilizar como fuente de energía para los cultivos de micropropagación *in-vitro*, el uso de lámparas de luz fluorescentes blancas es más extendido ya que se puede controlar con facilidad el tiempo y exposición de los explantes a la luz (Kodym & Zapata-Arias, 2001). Recientemente, los diodos de emisión de luz (LED) utilizados de forma controlada con un PPF a 50  $\mu\text{M m}^2/\text{s}$  se han señalado como posibles fuentes de luz. Los LED presentan ventajas como longitud de onda específicas, pequeñas, larga vida útil, bajo calentamiento y altamente eficientes en el proceso de generación de luz, además de ser amigables con el ambiente por la ausencia de mercurio u otro elemento peligroso (Rocha *et al.*, 2015).

Los LED mixtos, en particular 50 % de luz roja más 50 % de luz azul, mejoraron el crecimiento de las plantas propiciando un aumento notable de la biomasa de brotes y raíces en estudios realizados en brotes de arándanos micropropagados con  $12.7 \pm 0.6$ – $13.0 \pm 0.6$  y  $3.6 \pm 0.2$ – $3.7 \pm 0.2$  mg respectivamente. Estos estudios realizados por Hung *et al.*, 2016 revelaron que el uso exclusivo de LED rojos monocromáticos inhiben la acumulación de clorofila ( $5.2 \pm 0.3$  SPAD) en comparación con LEDs 80:20 rojo/azul ( $6 \pm 0.3$  SPAD), azules ( $6.8 \pm 0.3$  SPAD) o 1:1 rojo/azul ( $6.3 \pm 0.3$  SPAD).

## **Temperatura**

Concurre poca investigación sobre el efecto de la temperatura en el desarrollo de micropropagación *in-vitro*. Se ha señalado que existe una interacción entre la temperatura del medio y la asimilación reguladores de crecimiento por parte de la planta, asimismo se ha determinado que la temperatura de almacenamiento influye varios procesos fisiológicos como la respiración y la fotosíntesis (Islam *et al.*, 2005). En agave la temperatura de crecimiento óptima ronda entre los 20°C y 27°C, pero varía dependiendo de la especie que sea cultivada (García-Pérez & López, 2015).

### **2.6 Enraizamiento y adaptación a condiciones *ex-vitro***

En la micropropagación la fase de enraizamiento de los explantes es regularmente, problemática. Durante la micropropagación convencional existen varias especies recalcitrantes a la formación de raíz y la pérdida de las plantas en esta fase, se traduce en extensas pérdidas económicas (Klerk, 2002).

Los procesos de enraizamiento se concentran en la aplicación de fitohormonas, especialmente auxinas para inducir la respuesta (Newell *et al.*, 2006). Estos métodos requieren de una mano de obra intensa que aumentan el costo de producción, en la mayoría de los casos el desarrollo de los explantes se ve limitado a causa del bajo porcentaje de enraizamiento. Generalmente el éxito de la fase de enraizamiento depende de diversos factores, como la edad del brote, genotipo, el tipo de auxina, concentración y el microambiente (Leva., 2011).

La investigación enfocada al proceso de formación de raíces adventicias desde el punto de vista práctico tiene gran importancia en el proceso de micropropagación (Klerk, 2002). Se han estudiado los diferentes estadios de desarrollo de la organogénesis radical. En este proceso se han distinguido dos pasos tempranos del desarrollo para la formación de raíces adventicias que son: la competencia y la determinación (Mohnen, 1994).

Se define la "competencia" para la formación de raíces, como la habilidad de las células de un tejido para responder a estímulos específicos inductores de rizogénesis con la subsiguiente formación de raíces. Una vez que las células o tejidos competentes han sido expuestos a un inductor, los tejidos pueden determinarse para la formación de raíces. Por otro lado, la "determinación" se define como el compromiso de las células a un destino específico del desarrollo. Cuando una célula o grupo de células ha recibido una señal para la formación de raíz, ellas quedarán comprometidas a formar raíces aún después de removida la señal, es decir que la rizogénesis continuará en la ausencia del factor inductor (Mohnen, 1994; Gaspar *et al.*, 1992).

Colectivamente, el proceso de enraizamiento puede realizarse tanto en condiciones *in-vitro* como *ex-vitro*.

La metodología para el enraizamiento *ex-vitro* consiste en sumergir los brotes en una solución con auxina durante un periodo corto de tiempo (1min) seguido de la propagación en condiciones de invernadero o campo (Borkowska, 2001).

El enraizamiento de brotes *in-vitro* consiste en el cultivo continuo de los brotes en varios tipos de sustratos y reguladores de crecimiento para promover la rizogénesis. Los sustratos incluyen: medio solidificado con agar, perlita y/o vermiculita humedecida con medio nutritivo o agua (Yan *et al.*, 2009).

El uso de agar para el enraizamiento presenta ventajas y desventajas. Por un lado, en especies forestales, el uso de agar propicia una rizogénesis más sincrónica como resultado del contacto directo con el medio de cultivo. Sin embargo, las raíces producidas por este proceso, son delgadas y no llegan a formar raíces más maduras, adicionalmente, el agar es fuertemente asociado con la generación de callo en la base de los explantes que provoca el establecimiento de conexiones vasculares irregulares entre raíces y brotes (McClelland *et al.*, 1990). Estas condiciones anormales dan como resultado la formación de plántulas de morfología, anatomía y fisiología anormales y después de la transferencia a condiciones *ex-vitro*, estas plántulas pueden verse fácilmente afectadas por cambios repentinos en las condiciones ambientales, por lo que necesitan un período de aclimatación extra para corregir las anomalías (Pospóšilová *et al.* 1999).

Una vez que los brotes han formado raíces, se someten a un proceso de aclimatación antes de ser trasladadas a condiciones de invernadero o a campo. Generalmente, transferirlos de un medio rico en nutrientes, reguladores de crecimiento y humedad saturada, a un sustrato no estéril con temperatura y humedad relativa no controladas representa un reto. Las plántulas, aún no realizan la fotosíntesis e inicialmente su nutrición i depende de las reservas que han acumulado (Sánchez *et al.*, 2020). Para este proceso se reduce gradualmente la humedad relativa o la cantidad de niebla en el contenedor al tiempo que se mantiene los niveles de luz a 50% de sombra. Si las plántulas enraizadas no se han adaptado lo adecuadamente con frecuencia muestran signos de estrés, incluyendo marchitez, necrosis marginal y de punta de las hojas, y la muerte de hojas o plantas enteras (Preece & Sutter, 1991).

En plántulas de *A. fourcroydes*, se ha observado que el tiempo de aclimatación es después de los 30 días, cumplido este periodo, las plantas son capaces de desarrollar procesos fotosintéticos autónomos favoreciendo no solo la tasa de supervivencia, también el crecimiento y desarrollo ya que las condiciones climáticas más cálidas los favorecen (Abreu, E. *et al.*, 2006). En *A. angustifolia* (Sánchez *et al.*, 2020) observaron que un proceso de aclimatación en condiciones de sombra y a los 60 d son suficientes para lograr un endurecimiento que permita un 100% de supervivencia.

## 2.7 Propagación *in-vitro* de agave

A partir de la década de 1980, el uso de la micropropagación se ha ido popularizando y se ha utilizado cada vez más en el cultivo del agave. Tal es el caso de *A. arizonica* y *A. victoria-reginae* que son especies amenazada, para favorecer ciertos caracteres agronómicos de interés o transformación genética usando técnicas moleculares. En el caso de la industria de bebidas alcohólicas el mantenimiento y producción de ciertos genotipos (Bautista-Montes et al., 2022).

Se han desarrollado protocolos por la regeneración indirecta en *A. tequilana* por organogénesis a partir de segmentos de hojas y tejido meristemático como explantes. También se ha logrado la generación de callo en medio MS suplementado con NAA. Los brotes enraizados en medio libre de fitorreguladores aclimatados en invernadero con un 100% de supervivencia (Valenzuela-Sánchez et al., 2006).

En *A. fourcoydes* se ha desarrollado un protocolo de micropropagación por cortes de estolones, además de generación de callo. Este callo mostró una limitada capacidad de organogénesis, pero cuando se expuso a concentraciones más altas de citocininas, se lograron inducir brotes adventicios en los explantes. Los callos de rizomas formaron extensos sistemas de raíces que propiciaron un 60% de supervivencia cuando se trasladaron a condiciones *ex-vitro* (Robert et al., 1987).

Un protocolo de regeneración a partir de plantas de bulbos de *A. arizonica*, que es una especie extremadamente rara nativa de Arizona se ha desarrollado con el objetivo de conservarla. Los brotes adventicios obtenidos de callos cultivados en MS suplementado con 2,4-D (1.4  $\mu$ M). El enraizamiento de los brotes se llevó en medio MS basal y posteriormente trasladadas a macetas con sustrato arenoso (Powers & Backhaus, 1989).

De igual forma en 2018 como estrategia de rescate y conservación para la *A. marmorata* Aguilar Jiménez and Rodríguez De la O desarrollaron un protocolo de propagación utilizando las auxinas 6-Bencil-adenina (BA) y ácido indol-3-acético (AIA) y se determinó que los mejores sustratos para la aclimatación de plantas de *A. marmorata* obtenidas *in-vitro* son las mezclas de *peat most* con agrolita o *peat most* con arena de río con un 100% de sobrevivencia.

Se han utilizado brotes de meristemas basales para la propagación de *A. bracteosa*, *A. chiapensis*, *A. difformis*, *A. nizandensis*, *A. obscura*, *A. ornithobroma*, *A. peacockii*, *A. titanota* y *A. victoria-reginae* donde distintas combinaciones de auxinas como Benciladenina (BA), 6- $\gamma,\gamma$ -Dimetilalilaminopurina (2iP), Cinetina (Cin), Tidiazurón (TDZ) y Metatopolina (MT) tuvieron una alta eficiencia en la generación de brotes a los 60 días (Domínguez Rosales et al., 2008).

Los cultivos generados por micropropagación también han sido utilizados para evaluar los efectos de contaminantes en agave bajo condiciones controladas.

Perales Aguilar *et al.*, 2020 determinaron que *A. celsii*, *A. chiapensis*, *A. obscura*, *A. palmeri* y *A. salmiana* generaron raíz en presencia de metales pesados. *A. chiapensis*, *A. obscura* y *A. palmeri* tienen capacidad de bioacumulación, especialmente en Mn. Mientras que *A. celsii* y *A. salmiana* generaron mecanismos de fitoestabilización y exclusión.

Aunque la propagación *in-vitro* de especies silvestres o híbridos de *Agave spp* ha sido objeto de estudio durante los últimos años, existe información escasa para la micropropagación de *A. cupreata*. Existe una especial importancia en la generación de cultivos *in-vitro* para *A. cupreata*. ya que su ciclo de vida es largo se reproduce exclusivamente por semilla (Avendaño-Arrazate. *et al.*, 2014). Por su importancia económica en la elaboración del mezcal es sobre utilizada para cubrir la demanda comercial. La investigación de cultivo de tejidos representa una buena alternativa biotecnológica para la generación de plantas de calidad a partir de individuos seleccionados, en el interés de la conservación de poblaciones naturales, y pueden sentar un precedente para mejoramiento genético.

## **2.8 Limitaciones actuales de la micropropagación y el cultivo en medio líquido.**

A partir del desarrollo de la micropropagación, se ha convertido en una herramienta importante para la producción a gran escala de plántulas de varias especies de plantas importantes que retienen la fidelidad genética y están libres de plagas. A lo largo de los años, la micropropagación de plantas resolvió muchos problemas fitosanitarios y permitió tanto la expansión como el acceso a plantas de alta calidad para cultivadores de diferentes países y niveles económicos, contribuyendo así de manera efectiva a una expansión agrícola en este siglo y el pasado (Honda *et al.*, 2001). Sin embargo, en el siglo XIX, la micropropagación se enfrenta a diversos retos que limitan su aplicación. Por ejemplo, los procedimientos requieren mucha mano de obra y son más especializados debido a los muchos pasos con manipulaciones manuales involucradas y la baja tasa de multiplicación. Aclimatación gradual de las plantas al invernadero y luego al campo. Estos numerosos pasos van acompañados de costos extensos y la comercialización se ha limitado a cultivos de gran valor económico (Cardoso *et al.*, 2018)

### **2.8.1 Contenedor de cultivo**

Las técnicas de micropropagación actuales utilizan contenedores de cultivo de tejidos, que generalmente están hechos de cristal o plásticos transparentes adecuados para permitir el paso de luz al interior (Kozai, 1991). El problema con estos contenedores es que se necesita un gran número de pequeños frascos, ya que el material vegetal requiere de trasplantes periódicos a medio fresco. Estos subcultivos se dan en un periodo de 4 a 6 semanas debido a un agotamiento de los nutrientes en el medio, así como también llevar un control del crecimiento y

proliferación que es limitado por el tamaño del contenedor del cultivo (Maene & Debergh, 1985). Esta labor generalmente ocupa del 40% al 60% de los costos de producción, por lo que se han adoptado medidas alternativas para la reducción de costos tales como el uso de botellas de mermelada como contenedores (Kozai *et al.*, 2010)

Los sistemas de micropropagación líquidos se presentan como una resolución a la problemática ya que se prescinden de los pequeños frascos de cultivo y se substituyen por contenedores diseñados para la optimización del cultivo. Desde contenedores sencillos que regulan la cantidad de oxígeno, hasta complejos biorreactores computarizados perfilados especialmente para la regeneración celular vegetal y su multiplicación (Berthouly & Etienne, 2005)

### **2.8.2 Los agentes gelificantes**

El cultivo de tejido vegetal por micropropagación fue utiliza mayoritariamente un medio con agar como gelificante. Desde un principio, el agar representa uno de los componentes más costosos del medio, sin embargo, no es un nutriente y al ser componentes no inertes en el medio no permiten una automatización fácil del proceso para escalarlo a producción en masa. (Etienne & Berthouly, 2002).

El uso de agente gelificante en el medio de cultivo no permite una distribución uniforme de los nutrientes y los reguladores de crecimiento limitando el crecimiento y disminuyendo su ritmo de proliferación, Además las plantas pueden llegar a presentar sensibilidad al tipo de gelificante, dificultando su selección y manejo (Rathore *et al.*, 2013). Otra desventaja común es que, al momento del traslado a condiciones *ex-vitro* el agente gelificante debe ser removido de las raíces antes del permitir un trasplante a condiciones de invernadero para prevenir la pudrición de las raíces. Este proceso puede dañar la raíz y aumenta las posibilidades de una infección (Simonton *et al.*, 1991).

Los matrices gelificantes y no gelificantes han sido probadas para mejorar la relación costo-eficiencia. De esa forma, se ha explorado la substitución el agar con medio líquido que simplifica el escalamiento a biorreactores, provee un contacto uniforme para el acceso a los nutrientes en el cultivo, puede ser renovado sin necesidad de cambiar el contenedor de cultivo, y se pueden emplear métodos de simples para la esterilización como la ultrafiltración (Watt M, 2012).

### **2.8.3 Aclimatación**

Las plantas micropropagadas no son capaces de sobrevivir el cambio de cultivo *in-vitro* a invernadero o condiciones de campo. Esto se debe a que en condiciones *ex-vitro* las plantas están expuestas a menor humedad relativa, mayores niveles de luz, sepsis y de estrés. La mayoría de las plantas crecidas *in-vitro* deben pasar por un proceso de domesticación para asegurar que sobrevivan y se desarrollen cuando se transfieran al suelo (Paek *et al.*, 2001).

El material vegetal micropropagado utilizando medio líquido tiene un mejor rendimiento durante la etapa de aclimatación que el material obtenido a través del medio sólido o semisólido. Los brotes no necesitan aclimatación adicional una vez trasplantados de condiciones de invernadero a campo, por lo tanto, requiere menos labor, químicos, y equipos (Koroch *et al.*, 1997).

## 2.9 Sistemas de micropropagación

### 2.10 Propagación en medio líquido

El sistema de cultivo en medio líquido ofrece muchas ventajas potenciales para la micropropagación, éste permite condiciones más uniformes, un fácil manejo para la renovación del medio, mantenimiento del contenedor de cultivo, puede ser esterilizado por microfiltración (Ahmadian *et al.*, 2017). Comparado con un cultivo en medio semisólido, el medio líquido permite el uso de contenedores más grandes con un tiempo de transferencia reducido (Alvard *et al.*, 1993)

El sistema de cultivo en medio líquido ofrece muchas potenciales ventajas sobre los cultivos sólidos o semisólidos, entre ellas; crecimiento rápido, fácil captación de nutrientes a través de los tejidos, dilución de inhibidores de crecimiento como los fenoles liberados por los explantes que limitan el crecimiento (Ahmadian *et al.*, 2017).

Varias investigaciones enfocadas en el uso de medio líquido para la micropropagación han confirmado grandes avances en la eficiencia y la producción. Se ha logrado la regeneración exitosa de microtubérculos de *Solanum tuberosum* y embriones somáticos de *Coffea arabica* (Akita & Takayama, 1994). En cultivos de *Mentha x piperita l.* (pimienta) el número de brotes producidos en contenedores con medio líquido suplementado con BAP (103.4 $\mu$ M) fueron significativamente mayores que aquellos producidos a través de medio semisólido, (40.7  $\mu$ M) (Vaidya *et al.*, 2019).

Rathore *et al.*, (2013) evaluó el rendimiento de la multiplicación de *Acacia nilotica* (L.) comparando su rendimiento en medio líquido con medio semisólido, dando como resultado un incremento de diez veces el número de brotes en medio líquido con 4.4  $\mu$ M de BAP durante 18 días.

En *Centaurium erythrae* se ha desarrollado un método de multiplicación a partir de brotes apicales usando medio Murashige and Skoog (MS) suplementado con ácido indol-3-acético (IAA) (0.1 mg l<sup>-1</sup>) y 6-bencilaminopurina (BAP) (1.0 mg l<sup>-1</sup>). Bajo estas condiciones se obtuvieron casi 60 brotes por explante en 4 semanas, tres veces más comparado con los brotes obtenidos en medio semisólido con agar utilizando las mismas concentraciones de hormonas (Piatczak *et al.*, 2005).

En *A. tobalá* (*A. potatorum* Zucc.), una de las especies utilizadas en la elaboración de mezcal, no se cuenta con suficiente producción para cubrir la demanda de esta especie, por lo que Correa-Hernández *et al.* (2022) evaluaron la un biorreactor de medio líquido de flujo y reflujo para micropropagación. Los resultados muestran que el biorreactor programado con una inmersión de 2 min cada 12 h, con un volumen de medio de cultivo de 50 mL y una frecuencia de suministro de aire de 2 min cada 12 h obtuvo los mejores parámetros de desarrollo en comparación con el medio semisólido con 29,60 brotes por explante, una longitud promedio de brote de 2,01 cm utilizando 3 mg/L de BAP, y 3 mg/L de AIA como reguladores de crecimiento.

Aún con la perspectiva de resultados prometedores, los sistemas de cultivo líquido no se han convertido en una técnica de rutina en la propagación de diversas especies de *Agave spp.* de significativa importancia económica ya que su uso no se ha extendido a laboratorios comerciales e investigación. Esto debido a que la micropropagación varía de una especie a otra y existen varios factores importantes que influyen considerablemente en el desarrollo de protocolos para la implementación en medio líquido. Además de la selección de plantas madre adecuadas, el establecimiento de cultivos asépticos, la multiplicación de explantes, el enraizamiento de brotes regenerados o la germinación de embriones somáticos y la etapa de aclimatación, es necesario ajustar y estandarizar tiempos de exposición, oxigenación, recirculación de medio, entre otros (Abdalla *et al.*, 2022).

Hasta la fecha, su uso se limita a la micropropagación de orquídeas, donde el medio líquido se emplea rutinariamente ya sea en las etapas iniciales del proceso de propagación o la formación de los cuerpos protocormos, los cuales consisten en pequeñas células que forman el ápice de brote y la parte basal conformada por grandes células parenquimatosas que funciona como un depósito orgánico (Nava *et al.*, 2011).

## **2.11 Micropropagación en biorreactores**

El biorreactor es un contenedor con un ambiente estéril que usa nutrientes líquidos o líquido/aire que fluye dentro y fuera del sistema. Está diseñado para cultivo a larga escala o intensivo, lo que provee la oportunidad para el monitoreo y control del microambiente modificando las condiciones, por ejemplo; agitación, ventilación y temperatura (Honda *et al.*, 2001).

El término “biorreactor” no está precisamente definido en lo que respecta a la producción de biomasa vegetal a gran escala. Sin embargo, en algunos casos los cultivos *in-vitro* se realizan en matraces Erlenmeyer, cajas Petri o cajas de cultivo y son llamados “biorreactores” (Ziv, 2010). El propósito de la aplicación de un biorreactor es finalmente facilitar las condiciones óptimas de cultivo ajustando los parámetros químicos y físicos, así lograr el rendimiento máximo y buena calidad de los propágulos. Otra ventaja es que un biorreactor busca reducir los costos de producción lo más posible al automatizar diferentes procesos, y, al mismo tiempo,

utilizar equipo de bajo costo, (Westphal, 1990). En los últimos años se ha enfocado la investigación en mejorar el diseño y las estrategias de producción a través de biorreactores, y se ha comparado su desempeño para multiplicación de brotes frente a medios gelificados. Fogaça *et al.* 2016, recomiendan el uso de SIT por su facilidad de operación en el proceso de multiplicación, recirculación del medio, construcción sencilla y bajo costo de cultivo a comparación del cultivo en medio semisólido.

Al día de hoy existen diferentes tipos de biorreactores, los cuales están a la venta o son reproducibles. La principal diferencia entre los sistemas es el tipo de contenedor y el mecanismo (sin agitación, mecánico, o neumático) con el que operan. Éstos se pueden dividir en sistemas de inmersión completa, por ejemplo, Sistema de cultivo vegetal automático, por sus siglas en inglés APCS y los de inmersión parcial, (RITA® Frascos Gemelos (BIT®) (Paek, K. *et al.*, 2005).

## **2.12 Sistemas de inmersión continua.**

Los sistemas de inmersión continua consisten básicamente en un tanque en agitación constante que es mecánicamente operado que consiste en un agitador interno y diferentes puertos para aireación, adición y remoción de medio para facilitar la circulación de medio, distribución de oxígeno y nutrientes, estos son frecuentemente en la regeneración de embriones somáticos, así como en la propagación de brotes axilares (Vidal & Sánchez, 2019)

El uso de los sistemas de inmersión continua permite que el tamaño de los biorreactores aumente adaptándose a contenedores más grandes (como los utilizados en la industria alimenticia), sin la necesidad de implementar material más especializado y reduciendo los costos de producción (Manmun *et al.*, 2015).

## **2.13 Sistemas de inmersión temporal (SIT)**

La principal desventaja del uso de medio líquido como medio de cultivo es que el constante contacto del material vegetal con el medio provoca la hiperhidricidad, lo que representa un serio obstáculo para la obtención de plantas con caracteres deseables, ya que la concentración de oxígeno en medio líquido es insuficiente para cubrir los requerimientos respiratorios de los tejidos sumergidos. La falta de oxígeno en células vegetales induce estrés oxidativo, con la producción de las especies reactivas de oxígeno (ROS) se generan daños en los tejidos (Alister *et al.*, 2005).

Por lo tanto, una solución a este problema es el contacto intermitente de las plántulas con el medio de cultivo en lugar de uno continuo. Se han descrito cuatro categorías dentro de los sistemas de inmersión temporal: I) Maquinas de balance o mecedoras, II) Inmersión total del material vegetal y renovación de medio, III) Inmersión parcial del material vegetal y renovación de medio, IV) Inmersión completa por transferencia de medio neumática con o sin renovación de medio (Ingram *et al.*, 2009). En general, el diseño de un biorreactor consiste en un contenedor autoclavable con una unidad de filtración y a través de una conexión se

conecta la parte alta y baja del contenedor del compartimiento, en la parte baja del contenedor se coloca el medio líquido. Aplicando presión a través de una bomba de aire, el líquido fluye a través del tubo e inunda las plantas en la parte alta del contenedor, (figura 4).

Durante el periodo de inmersión el flujo de aire renueva la atmósfera dentro del contenedor de cultivo. El tiempo de inmersión y la frecuencia se controla con un temporizador, cuando la presión disminuye, el medio líquido regresa a la parte baja del contenedor por fuerza de gravedad. El flujo aéreo es filtrado a través de filtros hidrofóbicos que aseguran el paso del aire (Teisson & Alvard, 1995).

El tiempo de inmersión, duración o frecuencia, es el parámetro crítico para determinar la eficiencia del sistema. La optimización del volumen del medio nutritivo y volumen del contenedor mejora substancialmente la eficiencia, especialmente en la proliferación del brote. El SIT generalmente mejora la calidad de la planta, lo que resulta en un incremento en el vigor, y cantidad de las plantas generadas (Carvalho *et al.*, 2018).

Los efectos positivos de los SIT en la micropropagación se han observado en la proliferación de brotes de pistache (Akdhemir *et al.*, 2014) y microcortes de *Ananas cosmus L.* (Escalona *et al.*, 1998), microtuberización en papa (Jiménez *et al.*, 1999) y embriogénesis somática en palma de durazno (Steinmacher *et al.*, 2011). Luciana *et al.*, (2019) combinó el método de cultivo convencional y el sistema de inmersión temporal, observó una influencia significativa en el tipo de sistema en la propagación en explantes de tuna cv. *Miúda*, cv. *Orelha* y cv. *IPA-Sertânia* observando un aumento significativo en la longitud de los brotes de *Miúda* e *IPA-Sertânia* con 5.7mm y 4.0mm respectivamente en SIT a comparación de medio semisólido. Un aumento de 0.60g en biomasa en *Orelha* y 0.29g en *Miúda*.

En *A. tequilana*, Monja-Mio *et al.* (2019) reportaron que el enraizamiento de los brotes generados por el sistema semisólido mejoró al ser llevar a cabo esta etapa en el SIT BioMINT™ resultando en una planta de mejor calidad y vigor. En *A. victoriae-reginae* la utilización de un SIT de frascos gemelos tuvo una respuesta

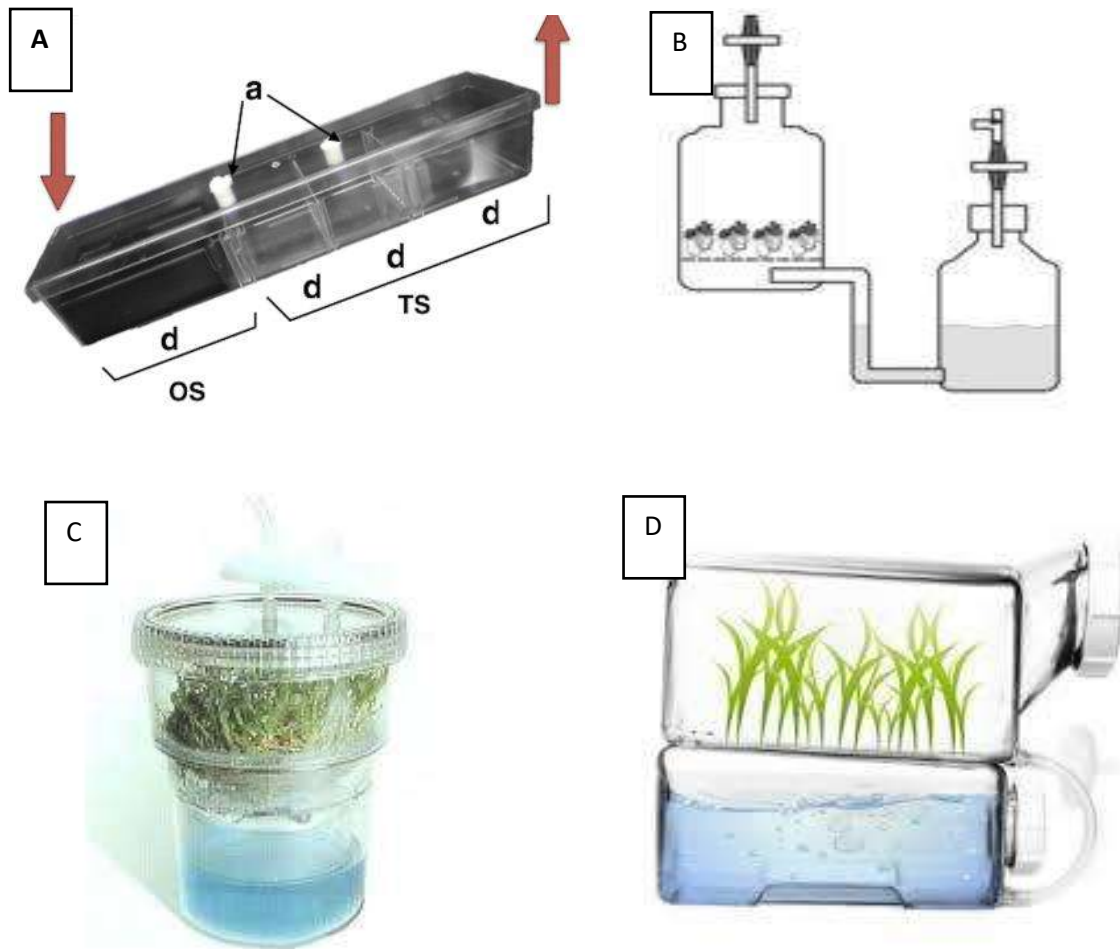


Figura 4. Tipos de sistema de inmersión temporal. A) Sistema BIOMINT® de balance, B) Sistema de flujo y reflujo de inmersión total del material vegetal y renovación de medio, C) Sistema RITA® de inmersión parcial del material vegetal y renovación de medio, D) Sistema Setis® de inmersión completa por transferencia de medio neumática con o sin renovación de medio.

positiva en la generación de brotes (Guzmán, 2016) así como en *A. duranguensis* (Durán & Nuñez, 2015), *A. angustifolia*, *A. karwinskii* y *A. parrasana* (Jáuregui, 2020).

En general el diseño del sistema de inmersión temporal tiene un efecto específico en el desarrollo *in-vitro* de las plantas. Esto se debe principalmente a que cada sistema provee diferentes condiciones de cultivo, lo que, a su vez, tiene un impacto directo en ambiente, disponibilidad de luz, espacio, humedad y nutrientes (Ramírez-Mosqueda *et al.*, 2019).

Ya que los tejidos vegetales son grandes estructuras biológicas, los requerimientos de transporte de gas son limitados. Regularmente, los sistemas de inmersión temporal minimizan el tiempo de contacto de los explantes con el medio y permite un intercambio gaseoso con los tejidos húmedos. La mayoría de los diseños de SIT utilizan presión neumática para mover el medio líquido de un contenedor a otro, los requerimientos gaseosos del medio dependen directamente del movimiento del fluido y no de la demanda de los tejidos. Como resultado una de las metas en el diseño de sistemas de inmersión temporal, se busca la separación del flujo aéreo y flujo líquido para controlar la demanda de oxígeno (Florez *et al.*, 2016).

El control de la demanda de oxígeno tiene varios beneficios y una especial influencia en la etapa de enraizamiento de la micropropagación. Muchas especies mueren debido a un desarrollo anormal de estomas, falta de cera epicuticular y pocas raíces funcionales (Monja-Mio *et al.*, 2020). En sistema de inmersión temporal se propicia un mejor crecimiento, por ejemplo, en el caso de *Nicotiana benthamiana* el sistema de raíces se desarrolló más rápido (6.75 mm/día) con el oxígeno elevado en un 40% en comparación con condiciones regulares (Florez *et al.*, 2016).

La eficiencia de enraizamiento es considerablemente mejorada en otros tipos de cultivo como plántulas de nuez en sistema de inmersión temporal comparados con el sistema semisólido después de cuatro semanas en medio de enraizamiento. Otras ventajas del SIT sobre el cultivo *in-vitro* semisólido es un aumento en la tasa de sobrevivencia en la primera y segunda etapa de aclimatación, sin diferencia significativa en la etapa de transición a campo (Uma *et al.*, 2021).

Este éxito se sustenta en que el SIT favorece la formación de mayor número de raíces y un aumento en el peso fresco. En *Phalaenopsis* cv. Jaunina se observó un enraizamiento de 93.8% y el mayor de número de raíces por brotes con seis inmersiones al día. También el aumento de peso fresco se dio hasta 3.7 veces más y un porcentaje final de sobrevivencia de 94% en promedio (Hempfling & Preil, 2005). En *Lycium barbarum* utilizando el sistema de inmersión temporal Plantform™, se logró un 80% de enraizamiento por brote después de 30 días en medio libre de auxina con una inmersión de 6 min cada 24h, en comparación, sólo el 5% de los brotes obtenidos en medio semisólido enraizaron. En este caso la adición de AIB fue necesario para la estimulación de la raíz dono el 82% de los explantes desarrollaron raíz después de 4 semanas (Ruta *et al.*, 2020). La aplicación de sistema de inmersión temporal en el cultivo de *A. tequilama*, *A. applanata* y *A. victoriae-reginae* aumentó los niveles de supervivencia de 100% después de 14 días, mientras que las que se cultivaron en medio semisólido tuvieron un 80% de supervivencia en el mismo periodo. (J. A. Herrera-Isidró *et al.* 2016).

Otro parámetro que afecta el crecimiento de las plantas en un sistema de inmersión temporal es la fuente de luz. Comúnmente, las lámparas fluorescentes son la fuente de luz más utilizada, sin embargo, tiene un alto consumo de energía y produce un amplio rango de longitud de onda (350-750nm) que no es necesaria en el desarrollo

vegetal (Marchant *et al.*, 2021). Las luces LED se han convertido en una herramienta alternativa en la micropropagación comercial, tienen ventajas como, baja radiación térmica, espectro monocromático, durabilidad y ahorro de energía. Se ha demostrado que el tipo de luz al que son expuestos los tejidos vegetales afectan el contenido de pigmentos fotosintéticos (clorofila a, b, carotenos y clorofila total) en distintos tipos de sistema de inmersión temporal (Georgiev *et al.*, 2014).

Investigaciones recientes en brotes de *Dianthus caryophyllus*, han demostrado una considerable reducción de las especies reactivas de oxígeno causantes de la hiperhidricidad al utilizar luz LED roja y azul en combinación ya que mantienen la composición de las proteínas de los tilacoides (Muneer *et al.* 2016).

En brotes de *Lippia grata Schauer* se observó una reducción del 61% de hiperhidricidad en hojas empleando luz LED rojo/azul en proporción 1:1, a comparación de aquellos cultivados en luz fluorescente (Zárate-Salazar *et al.*, 2020)

En especies como *A. tequilana*, *A. salmiana*, *A. durangensis* and *A. applanata* cultivadas *in-vitro* usando sistema de inmersión temporal con iluminación LED blanca no se observó un efecto significativo en la longitud de brotes, necrosis y número de hojas (L. Herrera-Isidró *et al.*, 2016). En plantas de *Sacharum*, *spp.* el uso de luz LED combinada 82% rojo y 18% azul fomentó la tasa de multiplicación con 5.58 brotes por explante a diferencia de control con 4.58 brotes por explante bajo luz fluorescente. De igual forma, se estimuló el desarrollo de la biomasa radicular con 0.16g en luz LED y 0.08 en luz fluorescente. El contenido de carotenoides también aumentó con 0.25mg/g en luz LED sobre 0.16mg/g en luz fluorescente (Ferreira *et al.*, 2016).

El estudio e implementación de nuevas técnicas de cultivo *in-vitro* como la implementación de sistemas de inmersión temporal en el cultivo de *Agave spp.* sortea muchas de las dificultades comunes de los procesos de micropropagación tradicional. Además de facilitar la escalación a procesos de producción comercial, potencia la calidad y cantidad de plantas generadas. Sin embargo, hasta ahora, los efectos en fase de enraizamiento y supervivencia de SIT o SIT modificados integrados en plantas *A. cupreata* son escasos.

### 3. Justificación

En México, el género *Agave spp.* tiene gran importancia social, ambiental y sobre todo económica. Aproximadamente 15 especies diferentes de agave, son utilizadas como materia prima para la producción de mezcal. Entre esas especies *A. cupreata* es de suma importancia para la elaboración de mezcal en la región de Michoacán. Sin embargo, por su ciclo reproductivo exclusivamente sexual de lento crecimiento y falta de estrategias de manejo agrícola, se recurre a la depredación de poblaciones naturales.

El uso de herramientas biotecnológicas como la micropropagación han sido excelentes alternativas para la generación de grandes volúmenes de producción en espacios reducidos y homogeneidad de caracteres en las plantas. A pesar de ello, la difusión de la micropropagación como técnica de cultivo para generar plantas de agave es limitada.

El manejo de los brotes en condiciones asépticas los contenedores de cultivo, el uso de medio semisólidos, subcultivos y costos energéticos son algunos de los factores que dificultan el proceso. Al mismo tiempo, en la mayoría de las plantas producidas *in-vitro* prevalecen anomalías morfológicas que les dificultan la transición a condiciones *ex-vitro* como estomas poco desarrolladas, falta de ceras epicuticulares u hojas y raíces poco desarrolladas, lo que las incapacita para su traslado a campo y se traduce en bajas tasas de supervivencia.

Por lo tanto, hay una gran importancia en la incursión en enfoques alternativos para optimizar la producción de plantas micropropagadas de *A. cupreata*. Se ha establecido previamente las varias ventajas del uso de biorreactores con medio líquido sobre los métodos de propagación convencional tales como, mayor disponibilidad de nutrientes, superior capacidad de enraizamiento, capacidad aumentada de oxigenación. Esto contribuye en gran medida a un mejor desarrollo de caracteres morfológicos que favorecen la adaptación de las plantas en la fase de aclimatación y mayor capacidad de sobrevivencia

Los resultados de esta investigación contribuyen al mejor entendimiento de los procesos de enraizamiento y adaptación a condiciones *ex-vitro* en sistemas de inmersión temporal, su eficiencia frente a técnicas tradicionales y sus efectos en las plantas cultivadas.

## 4. Hipótesis

El uso de un biorreactor de inmersión temporal a partir de la etapa de enraizamiento es más eficiente que el sistema de micropropagación tradicional en *A. cupreata*

## 5. Objetivo General

Evaluar el efecto del enraizamiento del sistema de inmersión temporal sobre el desarrollo del sistema radical, calidad, supervivencia y adaptación a condiciones *ex-vitro* de las plántulas de *A. cupreata* comparando su eficiencia con los métodos de micropropagación tradicional.

### 5.1 Objetivos particulares

1. Establecer el cultivo *in-vitro* de *A. cupreata* a través de métodos tradicionales a través de la selección de reguladores de crecimiento y cultivo en medio semisólido.
2. Diseñar y optimizar un sistema de inmersión temporal para el enraizamiento de brotes de *A. cupreata*
3. Determinar los tiempos óptimos de inmersión y condiciones de luz para el enraizamiento de brotes en cultivo en SIT modificado
4. Evaluar el efecto del SIT en los caracteres morfológicos de las plántulas y su sistema radical
5. Hacer una valoración de la sobrevivencia, adaptación y rendimiento de las plántulas obtenidas con SIT modificado y en sistema semisólido.

## 6. Materiales y métodos

Para garantizar el cumplimiento de los objetivos planteados en este proyecto de investigación, la metodología se dividió en tres etapas (figura 5). Durante la primera etapa se realizaron estudios para el establecimiento del cultivo *in-vitro* de *A. cupreata* a través del sistema de cultivo tradicional. Ensayos preliminares determinaron la viabilidad y porcentaje de germinación de un lote de semillas *A. cupreata* cosecha 2018 proporcionadas por el Laboratorio de Nutrición Vegetal para la obtención de tejido juvenil. Se evaluaron y estandarizaron métodos de germinación rápida para la obtención de material vegetal *in-vitro*.

Posteriormente, el material vegetal fue utilizado para evaluar el efecto de diferentes concentraciones de reguladores en medio de cultivo semisólido en los brotes de *A. cupreata*. Se realizó un análisis y comparación de los tratamientos para determinar la concentración que generara el mayor número de brotes adventicios.

Una vez seleccionada la concentración y el tipo de regulador de crecimiento adecuado para el desarrollo del material vegetal, los brotes se llevaron a enraizamiento en medio semisólido con fitorreguladores de crecimiento. El cultivo se llevó a cabo tanto en luz fluorescente como en luz LED. Pasados 30 días de exposición se realizó una evaluación de caracteres morfológicos de las plantas y de esta forma escoger el tratamiento adecuado para enraizamiento *in-vitro*.

Durante la segunda etapa, se buscó la integración de un método alternativo para enraizamiento de brotes de *A. cupreata* multiplicados *in-vitro* usando medio líquido. A partir de sistemas de biorreactores conocidos se diseñó y construyó un sistema de inmersión temporal (SIT) modificado para suculentas como *A. cupreata* y mejorar la eficiencia de enraizamiento de brotes proliferados en medio semisólido.

Para controlar el contacto de los brotes con el medio de cultivo, se evaluaron tres diferentes frecuencias de inmersión, cada ocho horas, cada doce horas y cada 72 horas. En cada caso el tiempo de inmersión fue de un minuto. Durante el desarrollo del sistema radicular y en combinación, con el sistema de inmersión temporal se probaron dos tipos de luz, la fluorescente tradicional y luz LED. Posteriormente se evaluaron diferentes parámetros de crecimiento y morfológicos en las plantas de agave enraizadas para determinar las características y calidad de las plantas enraizadas.

En la tercera etapa se llevó a cabo el traslado de plantas a sustrato. Se evaluaron los porcentajes de supervivencia, diferentes parámetros de crecimiento y caracteres morfológicos de las plantas. Los datos obtenidos se compararon entre tratamientos y contrastaron con bibliografía especializada para determinar la eficiencia del sistema de cultivo para generar plantas de calidad y resistentes a condiciones *ex-vitro*.

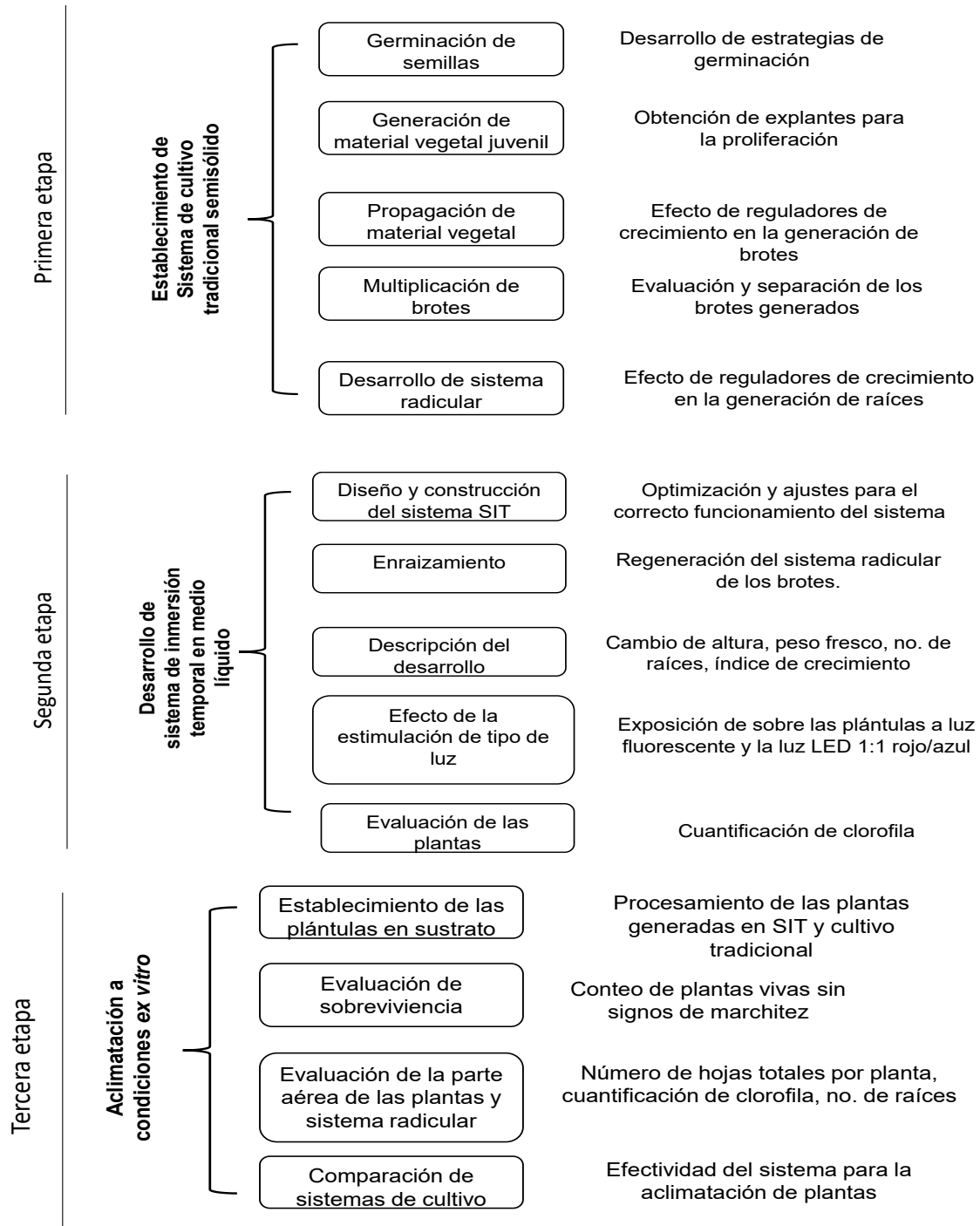


Figura 5. Diagrama de la metodología utilizada en este estudio.

## **6.1 Establecimiento de *Agave cupreata* de sistema de cultivo semisólido in-vitro**

### **6.1.1 Germinación de semillas in-vitro**

Para la obtención de material vegetal, se utilizaron semillas de *A. cupreata* proporcionadas por el Laboratorio de Nutrición Vegetal del CIDAM, Morelia Michoacán. Las semillas del lote fueron clasificadas, separadas en base a color y tamaño. Se seleccionaron únicamente semillas negras, brillantes de textura lisa y tamaño aproximado de 0.5cm a 1cm.

Debido a la ausencia de protocolos especializados en el manejo de germoplasma de *A. cupreata*. Se realizó la desinfección de acuerdo al protocolo establecido por Sánchez-Urbina *et al* (2008) para *A. grijalvensis*. Este proceso consistió en un lavado inicial con agua corriente y 2% de jabón líquido durante 15 minutos, esto se repitió tres veces y se dejaron en remojo durante 2 horas. Las semillas se llevaron a 3 lavados con una solución de hipoclorito de sodio, Cloralex® (solución comercial 5.25% de NaOCl) durante 15 minutos y enjuagadas con agua destilada estéril bajo condiciones asépticas. Posteriormente fueron llevadas a campana de flujo laminar donde se sumergieron en una solución de etanol al 70% por 30 segundos e inmediatamente enjuagadas con agua destilada estéril para evitar la pérdida de viabilidad.

Para establecer la tasa de germinación del lote de semillas seleccionado, se realizó una prueba de germinación inicial. Fueron analizados 4 repeticiones con 25 semillas por tratamiento colocándolas en placas Petri con una base de papel filtro humedecido con 4 ml de agua destilada estéril, se sellaron y se colocaron a temperatura ambiente, realizando recuentos de germinación cada 3,5,7,14,21 y 28 días considerando una semilla germinada aquella que presentaba una radícula emergida de al menos 2mm. Se consideró una semilla germinada cuando la radícula eran visible. Cada semilla germinada y registrada se descartó para evitar la duplicación de la información. A su vez, cada caja Petri fue contada y analizada en busca de microorganismos y descartada en caso de observarse la presencia de microorganismos.

### **6.1.2 Tratamientos pregerminativos**

Debido al bajo porcentaje de germinación que tuvieron las semillas en la prueba inicial, se procedió al diseño de estrategias de estimulación de la germinación y desarrollo del material vegetal. Para ello se establecieron tres procedimientos:

### Procedimiento 1: Semillas en imbibición (Sb)

Para acelerar el proceso de imbibición de las semillas, previo al tratamiento de desinfección, semillas previamente seleccionadas de *A. cupreata* se dejaron en remojo durante 24h. Después se realizó el proceso de desinfección y bajo campana de flujo laminar, se colocaron las semillas directamente a cajas Petri previamente llenadas con medio de cultivo basal. Dicho medio constituido por sales Murashige y Skoog (MS), sacarosa, inositol, tiamina-HCL y agar 0.7 % a pH 5.6.

### Procedimiento 2: Semillas escarificadas químicamente (Eq)

Para este procedimiento, una vez realizada de desinfección las semillas, se sumergieron en una solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> durante 30 minutos, y se hicieron tres lavados con agua de osmosis bajo campana de flujo laminar para eliminar los restos del ácido. Una vez hecho el enjuague, las semillas se sembraron en medio de cultivo basal.

### Procedimiento 3: Semillas escarificadas mecánicamente (Em)

Para realizar la escarificación mecánica, previo a la desinfección, se les desprendió mecánicamente la testa a las semillas cortando en forma de embrión con un bisturí estéril. Se continuó con la desinfección normalmente y se sembraron en medio de cultivo basal.

Cada lote de semillas fuer correctamente etiquetado, sellado y guardado a temperatura bajo un fotoperiodo luz oscuridad 16/8 durante 28 días. Se realizó un monitoreo de la presencia de contaminación y la germinación haciendo recuentos cada 3,7,14,21 y 28 días.

A partir del conteo de semillas germinadas se calculó el porcentaje de germinación promedio dividiendo el número total de plantas germinadas entre el número total de semillas. En base a la metodología propuesta por McGuire 1962 se calculó el índice de velocidad de germinación, así como la tasa de germinación.

Además, se seleccionó al azar 40% unidades experimentales de cada repetición y se midió su tamaño desde la punta de la raíz hasta el ápice de la hoja más larga y determinar la longitud de las plántulas.

Para el análisis de los datos recabados, se evaluó el efecto de los tratamientos verificando la normalidad y homogeneidad de la varianza previo a un ANOVA. Las diferencias entre las medias se analizaron a través de un test LSD Fisher (P=0.05) con ayuda del paquete estadístico Minitab 18.

En base a este análisis se seleccionó del tratamiento más efectivo para la germinación en base al mejor rendimiento en germinación y ausencia de contaminación.

## 6.2 Establecimiento y fase de multiplicación vegetal.

Plántulas germinadas de dos semanas de edad fueron trasplantadas a frascos de vidrio de cultivo con capacidad de 100ml en medio semisólido Murashige-Skoog (MS), suplementado vitaminas 100 mg/L de mioinositol, 0.40 mg/L de tiamina HCl y 8 g/L de agar a pH 5.6 previamente esterilizado en autoclave a 120°C durante 30 minutos. Se almacenaron en cámara de cultivo a temperatura de 25°C y fotoperiodo de luz/oscuridad 16:8 hasta obtener plantas de 3-6cm de altura.

Para el cultivo de explantes, a partir de plántulas de las plántulas de *A. cupreata* se retiraron las raíces y la parte apical de las hojas como se muestra en la figura 6 para obtener explantes. El tamaño final del explante y forma dependió directamente del tamaño de la planta madre. Los pequeños cortes de explante fueron colocados en frascos de cultivo de vidrio (figura 6a), previamente llenado con medio semisólido MS fresco suplementado con vitaminas y adicionado con reguladores de crecimiento para la etapa de multiplicación. Los reguladores de crecimiento consistieron en diferentes concentraciones de 6-bencilaminopurina (BAP Sigma-Aldrich), 0.5, 1, 1.5 y 2 mg-L<sup>-1</sup>, y Cinetina (Ci), 1, 1.5, 2, 3mg-L<sup>-1</sup>, Domínguez et al, 2008b. Los frascos de cultivo fueron almacenados en cámara de cultivo a 25°C con fotoperiodos 16:8 de luz blanca fluorescente durante 60 días.

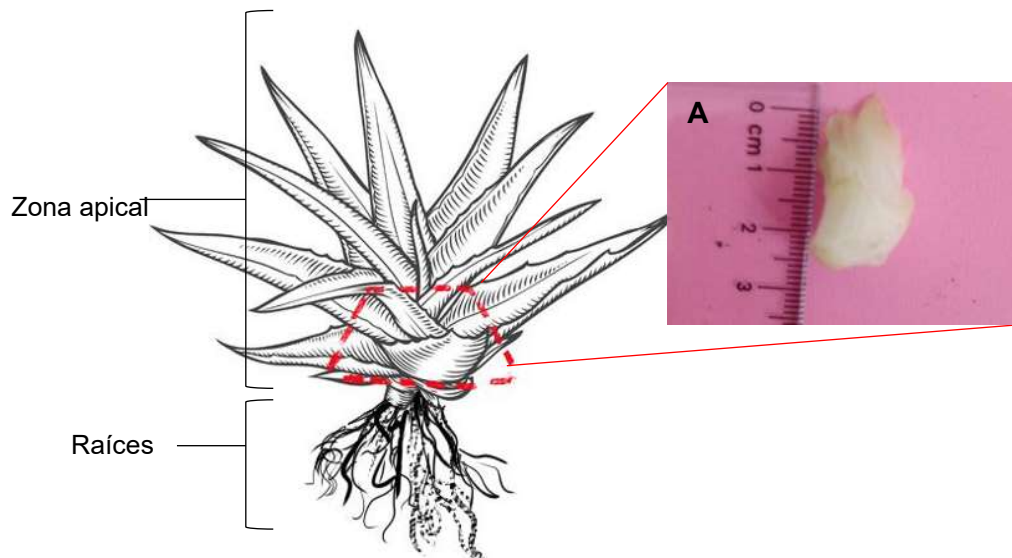


Figura 6. Diagrama de una planta de *A. cupreata* utilizada para la obtención de explantes. A) Explante basal para la multiplicación.

Durante la multiplicación de los explantes, estos fueron monitoreados por signos de necrosis, vitrificación, y tejido caloso. Una vez concluido el periodo de cultivo, el número y la longitud de brotes axilares fueron cuantificados y registrados para su análisis posterior.

De acuerdo con un modelo de bloques al azar, los tratamientos fueron ordenados con 4 repeticiones por tratamiento. El ajuste de los modelos de regresión obtenidos

se verificó por la determinación de coeficiente de correlación ajustado ( $R^2$ ). Los datos fueron procesados con el paquete estadístico Minitab 18 y en base a la información recabada se seleccionó el tratamiento con la dosis y tipo de regulador de crecimiento que obtuvo el mayor número de brotes y mejor crecimiento para la proliferación y posterior proceso de enraizamiento.

### **6.3 Enraizamiento de los brotes micropropagados de *Agave cupreata***

Para inducir la generación de raíces, brotes sanos de *A. cupreata* obtenidos de los de explantes previamente proliferados, se separaron bajo condiciones estériles dentro de campana de extracción y usando material de cirugía debidamente esterilizado.

Los brotes fueron sometidos a un tratamiento de pulso de auxinas donde se cultivaron en medio inductor de raíz (MIR) con diferentes concentraciones de 0, 0.5, 1 y 1.5 mg/L de Ácido indol-3-butírico (AIB) junto con 0, 0.5, 1, y 1.5 mg/L de 2, 4-ácido diclorofenoxyacético (2,4-D). Los brotes se mantuvieron en incubación durante dos días. Al cabo de este tiempo, fueron trasladados a medio MS fresco basal y se dejaron en condiciones de cultivo durante 30 días para su posterior evaluación.

Para cada tratamiento los brotes enraizados fueron evaluados haciendo un conteo de las raíces generadas por brotes. Los datos recopilados fueron analizados a través de un análisis de varianza ANOVA y test de Tukey ( $p < 0.05$ ). Se realizó un ajuste para el modelo de regresión lineal y se obtuvieron modelos que describieran el aumento en el número de raíces en función a la variación en las concentraciones de los reguladores de crecimiento. De esta forma se determinó la auxina y concentración óptima para el enraizamiento

En base a la información recopilada se procedió a probar dos diferentes sistemas de cultivo; el medio semisólido (empleando cultivo en frasco tradicional) y medio líquido en sistema de inmersión temporal (SIT) en el proceso de enraizamiento de brotes de *A. cupreata*.

#### **6.3.1 Enraizamiento en cultivo semisólido**

Para el enraizamiento en medio semisólido brotes individuales de 2-3 cm fueron cultivados en medio de enraizamiento (MIR) que consiste en sales MS al 50% con 3% de sacarosa y 0.8% de agar como agente gelificante adicionado con 1mg/L de AIB, durante 2-3 días. Una vez concluido este lapso, los brotes fueron transferidos a medio MIR sin reguladores de crecimiento colocando cuatro brotes por frasco con cinco replicas.

Los brotes fueron expuestos a dos tratamientos de luz diferentes, el primero consistió en cultivo bajo luz fluorescente. Y el tratamiento con luz LED se realizó exponiendo los brotes a diodos de luz Led con porcentajes de 50% de luz roja (R,

661nm) y azul (A, 449nm) el fotoperiodo para ambos tratamientos fue de 16:8h día y noche,  $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (PPFD) durante 30 días a temperatura  $21 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2.5 \text{ }^\circ\text{C}$ .

### **6.3.2 Construcción del sistema de biorreactor de inmersión temporal (SIT) para el enraizamiento de brotes de *A. cupreata*.**

El sistema de inmersión temporal fue diseñado combinando las ventajas de tres diferentes sistemas; Frascos Gemelos, Intercambio por gravedad y BioMINT.

Este consistió en un contenedor de plástico inclinado de 30cm x 11cm con capacidad de 4.2L con capacidad de sellado hermético al cual se le adaptó una lámpara de luz ultravioleta en la parte interna. A cada contenedor se le instalaron puertos para el flujo del aire a los que se les conectó una manguera de silicón rígido de 8mm de grado alimenticio y otro con un filtro universal de 5cm para permitir el eflujo independiente de aire, el cual se inyectó con una bomba de aire de 12V modelo BOYU18w 38lpm.

En la parte inferior se le colocaron mangueras de silicón flexible de 20mm grado alimenticio para el flujo del medio de cultivo conectadas por un conector de 6 vías por las que se bombea el medio líquido con una bomba de agua marca DICO.

Los contenedores se sellaron con vitafilm y se colocaron en un estante inclinado, cada contenedor contó con una iluminación independiente que consistió en luces LED marca "*GE lightning*" tipo Smart LED de 1.78m x 0.08 m x 0.02 m con colores y tiempos programables que fueron colocadas en un arreglo de 24 LEDs.

Para coordinar los tiempos de oxigenación tanto la bomba de aire como la bomba de agua estaba controladas por temporizadores independientes.

### **6.3.3 Enraizamiento en medio líquido en sistema SIT**

Los contenedores plásticos fueron lavados, y desinfectados con etanol al 70%, posteriormente esterilizados durante 12h con luz UV en periodos de 30min. Se hizo circular una solución de hipoclorito de sodio al comercial 5% en todo el sistema, seguida de agua esterilizada. Se utilizó 2L de medio MS basal líquido para la alimentación de 6 contenedores.

Brotos cultivados *in-vitro* previamente tratadas en MIR fueron trasplantados a los contenedores individuales colocando cuatro brotes por contenedor. Reportes previos en *A. tequilana*, (Moja-Mio et al. 2020), señalan que 1min de sumersión es suficiente para la generación de raíces, por lo que, en base a eso, tres tratamientos diferentes de inmersión fueron probados; 1min cada 8 horas (SIT-8), 1min cada 12 horas (SIT-12) y 1 min cada 72h (SIT-72).

Para las condiciones de incubación se probaron dos tratamientos iguales a los probados en el medio semisólido, bajo luz fluorescente, y bajo luz LED azul/roja con un fotoperiodo de 16:8h a  $25^\circ\text{C}$  durante 30 días.

Para evaluar el efecto de los tratamientos tanto en medio semisólido (SS) así como en medio SIT, el crecimiento y parámetros morfológicos fueron evaluados; número de raíces, longitud de raíz, incremento de tamaño de brote, biomasa fresca acumulada e índice de crecimiento.

El incremento de tamaño de brote fue medido tomando en cuenta la distancia desde la base del brote, hasta la punta de la hoja más larga ( $Tb$ ). Para establecer el peso fresco ( $Pf$ ) de los brotes se utilizó una balanza digital CONSTANT 646C. La biomasa fresca acumulada ( $BFA$ ) fue determinada de la siguiente manera:

$$BFA = Pf \text{ final} - Pf \text{ inicial}$$

El índice de crecimiento (GI) se calculó;

$$GI = \frac{Pf \text{ final} - Pf \text{ inicial}}{Pf \text{ final}}$$

Todos los datos recolectados fueron analizados con el paquete estadístico Minitab 18, sometiéndolo a un análisis de varianza ANOVA de una sola vía, seguido de test de Tukey ( $p < 0.05$ )  $n=24$ .

## **6.4 Análisis del efecto de luz y sistema de cultivo en el contenido de pigmentos fotosintéticos en plántulas de *A. cupreata*.**

### **6.4.1 Adquisición de imagen**

La adquisición de imágenes se hizo con un escáner HP DeskJet 2134 imitando el método de adquisición de imagen de contacto (Vesali *et al.*, 2015). A diferencia de otros métodos estándar de adquisición de imagen, un escáner evita la interferencia de fondo de la imagen. Otra ventaja es que no hay variación en la distancia entre la hoja y el sensor, permite que las imágenes sean uniformes sin borrosidad además de que la variación entre dispositivo de captura. Al ser todas las imágenes capturadas con el mismo equipo, se eliminó la necesidad de usar un método de calibración.

### **6.4.2 Extracción y procesamiento de imagen**

Se obtuvieron las imágenes en formato RGB con 1200dpi de resolución, se aisló una región de 250x250 píxeles con ayuda del software ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>) y se obtuvieron los valores medios para los colores RGB.

Los valores R y G fueron utilizados para obtener los índices de color inversos;  $1/R$  y  $1/G$ , así como el relación;  $[1/R]/[1/G]$  y su suma;  $[1/R]+[1/G]$ .

### **6.4.3 Análisis de datos**

Se hizo un análisis de correlación lineal entre índices de color RGB y diferentes características de pigmentos fotosintéticos (PF); clorofila total (Chl), carotenoides totales (CARs), concentración de pigmentos fotosintéticos totales (Chl+CARs) y el relación de

concentración Chl/CAR. El modelo de predicción utilizado fue el propuesto por Agarwal *et al.* 2021, (tabla 1).

<b>Tabla 1. Modelos de predicción para contenido de pigmentos fotosintéticos basados adquisición de imagen.</b>				
<b>Pigmento fotosintético. (y)</b>	<b>Índice de Color (x)</b>	<b>Ecuación</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>RMSE</b>
<b>Chl</b>	1/R	Y=87.48x-0.454	0.938	0.110
<b>CAR</b>	1/G	Y=53.97x-0.26	0.951	0.031
<b>Chl+CAR</b>	1/R+1/G	Y=75.5x-0.778	0.948	0.122
<b>Chl/CAR</b>	[1/R]/[1/G]	Y=3.51x-2.25	0.879	0.216
<b>DGCI</b>	N%	Y=5.97x-0276	0.935	0.158
<b>Agarwal et al., 2021</b>				

Se calculó el calor del índice de color verde oscuro (DGCI) en una escala de cero a uno. Para obtener este valor, el modelo RGB es convertido a modelo HSB y se calculó acorde con la siguiente ecuación:

$$DGCI = \left[ \frac{(H - 60)}{60} + (1 - S) + (1 - B) \right] / 3$$

Los datos experimentales fueron estadísticamente analizados usando Minitab 18. Se realizó un análisis de varianza ANOVA y test Duncan para determinar el efecto de los diferentes tratamientos de luz LED en el contenido de pigmentos fotosintéticos, (p<0.05).

## **6.5 Aclimatación**

### **6.5.1 Aclimatación de plántulas in-vitro de plántulas de *A. cupreata*.**

La aclimatación de plantas se llevó a cabo sacando las plántulas enraizadas del sistema de cultivo. Para eso se aflojó la tapa de los frascos de cultivo durante 5 días, transcurrido el tiempo, se extrajeron las plántulas y se lavaron con agua corriente para retirar residuos del medio de cultivo y evitar la proliferación de agentes patógenos.

Se colocaron en vasos sellados con bolsas para controlar la humedad, con  $\frac{3}{4}$  de sustrato para agaváceas (v/v) a 2:1:1 *Peat moss*, arena de tezontle rojo, tepojal blanco y 1% de osmocote durante dos semanas.

A los 60 días de haber sido trasplantadas a condiciones *ex-vitro* las plantas fueron evaluadas tomándose como parámetros de evaluación, el número de hojas totales, la concentración mg/g en peso fresco de clorofila, número de raíces nuevas generadas y el porcentaje de supervivencia.

### **6.5.2 Adaptación ex-vitro de plántulas de *A. cupreata***

Para el proceso de aclimatación de las plántulas del sistema de inmersión temporal, se removieron las raíces de las plántulas y se colocaron en vasos sellados con  $\frac{3}{4}$  de sustrato para agaváceas (v/v) a 2:1:1 *Peat moss*, arena de tezontle rojo, tepojal blanco y 1% de osmocote.

Se mantuvo una humedad relativa alta durante las primeras dos semanas, y posteriormente regadas diario por 15 días y después una vez a la semana.

Al terminar el periodo de adaptación se evaluaron los parámetros de; supervivencia, número de raíces por planta, a los 60 días. Y número de hojas y contenido de clorofila a los 30-60 días de adaptación

## 7. Resultados

### 7.1 Establecimiento del cultivo *in-vitro* de *Agave cupreata* en medio semisólido

A partir de la evaluación y clasificación de las semillas de *A. cupreata* en base a sus características morfométricas, se determinó que lote inicial tenía una proporción de 70% semillas blancas y 30% semillas negras de tamaño y características viables, figura 7.

Ensayo de germinación inicial mostró que el lote de semillas seleccionado tenía un porcentaje de germinación de 48.25% donde el 45.3% de las semillas tuvieron que ser descartadas por dar signos de contaminación. Los tratamientos aplicados para mejorar la germinación demostraron tener la capacidad para mejorar el porcentaje de germinación, así como una disminución de la contaminación ya que únicamente el tratamiento de imbibición mostró signos de crecimiento de microorganismos en un 20% de las semillas.

En promedio, el 57.75% de las semillas que se habían procesado con el tratamiento de imbibición (Sb) presentaron una diferencia significativa con respecto las semillas control (C), ( $P=0.02$ ), (figura 8).

En los tratamientos de escarificación se hallaron diferencias significativas ( $P<0.0001$ ) en el porcentaje de germinación total en contraste con el tratamiento Sb y Si. En lo que se refiere al tipo de escarificación no se hallaron contrastes significativos estadísticamente ( $P>0.05$ ) entre la escarificación mecánica (Em) y la escarificación química (Eq) con un porcentaje de germinación de 93.50%. a favor del tratamiento Em.

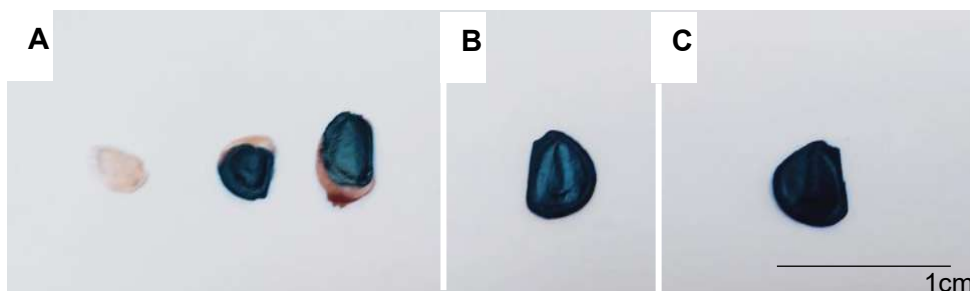


Figura 7. Características morfométricas de las semillas de *A. cupreata*. A) Semillas blancas o con bordes blancos, sin embrión y sin endospermo. B) Semillas negras potencialmente viables. C) Tamaño y caracteres morfológicos de las semillas seleccionadas

Sin embargo, ambos tratamientos de escarificación se diferenciaron en lo que respecta índice de velocidad de germinación (IVG), el tratamiento de escarificación química tuvo mayor significancia ( $P < 0.0004$ ) que el tratamiento Em. No obstante,

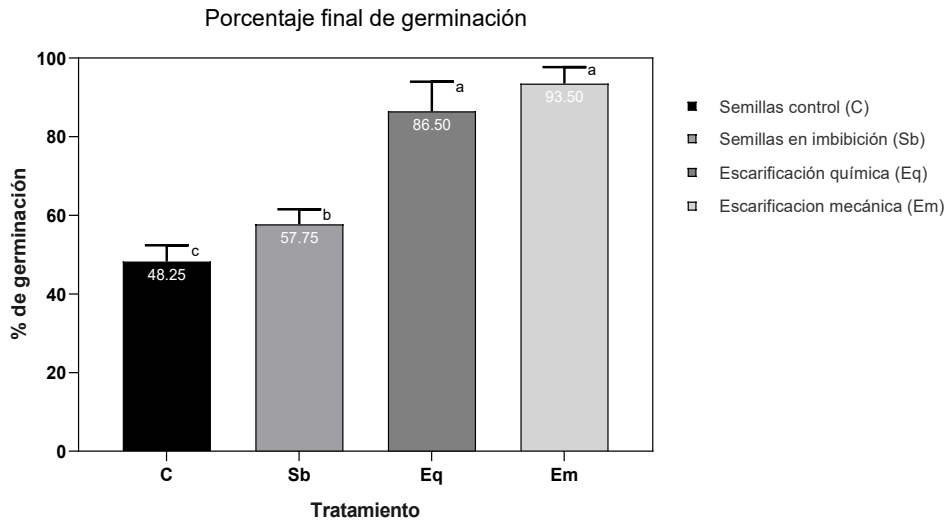


Figura 8. Porcentaje final germinativo (media  $\pm$  d.e,  $n=100$ ) de los tratamientos (C) semillas control (Sb) semillas en imbibición. (Eq) escarificación química. (Em) escarificación mecánica. Las medias que no comparten letra son significativas (*test LSD fisher*  $p < 0.05$ ).

es importante señalar que los valores del índice de velocidad de germinación fueron elevados en todos los tratamientos diseñados para estimular la germinación en comparación a las semillas intactas, (figura 9).

La prueba LSD Fisher reveló que los tratamientos de estimulación temprana no tuvieron influencia significativa ( $P > 0.05$ ) en el tamaño de las plántulas germinadas ya que no afectaron ni positiva ni negativamente en ninguno de los tratamientos, (Figura 10).

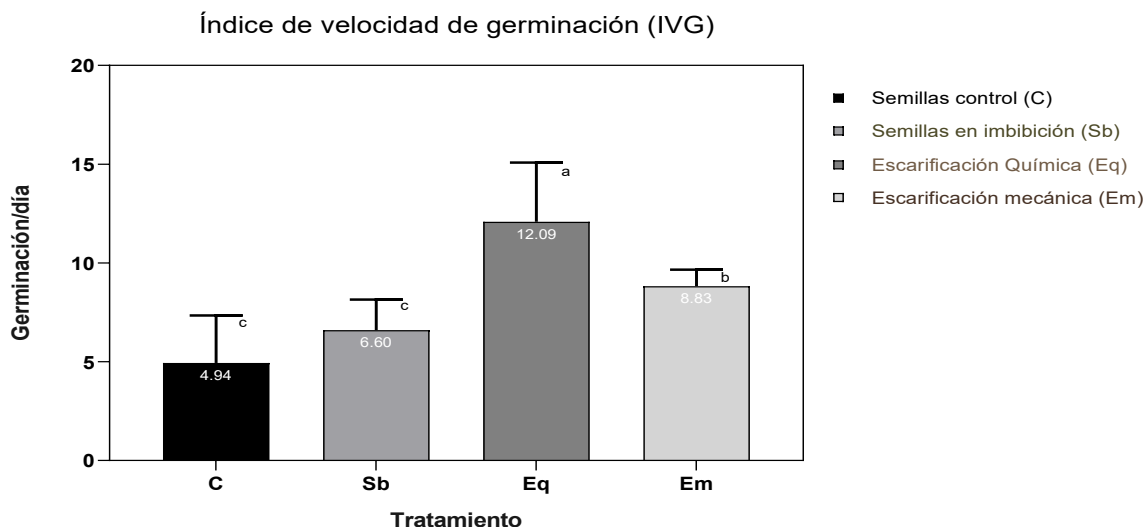


Figura 9. Tasa de germinación expresada en índice de germinación, valores promedio<sup>31</sup> entre tratamiento (media  $\pm$  d.e.  $n=100$ ). (C) semillas control (Sb) semillas en imbibición (Eq) escarificación química. (Em) escarificación mecánica. Las letras que no comparten letras son significativas, (*test LSD Fisher*  $p < 0.05$ ).

En base al porcentaje de germinación, índice de velocidad de germinación y la longitud de la planta se eligió al tratamiento de escarificación química como tratamiento pregerminativo más efectivo, figura 11.

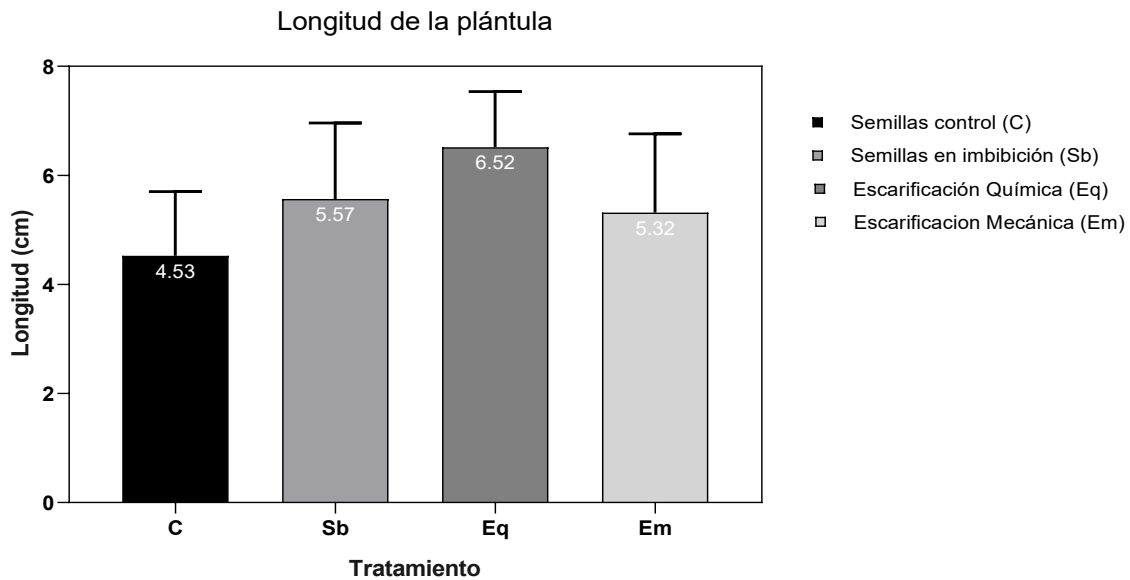


Figura 10. Longitud de las plántulas en respuesta a los tratamientos de estimulación de la germinación (*media ± d.e. n=100*). (C) Semillas control, (Sb) Semillas en imbibición. (Eq) escarificación química. (Em) Escarificación mecánica.

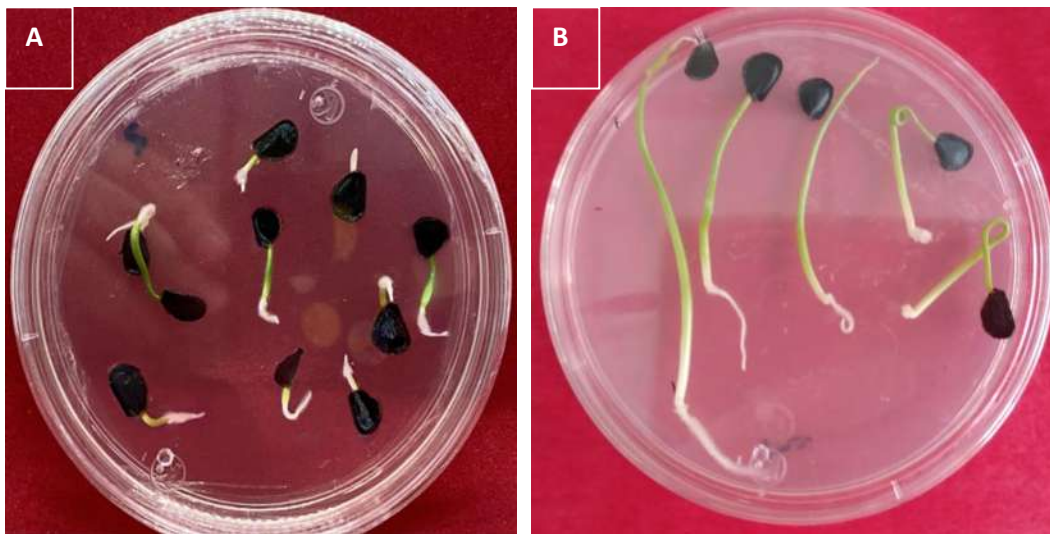


Figura 11. A) Germinación de plántulas bajo tratamiento de escarificación química a los 14 días. B) Crecimiento de las plántulas después de 28 días de incubación.

## 7.2 Establecimiento y fase de multiplicación en sistema de cultivo tradicional semisólido.

Posterior a la selección del proceso pregerminativo óptimo para la germinación de semillas de *A. cupreata*, se priorizó el establecimiento de un sistema de para la regeneración de brotes en medio semisólido utilizando BAP y Ci como reguladores de crecimiento, figura 12a-b.

La respuesta de los explantes a los reguladores de crecimiento en medio semisólido fue evaluada considerando el número de brotes generado como una respuesta positiva, mientras que los explantes contaminados o la ausencia de brotes como respuesta negativa. Después de 90 días de cultivos, los brotes generados pudieron ser fácilmente identificados y separados para su posterior manipulación, figura 12 c-d.

Se observó que, en todos los tratamientos, el uso de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo estimuló la formación de brotes axilares directos con una generación estadísticamente significativa con respecto a los brotes dónde únicamente se cultivaron explantes con medio basal sin fitorreguladores de crecimiento.

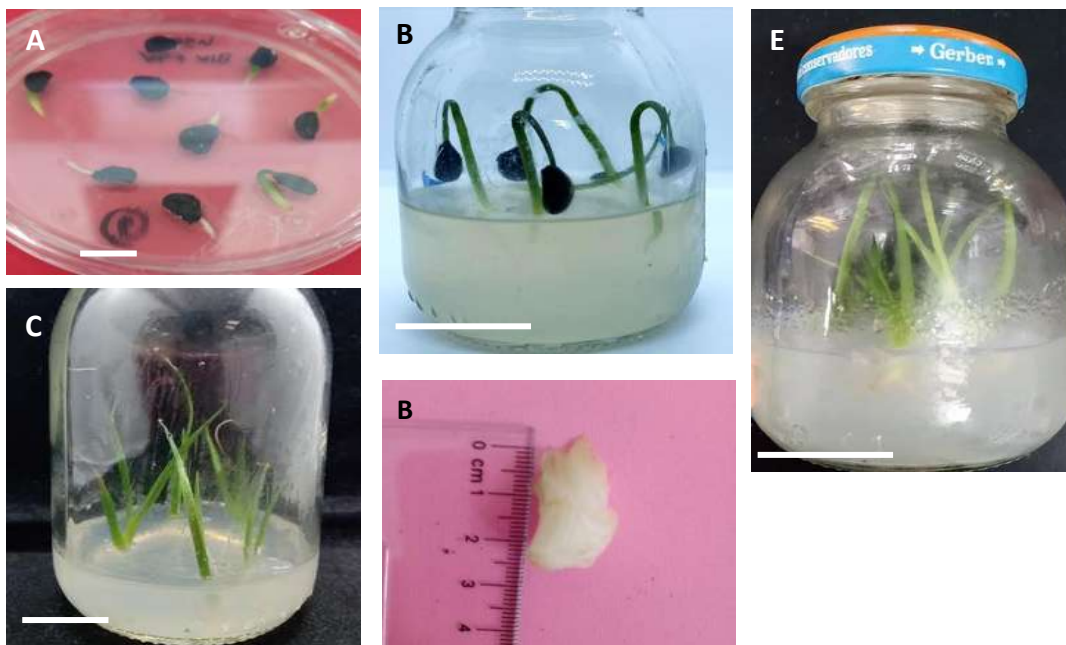


Figura 12, Establecimiento in-vitro de plantas de *A. cupreata*. (A). Semillas germinadas in-vitro, barra=1cm. (B). Semillas establecidas en contenedor de cultivo, barra=2cm. (C). Planta madre, barra=2cm (D). Explante para multiplicación. (E). Generación de brotes, barra=2cm.

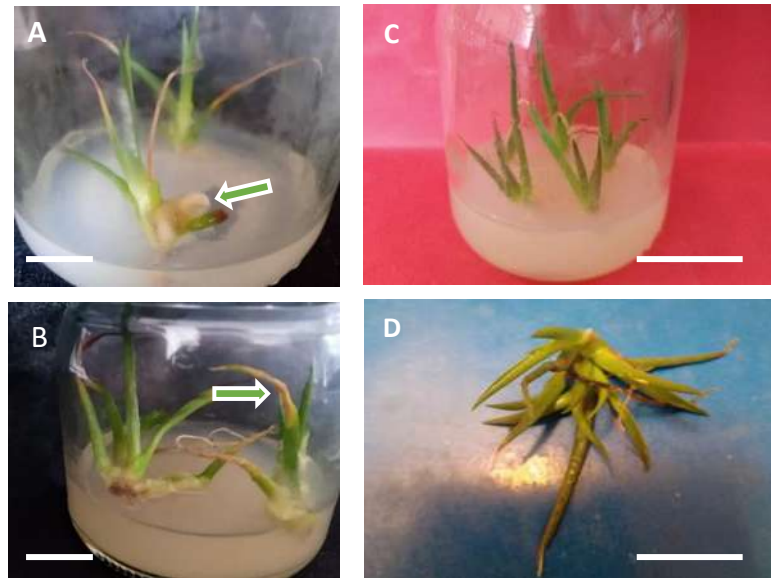


Figura 13. Multiplicación de brotes de *A. cupreata*. A. Tejido calloso generado en los brotes del tratamiento con 1.5mg/L BAP + 1.5 mg/L Ci, barra=1cm. B. Signos de necrosis en hojas y tejido calloso en los brotes, barra=1cm. C-B. Brotes generados con el tratamiento con 1.5mg/L BAP + 1.5 mg/L Ci, barra=2.5cm

El mayor número de nuevos brotes generados por explante se obtuvo después de 90 días de cultivo con el tratamiento T19, se observó el crecimiento de  $8.9 \pm 0.64$  brotes por explante con 1.5 mg/L de BAP y 1.5mg/L de Ci lo que es significativo con respecto al resto de los tratamientos, ( $p < 0.05$ ), tabla 2.

Es importante señalar que los tratamientos que combinaban  $1.5 \text{ mgL}^{-1}$  de BAP y concentraciones mayores a  $0.05 \text{ mgL}^{-1}$  de Ci presentaron formación de tejido calloso, el cual formó brotes poco diferenciados. Transcurridos 90 días de cultivo presentaron puntas necrosadas en las hojas, figura 13a-b.

El mayor conteo de brotes generados por explante sin signos de visibles de necrosis, vitrificación, o tejido calloso se dio en el tratamiento T16 con  $8.6 \pm 0.65$  brotes generados con la combinación de 1.5 mg/L BAP y 0.5 mg/L de Ci, este valor es estadísticamente significativo ( $p < 0.05$ ), figura 13c-d.

El análisis de Pareto permitió la evaluación de los factores y su efecto en la generación de brotes, tanto la concentración de BAP como la de Ci y su interacción en conjunto sobre el número de brotes se observa en la Figura 14a. La influencia de Ci (B), su efecto cuadrático (BB) y la interacción de Ci con BAP (AB) presentaron una respuesta deficiente ya que el efecto no licitó una respuesta significativa ( $p = 0.05$ ) en el número de brotes generados. Caso contrario se observó en la respuesta de los brotes a BAP donde el efecto A y AA tuvieron significancia. Esto acorde con el análisis de efectos principales (figura 14b), donde se observa que la concentración de BAP promovió en mayor medida la generación de brotes, se observa que el aumento en la generación de brotes va relacionado con el aumento

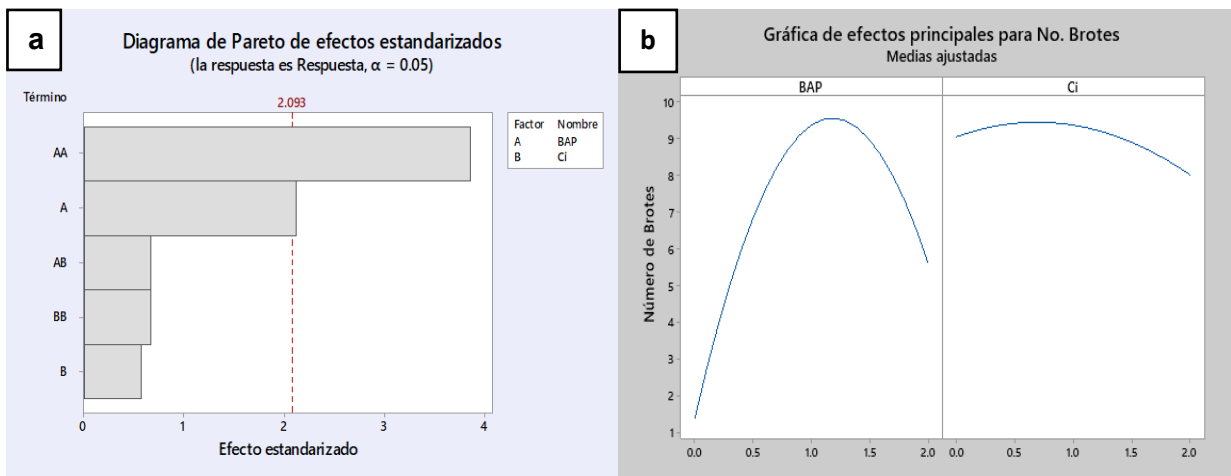


Figura 14. a) Modelo cuadrático para la optimización de número de brotes con 6-Bencilaminpurina (A) y de la Cinetina en *A.cupreata* (B). AB término de interacción entre BAP y Ci. AA, término cuadrático para BAP; BB es el término cuadrático para el Ci. b) Efectos individuales de BAP y Ci sobre en la longitud de brote.

de la concentración de 0.5mg/L a 0.5mg/L y que el aumentar la concentración de BAP hasta 2mg/L tiene un efecto negativo ya que el número promedio de brotes disminuye. En el caso de la kinetina, la gráfica de efectos principales la concentración no presentó una influencia fuerte, muestra que concentraciones mayores a 1.5mg/L tiene una tendencia negativa en la generación de brotes.

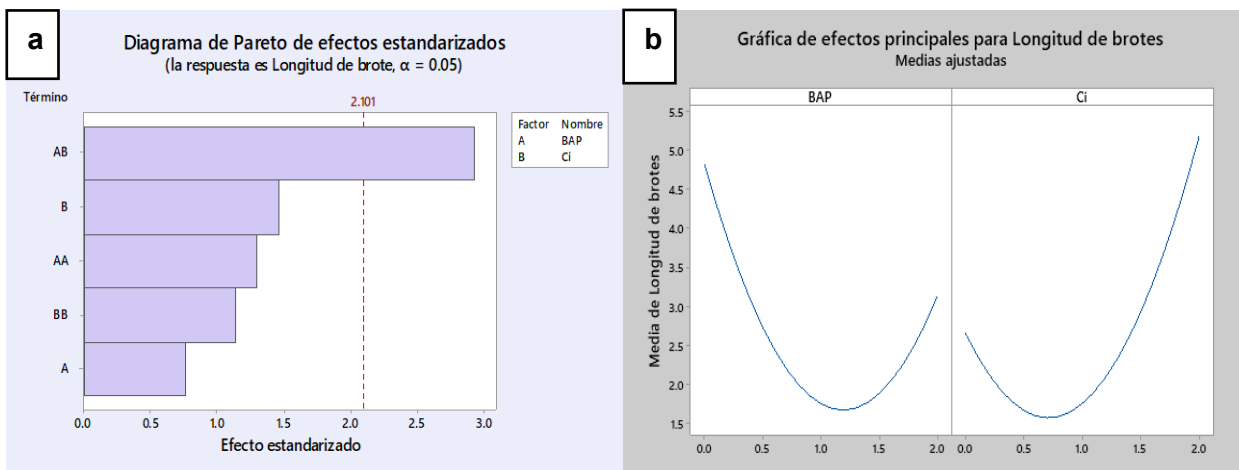


Figura 15. Modelo cuadrático de optimización de concentración auxinas para la longitud de brote. 6-Bencilaminpurina (A) y de la Cinetina (B). AB término de interacción entre la BAP y Ci; AA. término cuadrático para BAP; BB. término cuadrático para el Ci. (b) Efectos individuales de BAP y Ci sobre en la longitud de brote en *A.cupreata*.

Durante la multiplicación de los brotes de *A. cupreata* los tratamientos cultivados con a 2mg/L de Ci favorecieron significativamente su longitud ya que alcanzaron

una  $2.92 \pm 0.13$  cm, (Tukey  $p < 0.05$ ). Los brotes expuestos únicamente a Ci se caracterizaron por un rápido desarrollo durante la primera semana de cultivo, comportamientos similares se observaron en T7, T11, T12, T14, T15, T17 con longitud de brotes que van desde  $2.40 \pm 1.07$  cm a  $2.92 \pm 0.13$  cm. En la figura 15a presentan los diagramas de efectos estandarizados para las citocininas BAP y Ci, respectivamente. La interacción entre BAP y Ci es el factor con efecto significativo en la longitud de brotes (AB). En la figura 15b se puede apreciar que dicha interacción tiene un efecto negativo en la longitud de los brotes.

Esta gráfica muestra que la longitud de brotes se estimula a concentraciones más altas de Ci, siendo Ci la fitohormona que tiene la mayor influencia en la longitud. En *A. cupreata* la longitud máxima de los brotes es alcanzada en altas concentraciones de Ci, con 12cm.BAP por el contrario, fue relevante para la longitud de los brotes en concentraciones inferiores a 0.5 mg/L, al aumentar la concentración la longitud disminuye.

**Tabla 2. Número y longitud de brotes axilares generados de *Agave cupreata* después de 60 días de exposición usando en combinación BAP y Ci en cultivo *in-vitro*.**

	Tratamiento	Número de brotes	Longitud de brote
<b>T1</b>	BAP 0.0mgL <sup>-1</sup> + Ci 0.0mgL <sup>-1</sup>	0 ± 0 i*	0 ± 0 j
<b>T2</b>	BAP 0.0mgL <sup>-1</sup> + Ci 0.5mgL <sup>-1</sup>	1.20 ± 0.41 h	1.39 ± 0.44 fghi
<b>T3</b>	BAP 0.0mgL <sup>-1</sup> + Ci 1mgL <sup>-1</sup>	1.25 ± 0.44 h	1.31 ± 0.53 fghi
<b>T4</b>	BAP 0.0mgL <sup>-1</sup> + Ci 1.5mg <sup>-1</sup>	1.55 ± 0.51 gh	1.62 ± 0.73 fgh
<b>T5</b>	BAP 0.0mgL <sup>-1</sup> + Ci 2mgL <sup>-1</sup>	3.45 ± 0.88 d	2.92 ± 0.13 a
<b>T6</b>	BAP 0.5mgL <sup>-1</sup> + Ci 0mgL <sup>-1</sup>	1.40 ± 0.50 h	1.92 ± 0.68 cdef
<b>T7</b>	BAP 0.5mgL <sup>-1</sup> + Ci 0.5mgL <sup>-1</sup>	1.45 ± 0.51 h	2.77 ± 0.88 ab
<b>T8</b>	BAP 0.5mgL <sup>-1</sup> + Ci 1mgL <sup>-1</sup>	1.80 ± 0.41 fgh	1.43 ± 0.53 fghi
<b>T9</b>	BAP 0.5mgL <sup>-1</sup> + Ci 1.5mgL <sup>-1</sup>	1.45 ± 0.51 h	1.60 ± 0.49 fgh
<b>T10</b>	BAP 0.5mgL <sup>-1</sup> + Ci 2mgL <sup>-1</sup>	2.40 ± 0.50 ef	1.88 ± 0.50 def
<b>T11</b>	BAP 1mgL <sup>-1</sup> + Ci 0.0mgL <sup>-1</sup>	6.30 ± 0.57 bc	2.58 ± 0.80 bcde
<b>T12</b>	BAP 1mgL <sup>-1</sup> + Ci 0.5mgL <sup>-1</sup>	6.70 ± 0.57 b	2.64 ± 1.01 abcd
<b>T13</b>	BAP 1mgL <sup>-1</sup> + Ci 1mgL <sup>-1</sup>	6.05 ± 0.68 bc	1.85 ± 0.73 efg
<b>T14</b>	BAP 1mgL <sup>-1</sup> + Ci 1.5mgL <sup>-1</sup>	3.90 ± 0.91 d	2.68 ± 0.46 abc
<b>T15</b>	BAP 1mgL <sup>-1</sup> + Ci 2mgL <sup>-1</sup>	2.25 ± 0.44 e	2.59 ± 0.81 bcde
<b>T16</b>	BAP 1.5mgL <sup>-1</sup> + Ci 0mgL <sup>-1</sup>	8.7 ± 0.65 a	1.97 ± 0.39 cdef
<b>T17</b>	BAP 1.5mgL <sup>-1</sup> + Ci 0.5mgL <sup>-1</sup>	8.8 ± 0.83 a	2.40 ± 1.07 bcde
<b>T18</b>	BAP 1.5mgL <sup>-1</sup> + Ci 1mgL <sup>-1</sup>	8.6 ± 0.59 a	1.25 ± 0.91 fghi
<b>T19</b>	BAP 1.5mgL <sup>-1</sup> + Ci 1.5mgL <sup>-1</sup>	8.9 ± 0.64 a	1.09 ± 0.5 ghi
<b>T20</b>	BAP 1.5mgL <sup>-1</sup> + Ci 2mgL <sup>-1</sup>	5.7 ± 0.57 c	1.24 ± 0.36 fghi
<b>T21</b>	BAP 2mgL <sup>-1</sup> + Ci 0mgL <sup>-1</sup>	2.2 ± 0.96 ef	1.43 ± 0.44 fghi
<b>T22</b>	BAP 2mgL <sup>-1</sup> + Ci 0.5mgL <sup>-1</sup>	2.55 ± 0.60 e	0.94 ± 0.10 hi
<b>T23</b>	BAP 2mgL <sup>-1</sup> + Ci 1mgL <sup>-1</sup>	2.35 ± 0.58 ef	0.97 ± 0.39 hi
<b>T24</b>	BAP 2mgL <sup>-1</sup> + Ci 1.5mgL <sup>-1</sup>	1.30 ± 0.47 h	0.90 ± 0.20 hi
<b>T25</b>	BAP 2mgL <sup>-1</sup> + Ci 2mgL <sup>-1</sup>	1.75 ± 0.63 fgh	0.73 ± 0.40 i

\*Diferentes letras indican una diferencia significativa estadística a  $P < 0.05$ . BAP, 6-bencilaminopurina. Ci, Cinetina. Tukey ( $p < 0.05$ )  $n = 500$

### 7.3 Enraizamiento de los brotes micropropagados de *Agave cupreata*

De los reguladores de crecimiento evaluados, los tratamientos donde los brotes de *A. cupreata* se cultivaron con AIB desarrollaron mayor cantidad de raíces (figura 16 a-c). Los brotes cultivados con 1  $\mu\text{M}$  de AIB produjeron  $2.46 \pm 1.06$  raíces por brote, que aunque no presenta diferencias significativas con aquellos tratamientos que contenían 0.5  $\mu\text{M}$  de AIB y 1.5  $\mu\text{M}$  de AIB se destacó por ser significativo con respecto al resto de los tratamientos ( $P < 0.05$ ) tabla 3. La interacción entre ambas auxinas generó el mayor número de raíces en el tratamiento 0.5  $\mu\text{M}$  de AIB + 1  $\mu\text{M}$  de 2,4-D con  $1.69 \pm 0.53$ , aunque esto no presentó una diferencia significativa con el resto de los tratamientos ( $P > 0.05$ ). Menor respuesta en el número de raíces fue observada en el medio suplementado con 2,4-D.

**Tabla 3. Número de raíces generadas después de 30 días de exposición usando en AIB y 2,4-D en enraizamiento *in-vitro* de *Agave cupreata*.**

AIB ( $\mu\text{M}$ )	2,4-D ( $\mu\text{M}$ )			
	0.0	0.5	1	1.5
0.0	$0.45 \pm 0.51$ g	$0.8 \pm 0.41$ efg	$0.75 \pm 0.44$ fg	$0.75 \pm 0.55$ fg
0.5	$1.99 \pm 0.37$ abc	$1.43 \pm 0.53$ cde	$1.69 \pm 0.53$ bc	$1.5 \pm 0.60$ bcd
1	$2.46 \pm 1.06$ a	$0.75 \pm 0.44$ fg	$0.73 \pm 0.40$ g	$0.75 \pm 0.44$ fg
1.5	$2.1 \pm 0.78$ ab	$1.38 \pm 0.52$ cdef	$0.9 \pm 0.78$ defg	$0.55 \pm 0.60$ g

\*Diferentes letras indican una diferencia significativa estadística a  $P < 0.05$ . BAP, 6-bencilaminopurina. Ci, Kinetina. Tukey ( $p < 0.05$ )  $n = 250$

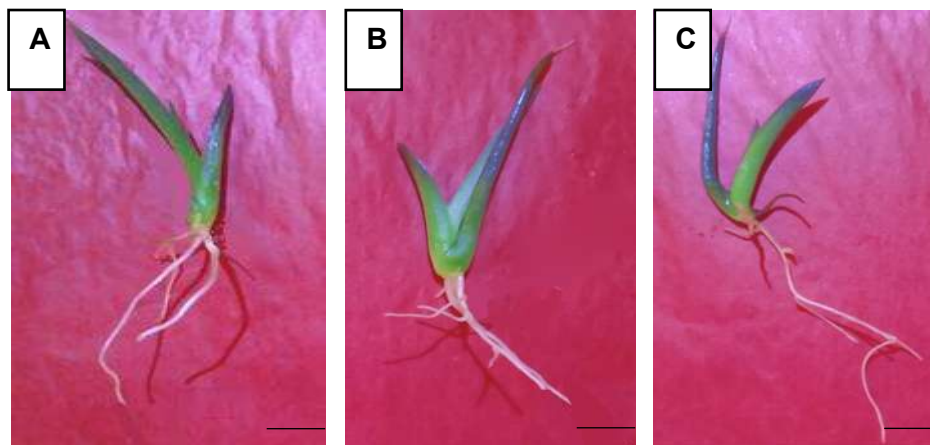


Figura 16. Plántulas enraizadas. A. Plántula 1 $\mu\text{M}$  AIB. B. Plántula 1.5 $\mu\text{M}$  AIB. C. Plántula 0.5 $\mu\text{M}$  AIB + 2,4-D 1 $\mu\text{M}$ . Barra= 1cm.

Para la generación de raíces por brote de *A. cupreata* los análisis de efectos estandarizados muestran que, aunque la interacción de las citocininas es una interacción positiva para la generación de raíz no es significativa, (figura 17b).

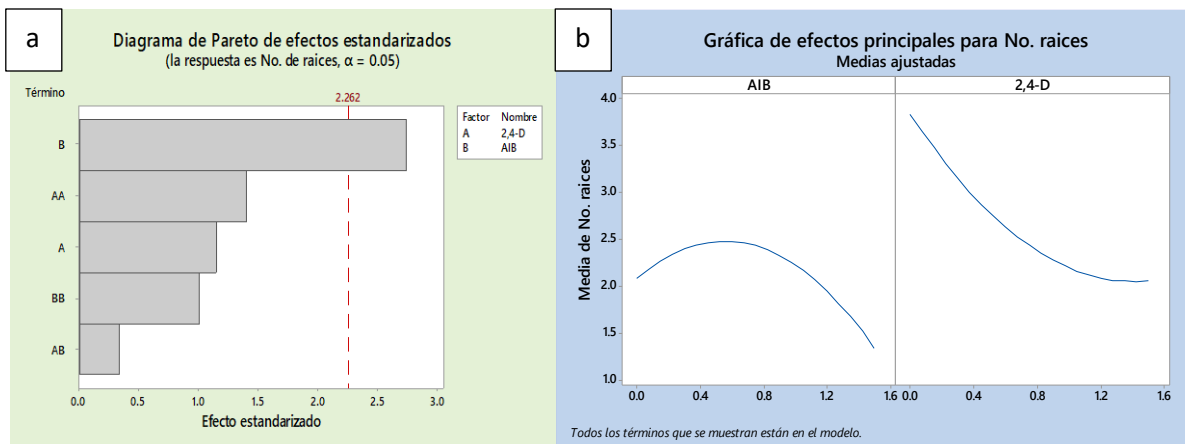


Figura 17. a) Gráfica de efectos estandarizados para el efecto del ácido indol-butírico (AIB) y 2,4- ácido diclorofenoxyacético (2,4-D) en raíces de *A.cupreata*. A. 2,4- ácido diclorofenoxyacético. B. ácido indol-butírico. AB interacción entre AIB y 2,4-D; (AA) término cuadrático para 2,4- D. (BB) término cuadrático para AIB. (b) Efectos principales de AIB y 2,4-D sobre en la longitud de brote

La gráfica de efectos principales muestra que utilizando dosis de 0.5 m $\mu$  a 1.5 m $\mu$  de AIB permite una generación de raíces superior a 3.5 por planta (figura 17b). El aumento de AIB es efectivo como tratamiento para el enraizamiento donde el rango de mayor generación de raíz es en las concentraciones de 0.5 m $\mu$  a 1.5 m $\mu$  de AIB. En el caso de la auxina 2,4-D los resultados muestran que el aumento de la concentración perjudica la generación de raíz.

## 7.4 Enraizamiento en sistema de inmersión temporal (SIT)

### 7.4.1 Construcción de un sistema de inmersión temporal para enraizamiento de brotes.

Para la elaboración del sistema de inmersión temporal se buscó ajustar el sistema a las necesidades de los brotes a enraizar identificando los parámetros de un sistema de inmersión para posteriormente escalarlo al sistema de enraizamiento. Los ajustes hechos al diseño se centran en la duración y frecuencia de la inmersión para reducir el principal problema de los cultivos de medio líquido que es la hiperhidricidad. Para una mejor oxigenación y lograr el intercambio de medio del frasco de medio al contenedor de los brotes, la bomba de agua con presión neumática ayuda a sumergir los brotes para que obtengan la humedad y el suplemento de nutrientes mediante contacto mínimo.

El periodo de inmersión se estableció en tres frecuencias diferentes, pero siguiendo el principio de que la inmersión se limitara a un minuto y la exposición al aire fuera prolongada a horas. Se aprovecharon las ventajas de la bandeja inclinada para permitir el drenaje de los tanques de cultivo por gravedad, figura 18a.

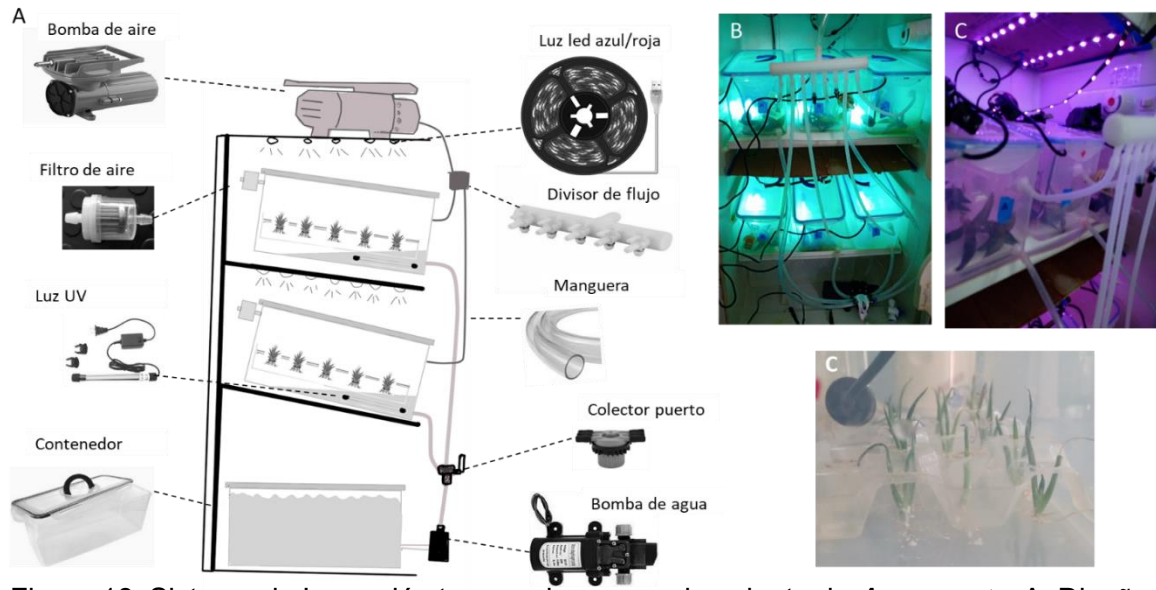


Figura 18. Sistema de Inmersión temporal para enraizamiento de *A. cupreata*. A. Diseño de sistema de inmersión temporal. B Brotes en luz fluorescente. C. Brotes en luz LED. C. Brotes en contenedor SIT.

Se priorizó contacto directo del tejido vegetal al ambiente gaseoso utilizando una entrada de aireación independiente de la presión neumática para mejorar la interfaz de transporte de oxígeno de gas a las células, contrastando con el cultivo semisólido dónde la interfaz de transporte de oxígeno presenta resistencia.

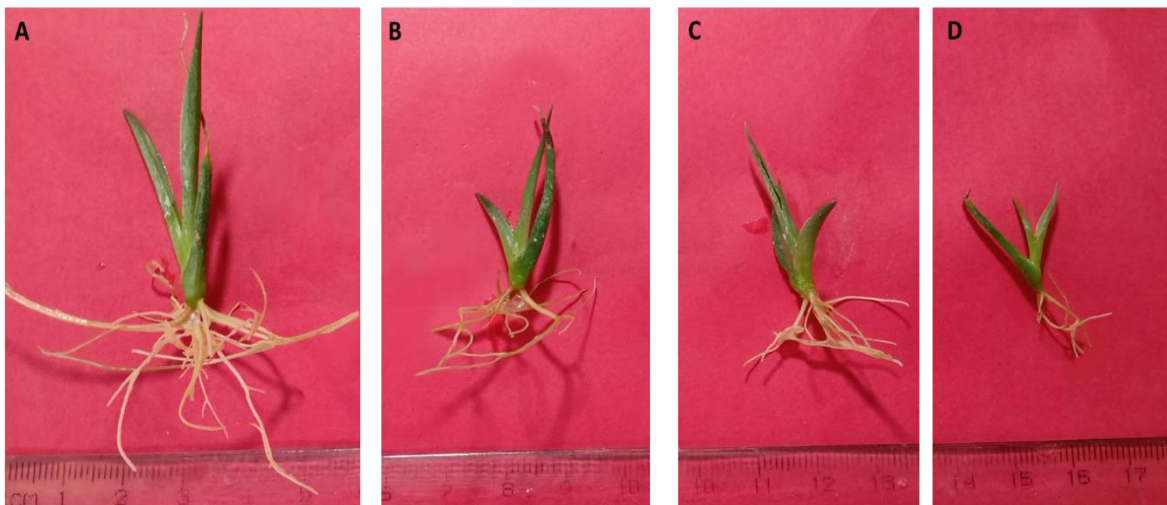


Figura 19. Efecto del tipo de cultivo en plántulas de *A. cupreata*. A. Plántula cultivada en sistema de inmersión temporal, frecuencia de inmersión 1minx72h. B. Plántula cultivada en sistema de inmersión temporal, frecuencia de inmersión 1minx24h. C. Plántula cultivada en sistema de inmersión temporal, frecuencia de inmersión 1minx8h. D. Cultivo en medio semisólido.

La maximización del espacio utilizando un contenedor de 10cm x 30 cm para evitar que la densidad de brotes interfiriera con el desarrollo radical, (figura 18c). El

sistema de iluminación LED y fluorescente, (figura 18b-c) y los ciclos de inmersión se programaron a través de temporizadores independientes.

En el enraizamiento a través del sistema de inmersión temporal Los primeros efectos en los brotes se observaron a los 7 días de cultivo, todos los brotes presentaron formación de raíces adventicias y el número de raíces por brote fue mayor para todos los tratamientos de inmersión que en el sistema semisólido, (Tabla 4).

El sistema de cultivo semisólido generó  $2.62 \pm 0.76$  raíces por brote, en contraste, los tratamientos de inmersión generaron  $5.16 \pm 0.85$  raíces por brotes en SIT-8h,  $6.50 \pm 1.38$  raíces en SIT-24 y  $9.27 \pm 2.10$  en SIT-72, esto colocó a los tratamientos en SIT por encima del cultivo en medio semisólido debido a que son capaces de generar un número de raíces estadísticamente significativo ( $p < 0.05$ ).

De las frecuencias de inmersión evaluadas, una inmersión de 1min cada 72h (SIT-72) generó el mayor número de raíces por brote  $9.27 \pm 2.10$  en comparación al resto de los tratamientos ( $p < 0.05$ ).

La longitud en las raíces de los brotes se vio igualmente favorecida en el tratamiento SIT-72, donde las raíces alcanzaron una longitud promedio de  $7.07 \pm 1.44$  cm, este tratamiento se diferenció significativamente de los tratamientos SIT-24, SIT-8 y SS que generaron brotes de longitud inferior. El desarrollo del sistema radicular en los brotes cultivados en el sistema de inmersión temporal generó más raíces secundarias adventicias que los brotes cultivados en medio semisólido.

Tratamiento		Número de raíces	Longitud de raíz (cm)	Incremento de tamaño de brote (cm)	Biomasa fresca acumulada (g)	Índice de crecimiento
Sistema semisólido	SS*	$2.62 \pm 0.76$ d**	$2.06 \pm 0.51$ d	$0.56 \pm 0.40$ c	$0.348 \pm 0.10$ b	$1.247 \pm 0.61$ b
Sistema de inmersión temporal	SIT-8	$5.16 \pm 0.85$ c	$3.98 \pm 1.51$ c	$1.46 \pm 0.44$ bc	$0.62 \pm 0.35$ a	$2.41 \pm 2.06$ a
	SIT-12	$6.50 \pm 1.38$ b	$5.32 \pm 1.29$ b	$1.44 \pm 0.83$ b	$0.61 \pm 0.30$ a	$2.82 \pm 1.24$ a
	SIT-72	$9.27 \pm 2.10$ a	$7.07 \pm 1.44$ a	$3.10 \pm 1.26$ a	$0.69 \pm 0.20$ a	$3.28 \pm 1.46$ a

\* **Sistema de cultivo: SS, medio semisólido. SIT-8 frecuencia de inmersión 1min cada 8h. SIT-12 frecuencia 1min cada 24h. SIT-72 frecuencia 1min cada 72h. Valores de la Media  $\pm$  DE. \*\* Las letras diferentes representan valores significativos (Tukey  $p \leq 0.05$ ). n=250**

En cuanto al desarrollo aéreo de los brotes es importante destacar que el efecto del sistema de cultivo no sólo se limitó al sistema radicular, sino que también tuvo una influencia en las características morfológicas, tamaño y peso de los brotes enraizados, figura 19.

Las frecuencias de inmersión en los tratamientos SIT-24 y SIT-72 se diferenciaron significativamente entre ellas consiguiendo incrementos de tamaño que iban desde  $1.44 \pm 0.83$  cm y  $3.10 \pm 1.26$  cm respectivamente. Sin embargo, los brotes enraizados

en SIT-8 no aumentaron significativamente la altura de los brotes enraizados con respecto a aquellos cultivados en medio semisólido,  $0.56 \pm 0.40$  cm.

Este crecimiento también se reflejó en la cantidad de biomasa fresca acumulada ya que los brotes enraizados en el SIT aumentaron su biomasa considerable. Los análisis muestran que la acumulación de biomasa en los brotes enraizados en SIT no presenta diferencias significativas entre tratamientos.

El tratamiento SIT-72 fue el que presentó una mayor acumulación con  $0.69 \pm 0.20$  g, comparados con los brotes enraizados en sistema semisólido este aumento es casi del doble en la biomasa.

Acorde con esta información, los resultados obtenidos para el índice de crecimiento señalan que los brotes enraizados en SIT tienen un crecimiento significativamente mayor que el del medio semisólido. Los brotes de *A. cupreata* no presentaron diferencias significativas entre las frecuencias de inmersión probadas, pero se observa una tendencia al incremento en el índice de crecimiento con la reducción en la frecuencia de inmersión ya que el índice de crecimiento más alto de  $3.28 \pm 1.46$  cm se registró en el tratamiento SIT-72, mientras que el SIT-8 tuvo un índice de crecimiento de  $2.41 \pm 2.06$ .

### 7.5 Influencia del tipo de luz en el crecimiento y desarrollo de *Agave cupreata* durante la fase de enraizamiento *in-vitro*.

Los datos recabados señalan que la exposición a exposición a luz LED y luz fluorescente no generan diferencias significativas en el sistema de cultivo semisólido en lo que respecta a la generación de raíces, crecimiento de la raíz y desarrollo de la parte aérea. Sin embargo, hay un aumento significativo en el índice de crecimiento cuando son expuestas a luz fluorescente, (figura 20 c-d).

Se observó una ligera reducción en el desarrollo radicular y tamaño de las plantas cultivadas en el tratamiento semisólido bajo luz LED con respecto a su contraparte cultivada en luz fluorescente, sin embargo, esta reducción no tiene significancia estadística. Por otro lado, el sistema de inmersión temporal registró un aumento no significativo en todos los parámetros evaluados, ( $P>0.05$ ), tabla 5.

<b>Tabla 5. Diferencia del tipo de luz en el efecto del sistema de cultivo en el desarrollo de brotes de <i>Agave cupreata</i> en enraizamiento</b>						
Tratamiento		Número de raíces	Longitud de raíz (cm)	Incremento de tamaño de brote (cm)	Biomasa fresca acumulada (g)	Índice de crecimiento
Luz fluorescente	SS**	2.46±0.06 b*	2.23±0.53 b	0.56 ± 0.40 b	0.34±0.10 b	1.24±0.61 b
	SIT-72	9.27±2.10 a	7.07 ± 1.51 a	3.10 ± 1.26 a	0.69±0.20 a	3.28±1.46 a
Luz LED	SS	2.16±0.86 b	1.57± 0.57 b	1.22± 0.53 b	0.46±0.10 b	0.92±0.74 c
	SIT-72	8.33±1.68 a	6.01 ± 1.97 a	3.60 ± 1.05 a	0.72±0.21 a	4.03±1.95 a

**\*\*Sistema de cultivo: SS, medio semisólido. SIT-72 frecuencia 1min cada 72h. Valores de la Media ± DE. \*Las letras diferentes representan valores significativos, (Tukey  $p \leq 0.05$ )  $n=250$ .**

### 7.6 Efecto del sistema de cultivo y tipo de luz en el contenido de pigmentos fotosintéticos en plántulas de *Agave cupreata*.

Existieron diferencias significativas entre los tratamientos que fueron cultivados con diferentes tipos de luz, así como el sistema de cultivo con respecto al contenido de pigmentos fotosintéticos al final del proceso de enraizamiento.

Un escrutinio detallado de los resultados obtenidos mostró que la exposición a luz LED en conjunto con el sistema de inmersión temporal durante el enraizamiento, aumenta el contenido de clorofila en las plántulas de *A. cupreata*.

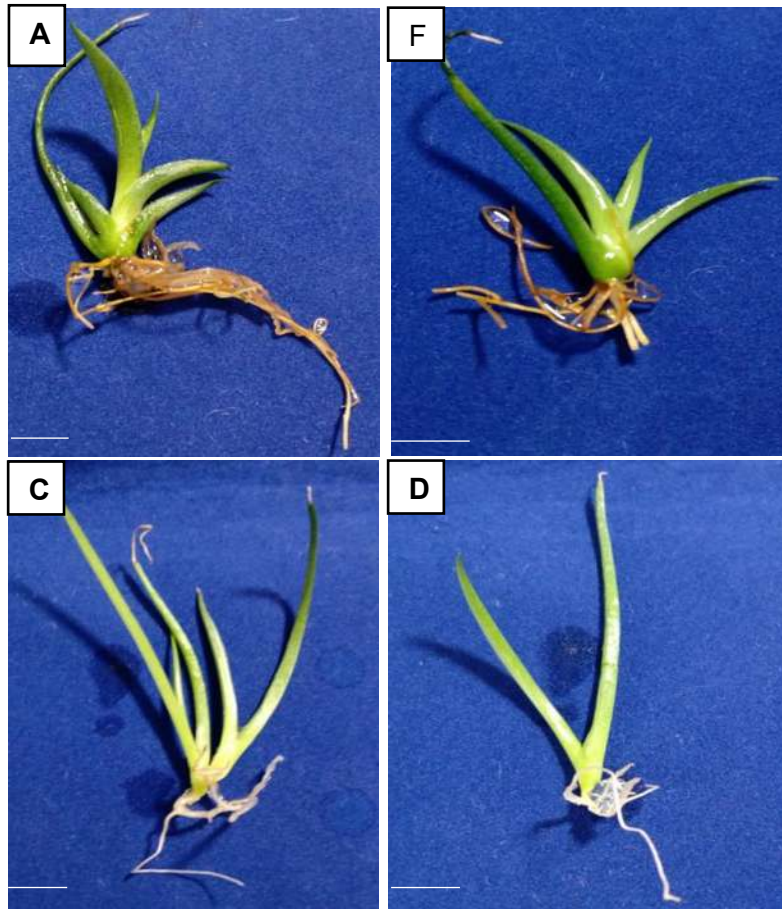


Figura 20. Efecto del tipo de iluminación en plántulas de *A. cupreata*. A. Plántula cultivada en sistema de inmersión temporal, frecuencia de inmersión 1minx72h bajo luz LED. B. Plántula cultivada en sistema de inmersión temporal, frecuencia de inmersión 1minx72h bajo luz fluorescente. C. Plántula cultivada en sistema de medio semisólido bajo luz fluorescente. D. Plántula cultivada en sistema de medio semisólido bajo luz LED

Enfocándonos puramente en cómo afectó la concentración de clorofila el tipo sistema de cultivo, los resultados muestran que el tratamiento de las plántulas en sistema de inmersión temporal mejora considerablemente la producción de clorofila en las hojas de las plantas enraizadas ya que en todos los casos la concentración de clorofila era significativamente mayor a la del sistema semisólido.

Este fenómeno ocurrió independientemente del tipo de luz a la que fueron expuestas. En aquellas plántulas cultivadas bajo luz fluorescente el tratamiento SIT-72 mostró tener el contenido de clorofila más alto entre los tratamientos con  $1.28 \pm 1.11$  mg/g, y aunque no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos de las plántulas cultivadas en sistema de inmersión temporal, es importante resaltar que el sistema semisólido tuvo un rendimiento significativamente menor produciendo en promedio  $0.26 \pm 0.22$  mg/g de clorofila en peso fresco por hoja.

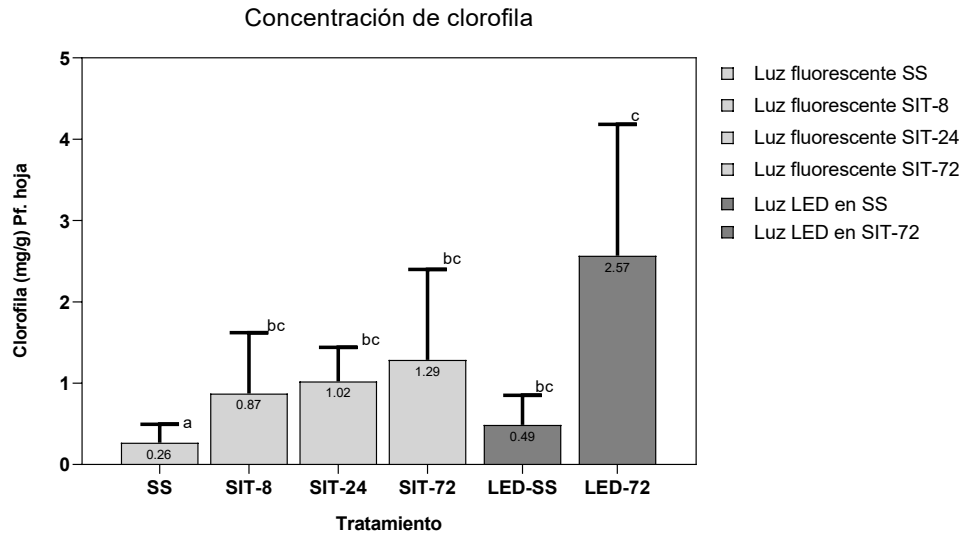


Figura 21. Contenido de clorofila en mg/g de peso fresco. SS. sistema semisólido. SIT-8 sistema de inmersión 1min x 8h. SIT-24 sistema de inmersión 1min x 24h. SIT-72 sistema de inmersión 1min x 72h. LED-SS tratamiento con luz LED de medio semisólido. LED-72 tratamiento con luz LED sistema de inmersión 1min x72h. Las medias que no comparten letra son significativas, (Tukey  $p < 0.05$ ).

De igual forma, en las plantas cultivadas bajo luz LED, el sistema de inmersión temporal tuvo una influencia positiva en la concentración de clorofila. En la figura 21

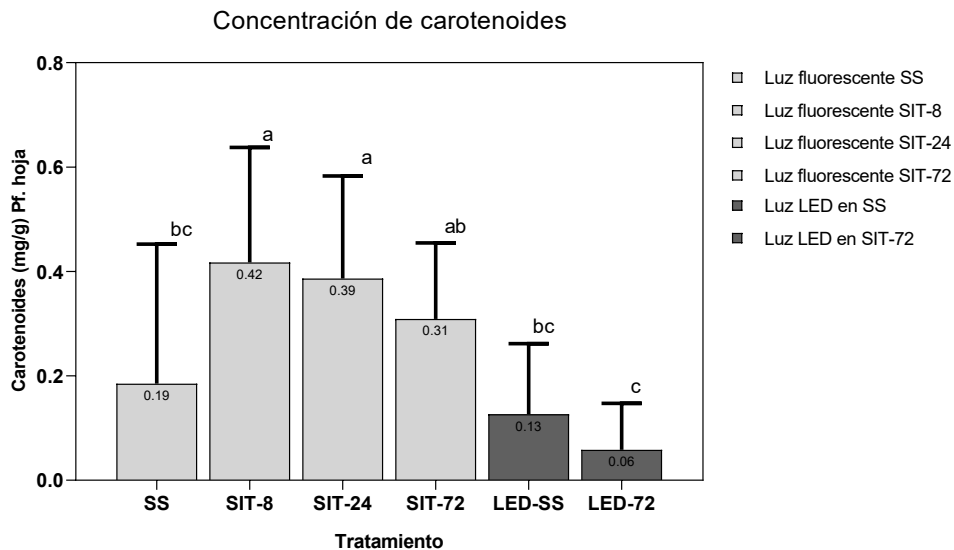


Figura 22. Contenido de carotenoides en mg/g de peso fresco. SS. sistema semisólido. SIT-8 sistema de inmersión 1min x 8h. SIT-24 sistema de inmersión 1min x 24h. SIT-72 sistema de inmersión 1min x 72h. LED-SS tratamiento con luz LED de medio semisólido. LED-72 tratamiento con luz LED sistema de inmersión 1min x72h. Las medias que no comparten letra son significativas, (Tukey  $p < 0.05$ ). Datos muestran media  $\pm$  DE, (n=96).

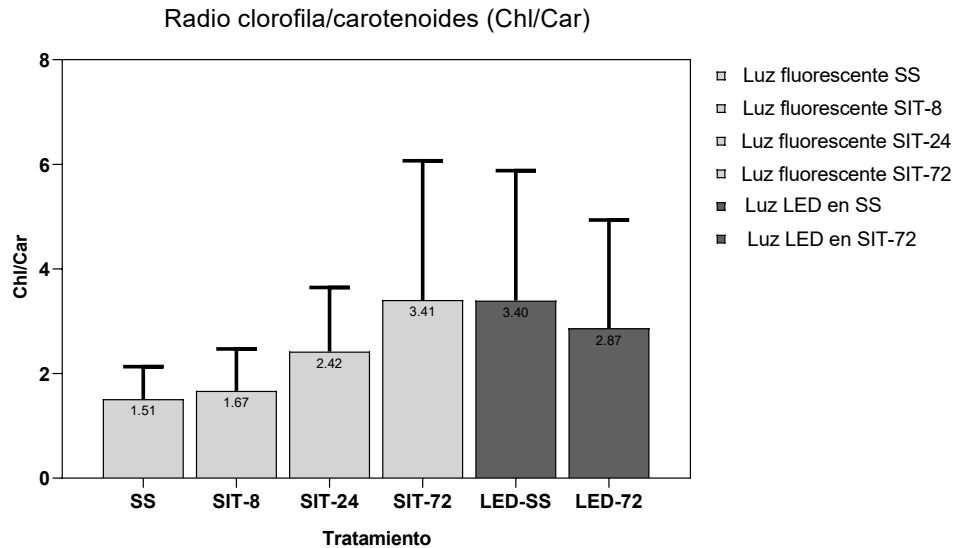


Figura 23. Radio de contenido clorofila/carotenoides de brotes enraizados de *A. cupreata*. SS. sistema semisólido. SIT-8 sistema de inmersión 1min x 8h. SIT-24 sistema de inmersión 1min x 24h. SIT-72 sistema de inmersión 1min x 72h. LED-SS tratamiento con luz LED de medio semisólido. LED-72 tratamiento con luz LED sistema de inmersión 1min x72h. Las medias que no comparten letra son significativas, (Tukey  $p < 0.05$ ). Datos muestran *media ± DE*, ( $n=96$ ).

se puede apreciar que las plántulas que estuvieron en tratamiento LED-72 acumularon la concentración más alta de clorofila con  $2.56 \pm 1.61 \text{ mg/g}$  valor significativo  $P < 0.05$  con respecto al resto de los tratamientos.

Por otra parte, se observó que el tipo de luz tiene un efecto estimulante en la concentración de clorofila acumulada en las hojas ya que se observó un aumento en todos los casos los tratamientos con luz LED

Una comparativa del sistema semisólido cultivado con luz fluorescente muestra que se acumuló en promedio  $0.26 \pm 0.22 \text{ mg/g}$  de clorofila. Y en éste mismo sistema, pero cultivado bajo luz LED los valores obtenidos de la concentración de clorofila en hojas son superiores llegando a  $0.49 \pm 0.36 \text{ mg/g}$ . De igual forma, si se compara el tratamiento SIT-72 que fue el tratamiento con mejor rendimiento cultivado bajo luz fluorescente con LED-72 muestra que el cultivo bajo luz LED favorece a un mayor contenido de clorofila en las plantas de *A. cupreata*.

Sin embargo, el análisis del contenido de carotenoides en peso fresco por hoja señaló que, la luz fluorescente en el sistema de inmersión temporal favorece la síntesis de carotenoides. Los tratamientos SIT-8, SIT-24 y SIT-72 propiciaron significativamente el contenido de carotenoides con  $0.42 \pm 0.22 \text{ mg/g}$ ,  $0.38 \pm 0.19 \text{ mg/g}$  y  $0.30 \pm 0.14 \text{ mg/g}$  respectivamente. Esta información indica que a frecuencias de inmersión menores el contenido de carotenoides aumenta, como se observa en la figura 22. En el tratamiento SIT-8 la concentración de carotenoides por peso

fresco de hoja fue mayor que en comparación con el resto de los tratamientos. En el sistema de cultivo semisólido la producción de carotenoides fue mínima con  $0.19 \pm 0.26$  mg/g.

Por otra parte, al ser expuestos los brotes a luz LED que estaban en SIT, disminuyeron la concentración de carotenoides, esto se observa comparando el tratamiento LED-72 donde el máximo registrado es de  $0.06 \pm 0.26$  mg/g con el tratamiento SIT-72 que registró  $0.30 \pm 0.14$  mg/g.

En las plantas cultivadas en sistema semisólido, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre aquellas enraizadas en luz LED o luz fluorescente. Aunque se observa una tendencia a disminuir al ser cultivadas en luz LED ( $0.12 \pm 0.13$  mg/g), en comparación con las plántulas provenientes del cultivo en luz fluorescente.

En general, el relación Chl/Car entre las plántulas no mostró variación entre tratamientos, ya que ninguno presentó diferencias significativas. Los niveles más bajos de relación Chl/Car en plántulas enraizadas se observaron en el sistema de cultivo semisólido.

Las plántulas cultivadas bajo luz fluorescentes en SIT-72 alcanzaron un relación similar a las plántulas que habían sido cultivadas en el tratamiento LED-SS con los valores de relación Chl/Car más altos de todos los tratamientos, ( $3.40 \pm 2.66$  y  $3.39 \pm 2.48$ ). Sin embargo, el relación en Chl/Car en el sistema de inmersión temporal LED-72 fue menor ( $2.80 \pm 2.06$ ), (figura23).

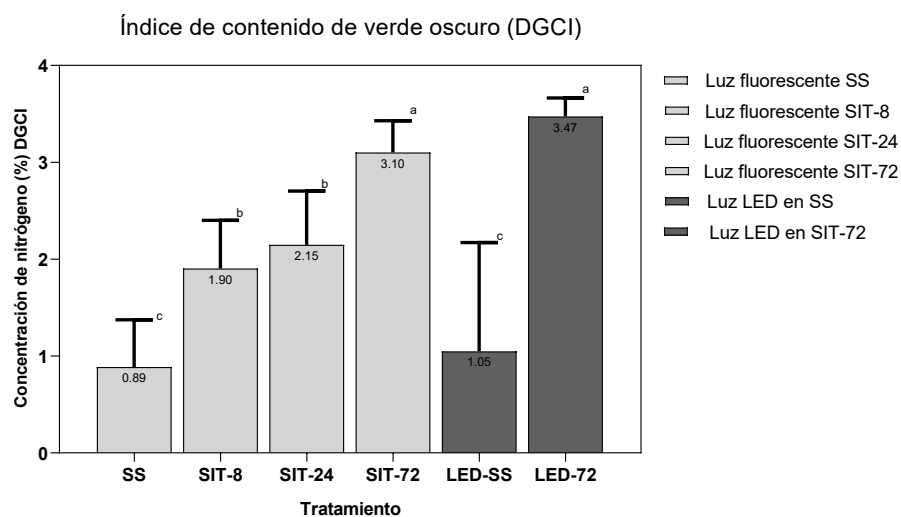


Figura 24. Radio de contenido clorofila/carotenoides de hojas de brotes enraizados de *A. cupreata*. SS. sistema semisólido. SIT-8 sistema de inmersión 1min x 8h. SIT-24 sistema de inmersión 1min x 24h. SIT-72 sistema de inmersión 1min x 72h. LED-SS tratamiento con luz LED de medio semisólido. LED-72 tratamiento con luz LED sistema de inmersión 1min x72h. Las medias que no comparten letra son significativas, (Tukey  $p < 0.05$ )  $n = 96$ .

El índice de color verde oscuro (DGCI) mostró una aproximación del contenido de nitrógeno (%) en las plántulas. La luz fluorescente favoreció en mayor medida a los tratamientos del sistema de inmersión temporal en el contenido de nitrógeno en especial en el tratamiento SIT-72 donde se determinó un valor de  $3.10 \pm 0.32$  % de N, significativo con respecto al resto de los tratamientos expuestos a la luz fluorescente, ( $P < 0.05$ ). Por otro lado la respuesta del tratamiento SIT-72 al cultivo bajo luz LED no fue significativamente diferente, aunque si fue mayor, ( $3.47 \pm 0.19$  % de N). De igual forma, el tipo de luz no fue un factor influyente en las plántulas cultivadas en sistema semisólido, (figura 24).

## 7.7 Adaptación *ex-vitro* de plántulas de *Agave cupreata*.

### 7.7.1 Supervivencia de las plántulas de *Agave cupreata*

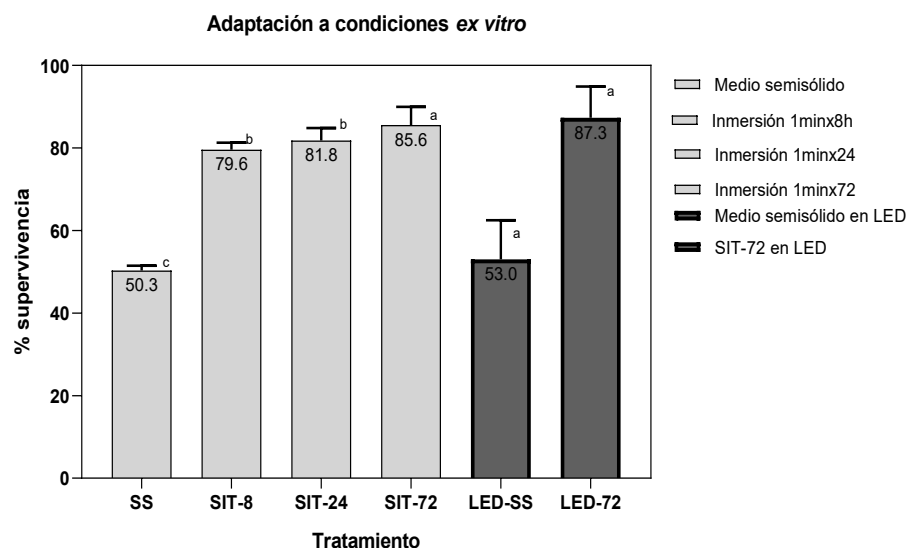


Figura 25. Porcentaje de plántulas sobrevivientes del proceso de aclimatación. SS. sistema semisólido. SIT-8 sistema de inmersión temporal frecuencia 1minx8h. SIT-24 sistema de inmersión temporal frecuencia 1minx24h. SIT-72 sistema de inmersión temporal frecuencia 1minx72h, (Tukey  $P < 0.05$ )  $n=200$

En lo que respecta a la supervivencia de las plantas, se obtuvieron resultados positivos en todos los tratamientos. Se logró una aclimatación del 50.3% en plantas enraizadas en medio semisólido, en general el sistema de inmersión temporal mostró un porcentaje de supervivencia significativamente superior. Los tratamientos SIT-8 y SIT-24 no mostraron diferencias significativas en el porcentaje de supervivencia con 79.6% y 81.8% respectivamente. El tratamiento SIT-72 tuvo el mayor porcentaje de supervivencia con 85.6%, figura 25.

## 7.7.2 Evaluación de caracteres morfológicos de las plantas aclimatadas de *A. cupreata*

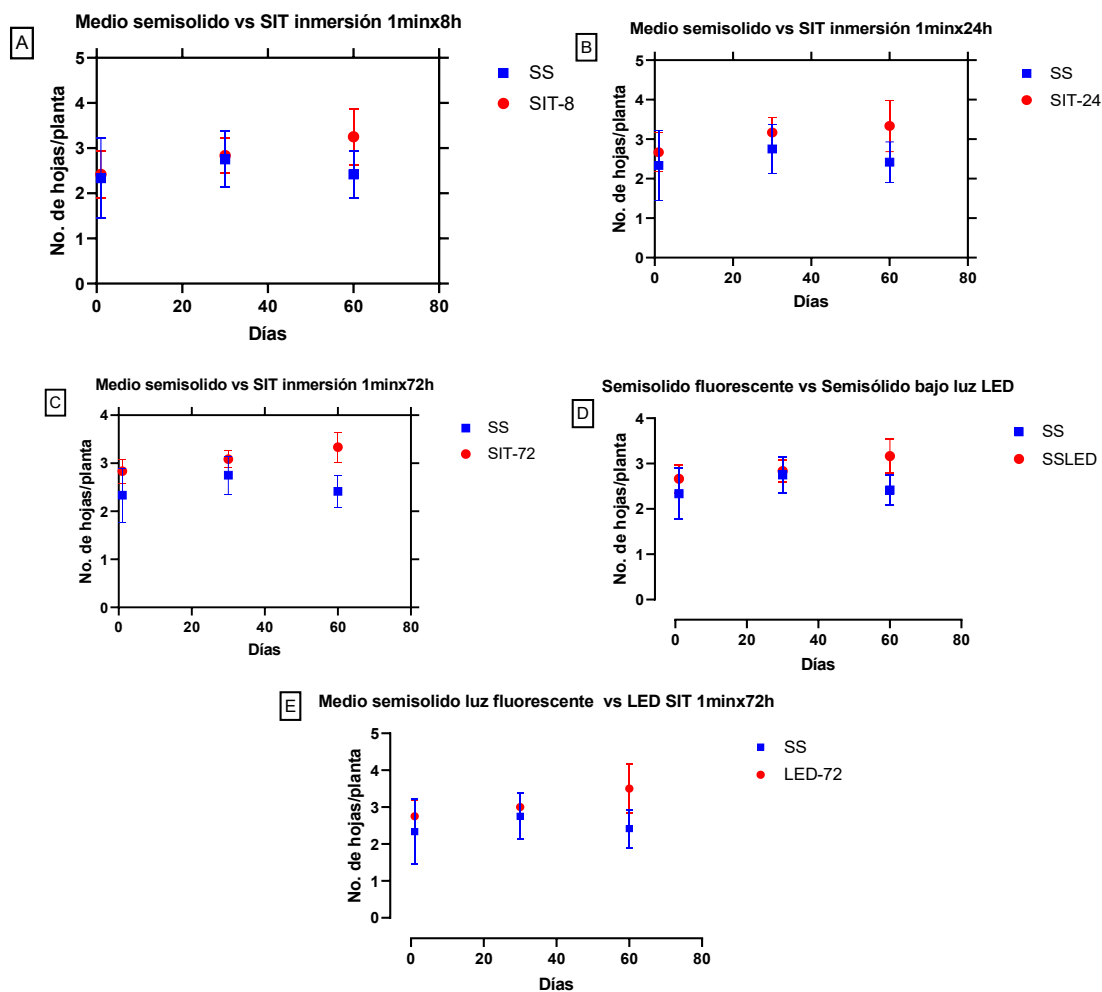


Figura 26. A-B. Efecto del sistema de cultivo en la fase de aclimatación de *A. cupreata* en el número de hojas totales a los 60 días de aclimatación. SS medio semisólido. SIT-8 frecuencia de inmersión 1minx8h. SIT-24 frecuencia de inmersión 1 minx24h. SIT-72 frecuencia de inmersión 1minx72h. (A-C) Medio de cultivo SS vs. SIT. (D-E) Comparación del tipo de luz y medio de cultivo. Datos muestran media  $\pm$  DE, (n=200).

Las plantas cultivadas en el sistema medio semisólido experimentaron un significativo decrecimiento en el número de hojas durante los primeros 20 días, posteriormente las plantas generaron nuevas hojas. La disminución en el número de hojas fue menor en las plantas cultivadas en medio líquido en el sistema de inmersión temporal. Después de 30 días de aclimatación el sistema de inmersión temporal produjo un número superior de hojas por planta en especial los tratamientos SIT-72 y SIT-72, figura 26a-c.

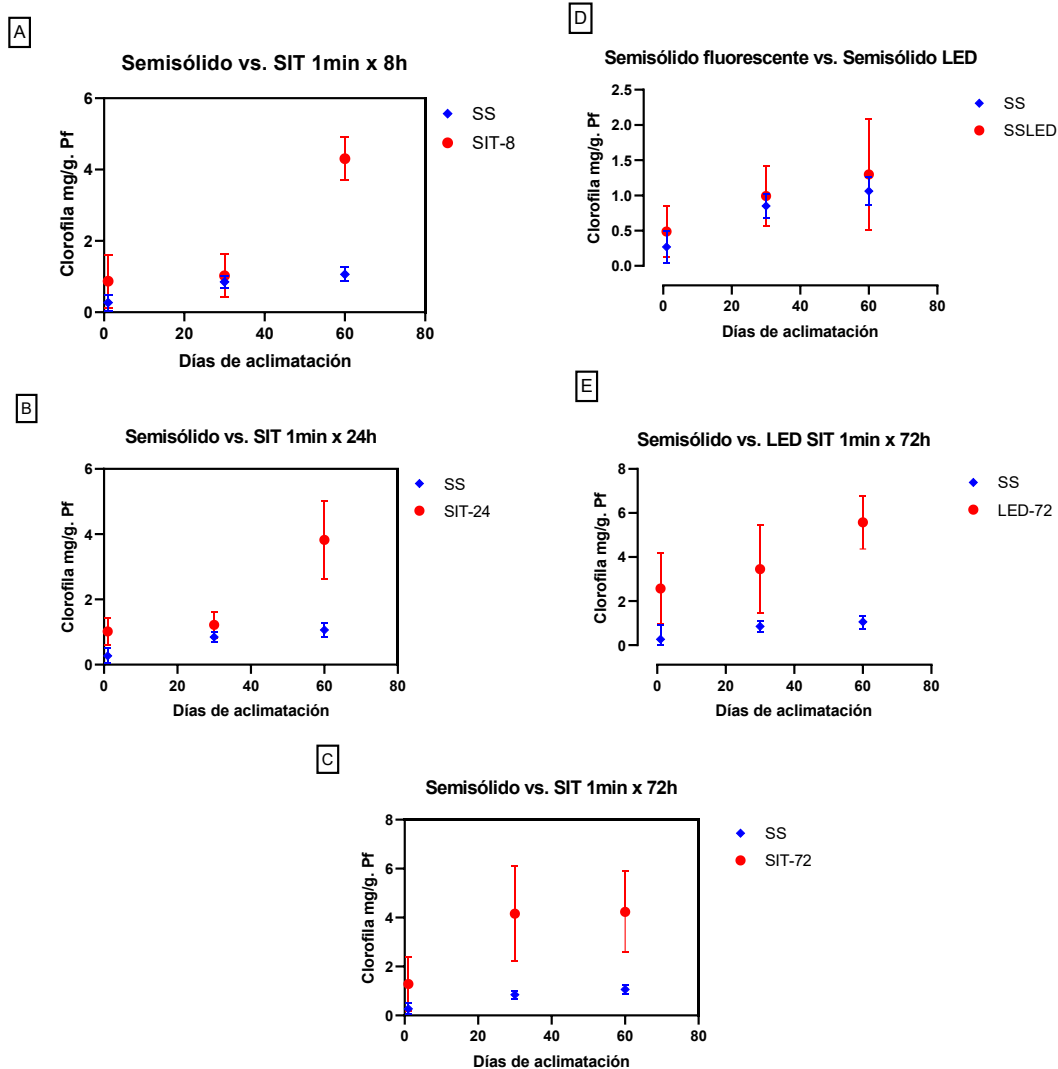


Figura 27. Efecto del sistema de cultivo en la concentración de clorofila (mg/g) de peso fresco de *A. cupreata* a los 60 días de aclimatación. SS medio semisólido. SIT-8 frecuencia de inmersión 1minx8h. SIT-24 frecuencia de inmersión 1minx24h. SIT-72 frecuencia de inmersión 1minx72h. (A-C) Medio de cultivo SS vs. SIT. (D-E) Comparación del tipo de luz y medio de cultivo. Datos muestran media  $\pm$  DE, (n=200).

En este estudio, el tipo de luz al que las plantas fueron expuestas durante el enraizamiento no tuvo un efecto significativo en el número de hojas totales de las plantas. Las plantas cultivadas en sistema de inmersión temporal bajo luz LED generaron una media final de 6 hojas por planta, un número ligeramente más alto que las plantas cultivadas en luz fluorescente. Sin embargo, es importante recalcar que en medio semisólido la luz LED evitó el decrecimiento en el número de hojas durante los primeros 20 días que se observó en las plantas cultivadas bajo la luz fluorescente, figura 26d-e.

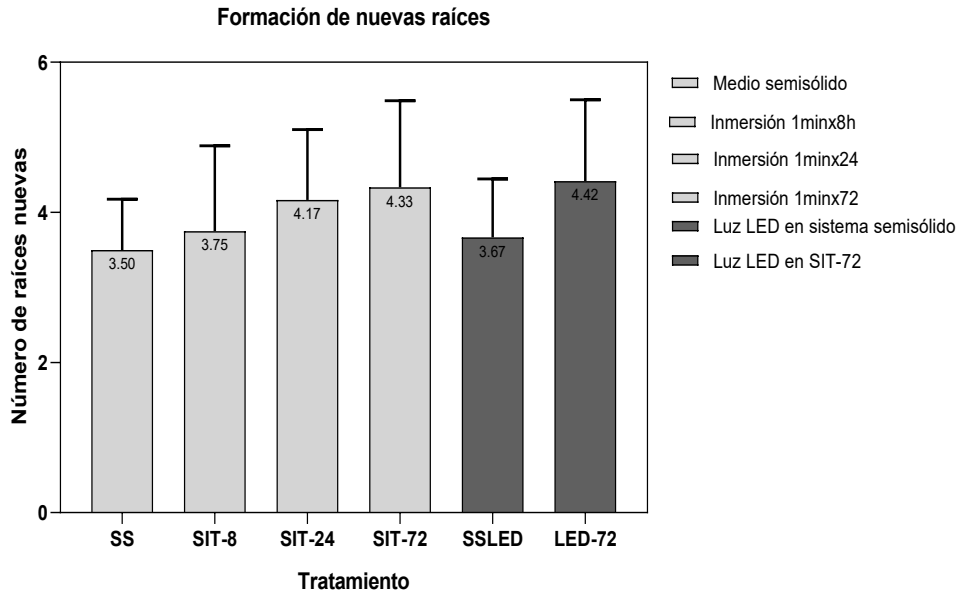


Figura 28. Efecto del medio de cultivo en la formación de raíces durante la fase de aclimatación en *A. cupreata* a los 60 días de aclimatación. (SS) sistema semisólido. (SIT-8) sistema de inmersión temporal frecuencia 1minx8h. (SIT-24) sistema de inmersión temporal frecuencia 1minx24h. (SIT-72) sistema de inmersión temporal frecuencia 1minx72h. (SSLED) Luz fluorescente en medio semisólido. (LED-72) Luz LED en sistema de inmersión temporal frecuencia 1minx72h. Datos muestran media  $\pm$  DE, ( $n=200$ ).

Todas las plantas experimentaron un aumento en la concentración de clorofila al final de la aclimatación. La estimación del contenido de clorofila de las plantas cultivadas en sistema de inmersión temporal se mantuvo mayor que la de las plantas cultivadas en medio semisólido durante los primeros 30 días de la aclimatación *ex-vitro*, pero no se observó un efecto diferencial en la frecuencia de inmersión. En general, a los 60 días de aclimatación todos los tratamientos presentaron niveles similares de clorofila, (Figura 27a-c).

La luz LED en combinación con SIT tiene una influencia positiva en el contenido de clorofila. El tratamiento LED-72 tuvo el mayor contenido de clorofila con 4.56 mg/g. Valores inferiores se registraron en SIT-72 que se cultivó únicamente bajo luz fluorescente, 2.47 mg/g. Se observó que el tipo de luz no afecta significativamente el contenido de clorofila en medio semisólido, ya que tanto la luz LED como la luz fluorescente mostraron valores similares en la concentración de clorofila después de 60 días de aclimatación como se observa en la (figura 27d-e) donde SS tuvo una concentración final de 1.88 mg/g y LEDSS 2.144.

Durante la aclimatación, hubo una exitosa generación de nuevas raíces en las plantas de *A. cupreata*, el crecimiento del sistema radicular de dio independientemente del sistema de cultivo ya que no se presentó una diferencia

significativa entre tratamientos ANOVA ( $P < 0.05$ ), figura 28. El desarrollo radicular se favorece cuando el sistema de inmersión temporal se combina con luz LED durante la etapa de enraizamiento generando 4.5 raíces más por planta, este efecto no se observa en el medio semisólido, figura 29.

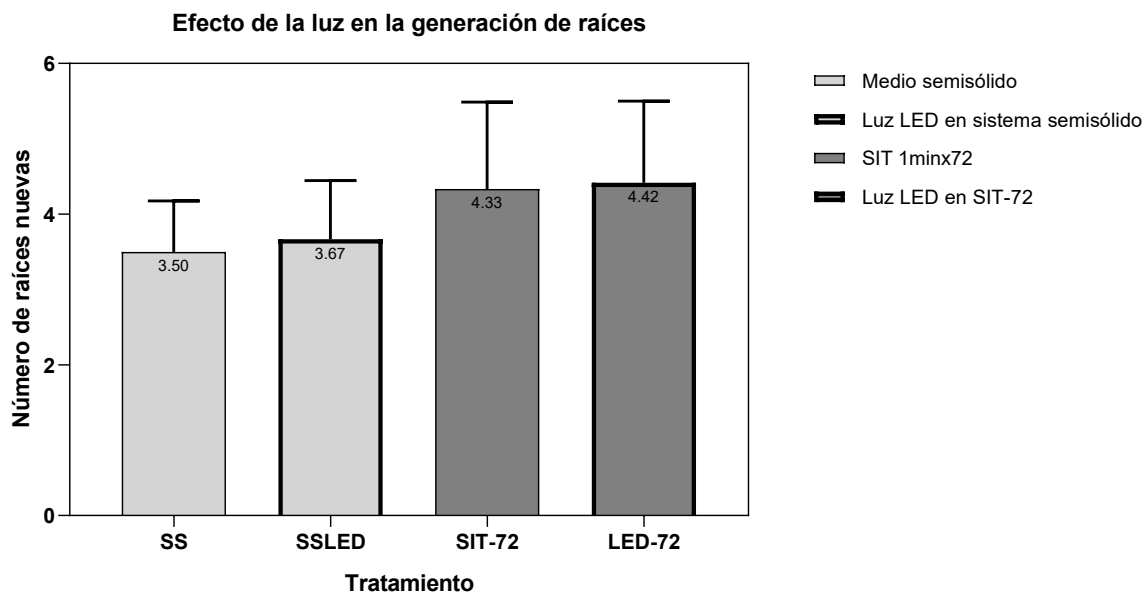


Figura 29. Efecto del medio de cultivo en la formación de raíces a los 60 días de la fase de aclimatación. SS. sistema semisólido. SIT-8 sistema de inmersión temporal frecuencia 1minx8h. SIT-24 sistema de inmersión temporal frecuencia 1minx24h. SIT-72 sistema de inmersión temporal frecuencia 1minx72h. SSLED Luz fluorescente en medio semisólido. LED-72. Luz LED en sistema de inmersión temporal frecuencia 1minx72h. Datos muestran media  $\pm$  DE, ( $n=200$ ).

## 8. Discusión

### 8.1 Germinación de semillas.

El agave en condiciones silvestres, durante su reproducción sexual, produce una gran cantidad de semillas. Sin embargo, algunas semillas carecen de embriones y/o endospermo (también conocidas como semillas blancas), y las semillas negras que pueden tener embriones y endospermo pueden no sobrevivir, por lo que la tasa de éxito de la germinación es baja (Ramírez-Tobías *et al.*, 2011). Actualmente no se tiene suficiente información del porcentaje semilla viable por fruto en la especie *A. cupreata*. En el lote de semillas que se utilizó para los ensayos, la proporción de semillas con caracteres morfométricos adecuados para la germinación de este estudio contada fue relativamente baja con 70% de semillas blancas inviables y 30% de semillas negras viables.

La baja cantidad de semillas negras puede deberse a la etapa que durante la etapa de fruto la umbela se abre prematuramente, lo que resulta en una alteración en la maduración del fruto o quioté causando que las semillas no lleguen a completar su ciclo de desarrollo y produzcan pocas semillas negras de calidad (Vásquez *et al.*, 2011).

El ensayo de comportamiento germinativo inicial mostró que el lote de semillas seleccionado tenía un porcentaje de germinación de 48.25% donde el 45.3% de las semillas tuvieron que ser descartadas por dar signos de contaminación.

En las pruebas de germinación realizadas en el lote de semillas de *A. cupreata* dieron un porcentaje de viabilidad promedio de 48.25% que es un valor que se coloca muy por debajo de lo reportado por García-Meneses en 2004, quien determinó una viabilidad promedio germinación del 95% para *A. cupreata*. Sin embargo, es importante recalcar que estos resultados fueron de semillas recién colectadas, y que esta viabilidad se redujo a 90% pasados 145 días en condiciones naturales. Las semillas proporcionadas por el Laboratorio de Nutrición Vegetal fueron colectadas en 2018. Hernández *et al.* 2019 determinó que, entre colectas a diferentes años de semillas de *A. potatorum* son diferentes ( $p \leq 0,05$ ) en contenido de lípidos, proteínas, VOL, PNOR, PFR, PFP y PFT. El contenido de lípidos y la germinación disminuyen significativamente al aumentar el tiempo de recolecta.

Algunas semillas negras presentaron una ausencia de endospermo, lo cual es un fenómeno común en los agaves esto debido a que la semilla no tuvo la oportunidad de ser polinizada ya sea por una cosecha temprana o por la ausencia de organismos polinizadores y a su vez, las semillas no llegan a ser fecundadas (Mendoza-Galindo & Mora-Herrera, 2022). Otra razón para la baja germinación es la incapacidad de la semilla para romper la dormancia, en agave las diferencias en la capacidad de romper la dormancia pueden ser las condiciones genéticas o las condiciones en las

que la planta madre crecieron durante la maduración de semillas, pero la importancia en la que afectan la germinación estas variables es diferente entre las especies de agave (Peña-Valdivia *et al.*, 2006).

La implementación de estrategias para estimular la germinación se basó en favorecer la capacidad de la semilla de romper las condiciones de dormancia.

Los resultados de porcentaje de germinación y tasa de germinación sugieren que el proceso de humidificación de semilla previo a la germinación (hidrocebación) de las semillas permitió acelerar el proceso de imbibición y del rompimiento de la dormancia en un 9.5% en contraste con las semillas intactas ya que, la imbibición de agua temprana en la semilla activa las enzimas y facilita el metabolismo del almidón almacenado y las proteínas, además de ablandar la testa de las semillas (Rahman *et al.*, 2011).

En los tratamientos de escarificación se hallaron diferencias significativas ( $p < 0.0001$ ) en el porcentaje de germinación total en contraste con el tratamiento Sb y el control. En lo que se refiere al tipo de escarificación no se hallaron contrastes significativos estadísticamente ( $p > 0.05$ ) entre la escarificación mecánica (Em) y la escarificación química (EQ) con un porcentaje de germinación a favor del tratamiento Em con 93.50%

El presente estudio reveló que la escarificación de la semilla es un tratamiento efectivo para aumentar el porcentaje de germinación hasta en un 86.5% con la escarificación química y 93.5% con la escarificación mecánica. Basados en reportes anteriores de Urdaneta *et al.* 2013 se sabe que los tratamientos de escarificación pueden ayudar a romper la dormancia de las semillas de agave y aumentan la eficiencia de germinación hasta en un 6.75% en *A. Salmiana* en condiciones *in-vitro*. En *A. palmeri* la escarificación ayuda a romper la dormancia en semillas que habían estado en condiciones de almacenaje durante 6 meses en un 96% (Pavlisca & Fehmi, 2020).

Aunque si bien, la escarificación mecánica promovió el porcentaje de germinación, la escarificación química promovió significativamente una tasa de germinación más alta con un IVG de 12.9, en comparación con el primero con un IVG de 8.63. Este fenómeno puede ser atribuido a que, a diferencia de la escarificación mecánica, la presencia de agentes químicos que favorecen la aparición de grietas en la testa y ayudan a oxidar compuestos que inhiben la germinación ya que disminuyen los niveles endógenos de la hormona ABA e induce proteínas que estimulan el crecimiento de la planta (Barba-Espín *et al.*, 2011). Resultados similares se obtuvieron para *Pouteria campechiana* (*Sapotaceae*) dónde el tratamiento de escarificación química benefició la tasa de germinación y el desarrollo de las plantas, logrando un 90%-100% con velocidad de 2 semillas por día (Pérez-Bracena *et al.*, 2021).

Aunque el tratamiento pregerminativo no tuvo un efecto significativo entre tratamientos si se observó una tendencia a tener valores mayores de desarrollo en las semillas escarificadas, se ha observado que semillas escarificadas de *Dondronaea viscosa* tienden a tener tanto, valores de emergencia más tempranos y acumulación de masa fresca a niveles más altos que las semillas sin pretratamiento (Baskin *et al.*, 2004). La efectividad de pretratamiento de semillas en agave ha sido demostrada por Sánchez-Mendoza *et al.*, 2017 que realizaron tratamientos pre germinativos en cuatro especies de agave (*A. potatorum* Zucc.), cuishe (*A. spp.*), sierrudo y coyote (*Agave spp.*) reportaron que los tratamientos tenían un efecto positivo en la emergencia en agave sierrudo (*Agave spp.*) y tobalá (*A. potatorum* Zucc.) en un 137.7% y 111.3% respectivamente, más no en el crecimiento de la planta. Hernández *et al.*, 2019 reportaron un efecto similar en *A. potatorum* Zucc. Por otro lado, se ha demostrado que variables como la temperatura, el tipo de luz, la cantidad de humedad en el ambiente y calidad de la semilla tienen una influencia mayor en la longitud de plantas germinadas de *A. lechuguilla*, *A. striata*, *A. americana* var. *marginata*, *A. asperrima*, *A. salmiana*, *A. duranguensis*, *A. angustifolia* ssp. *tequilana* y la propia *A. cupreata* (Ramírez-Tobias *et al.*, 2011).

En este estudio las semillas de *A. cupreata* que fueron sometidas a un pretratamiento de germinación mostraron una reducción en la presencia de microorganismos en todos los tratamientos. El ablandamiento de la testa permite que el tratamiento de desinfección sea más efectivo ya que microorganismos que pudieran alojar esporas quedan expuestos a los agentes desinfectantes (Castillo-Quiroz *et al.*, 2011). En plantas de *Agapanthus. codii*, por ejemplo, la combinación de los pretratamientos de escarificación química y desinfección tienen una alta efectividad para el establecimiento de condiciones asépticas para el cultivo *in-vitro* y germinación (Plessis *et al.*, 2020). Un fenómeno similar se observó en semillas de *Calopogonium sp.*, *Stylozobium atterinum* y *Enterolobium cyclocarpum* escarificadas químicamente, donde se observó una reducción de la contaminación microbiana (hasta un 13%), y un incremento del 90% de germinación debido a la presencia de un agente disolvente y la menor existencia de agentes microbianos (Maiquetía *et al.*, 2020).

## **8.2 Establecimiento de cultivo micropropagación y multiplicación de brotes.**

El uso de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo estimuló la formación de brotes axilares directos en todos los tratamientos con una generación estadísticamente significativa con respecto al T1, donde únicamente se cultivaron explantes con medio basal.

Ya que la micropropagación parte del principio donde se busca inducir procesos morfogénicos que se dan de manera natural, como lo son la producción de ramas y raíces (Chen *et al.*, 2014), al ser *A. cupreata* una planta con una reproducción exclusivamente sexual (Avendaño-Arrazate *et al.* 2014), su capacidad para generar

brotos de forma vegetativa de forma natural es limitada, esta limitación para generar brotes sin estimulación por parte de reguladores de crecimiento si se ha observado en ensayos de proliferación *in-vitro* en *A. sisalana* (Das, 1992) y *A. fourcroydes* (Lam ) Henquem, Robert *et al.* 1992 y *A. marmorata* (Aguilar Jiménez & Rodríguez De la O, 2018)

Para la producción de mayor número de brotes altas concentraciones de BAP con Ci fueron necesarias logrando una producción de  $8.9 \pm 0.64$  con 1.5 mg/L de BAP y 1.5mg/L de Ci, estos resultados difieren a los obtenidos por Domínguez *et al.*, 2008, quién obtuvo 10.5 y 6.9 brotes en *A. cupreata* con 1.5 mg/L y con 1.0 mg/L. En los estudios de micropropagación de la familia agavácea es común la variación en lo que respecta al uso de fitorreguladores de crecimiento en la producción de brotes axilares (Maryam *et al.*, 2019).

En este estudio la combinación de BAP y Ci generaron un alto número de brotes por explante. Sin embargo, se detectó que cuando las concentraciones de Ci se incrementaban con respecto a BAP se daba formación de tejido calloso, esto también se ha observado en la multiplicación de brotes de *A. inaequidens* Koch con benciladenina y Ci obteniendo un alto número de brotes poco diferenciados y alta tasa de producción de tejido calloso (Rodríguez-de la O *et al.*, 2008), así como en *A. sisalana* (Nikam *et al.*, 1997) y en *A. cantala* (Binh *et al.*, 1990).

En los medios que contenían BAP en dosis de 0.5 a 1.5 mg/L en combinación con Ci propiciaron el estímulo de la generación de brotes, sin embargo, como se observa en la Figura 15b, concentraciones superiores limitaban la generación de brotes, estos resultados concuerdan con los de Aguilar Jiménez & Rodríguez De la O, 2018, dónde sólo concentraciones bajas de BAP, inferiores a 2.0 mg/L favorecían la generación de brotes de *A. marmorata*.

La longitud de los brotes se favoreció con altas concentraciones de Ci la interacción entre ambos reguladores de crecimiento nos indica que a bajas concentraciones de BAP la longitud de los brotes se favorece. Por ello, se puede afirmar que los resultados de los tratamientos para la variable longitud (cm) de brotes son relativos con respecto a los tratamientos para la multiplicación de brotes, a menor número de brotes por la ausencia de BA y mayor concentración de AIA, la longitud de brotes es promovida al igual que el vigor general de brotes. Esto indica que la concentración de reguladores de crecimiento puede influir en el tipo de respuestas morfológicas obtenidas (Aguilar & Rodríguez 2018)

Es importante remarcar que hasta ahora existen muy pocos reportes sobre el uso dos reguladores de crecimiento para el mismo propósito, Delgado-Aceves *et al.* 2022 reporto que la interacción de BAP + Ci aumentaba la capacidad de generación de brotes con  $(87.00 \pm 12.93)$  en *A. peacockii*, así como Aguilar & Rodríguez, evaluaron la interacción de 6-benciladenina y Ácido indolacético en *A. marmorata* en 2018.

### 8.3 Enraizamiento de los brotes micropropagados de *A. cupreata*

El 100% de los brotes expuestos a reguladores de crecimiento tuvieron la capacidad de generar raíces en mayor o menor medida dependiendo de la concentración a la que fueron expuestos en el cultivo los primeros siete días de cultivo *in-vitro*. Estos resultados difieren de aquellos obtenidos por Domínguez *et al.*, 2008, que consiguieron un porcentaje de enraizamiento para *A. cupreata* del 93%. La diferencia en la capacidad de enraizamiento radica en el método de enraizamiento empleado en este estudio, que difiere del tratamiento tradicional ya que, en lugar de solamente exponer los brotes a medio MS basal sin reguladores de crecimiento, se expusieron varias concentraciones de AIB y 2,4-D.

Existen diversos factores involucrados en el proceso de enraizamiento de los brotes, la presencia de reguladores de crecimiento puede aumentar la velocidad y la uniformidad del enraizamiento (Quambush *et al.*, 2017). Especies recalcitrantes al enraizamiento como *A. fourcroydes* en la que se ha logrado aumentar la eficiencia a un 100% de enraizamiento con el uso de reguladores de crecimiento (Garriga Caraballo *et al.*, 2010)

Otro factor que influye en la mayor capacidad de los brotes de *A. cupreata* para generar raíces es que el método probado, sometiendo a los brotes a un pulso de auxinas de 3 días facilita la formación de raíces adventicias de brotes en cultivo *in-vitro*. Este proceso puede ser dividido en tres etapas diferentes, la primera es la etapa de desdiferenciación en la que las células no son sensibles a la aplicación de auxinas, esta comprende las primeras 24 h de exposición. La segunda es la etapa de inducción, esta es la etapa más importante ya que es cuando las células comienzan el proceso de división (24 h-96 h) y la fase de diferenciación (96 h+), que es cuando la formación de primordios de raíz es inhibida por los mismos reguladores de crecimiento. Este método de enraizamiento ha sido probado con éxito en especies desérticas como *Caralluma edulis* (Edgew.) Benth. & Hook, (Patel *et al.*, 2014) o *Delphinium malabaricum* (Huth), (Agrawal *et al.*, 1991) donde se logró una efectividad de enraizamiento del 100%.

La auxina AIB, generó mayor eficiencia para el enraizamiento de brotes que la 2,4-D (tabla 3). Estos resultados concuerdan con los reportados en *A. Americana* donde la adición de 0.5 mg/L de AIB al medio aumenta el número de raíces (8.2 raíces por brote) y el desarrollo de la plántula (Luna *et al.*, 2013). En *A. americana* la frecuencia de enraizamiento más alta se obtuvo en medio adicionado con 4.92  $\mu$ M de AIB con 3.4 raíces por brote y con 1.48  $\mu$ M de AIB + 1.61 de NAA con 5.2 (Chen *et al.*, 2014). En *A. potatorum* el enraizamiento de los brotes se logró en 93.6% con 1mg/L de AIB a los 40 días, (Enríquez-del Valle *et al.*, 2016). En *A. grijalvensis*, el enraizamiento con medio MS adicionado con 30  $\mu$ M de AIB generó 8.4 raíces por brote (Santíz *et al.*, 2012).

Nuestros resultados muestran que en *A. cupreata* las dosis de AIB con mejor generación de raíces van de 0.4  $\mu$ M a 1.2  $\mu$ M y al aumentar la dosis disminuye, lo que indica que la mejor respuesta de AIB se da a bajas dosis. La permanencia libre de las moléculas de AIB en el medio es escasa ya que pueden ser modificadas bioquímicamente, promoviendo una respuesta sostenida de enraizamiento, por lo que esta puede ser la causa de la alta eficiencia de enraizamiento de bajas dosis de AIB (Uribe *et al.*, 2012).

La menor respuesta se observó en el medio suplementado con 2,4-D, estos resultados van acorde con lo reportado en los estudios de enraizamiento de Tofanelli *et al.*, en 2014 con *Vitis* logrando 87.7% con 1,834.5 mg/L de AIB mientras que con 1,670.5 mg/L de 2,4-D solo se consiguió el 63.2% de enraizamiento. De igual forma en reportes de Aloufa *et al.* (2003), los brotes que habían sido cultivados en 0.5mg/L de AIB generaron 100% de raíces que los cultivados en 2,4-D después de 30 días.

#### **8.4 Enraizamiento en sistema de inmersión temporal**

En general, el sistema de inmersión temporal demostró tener la capacidad de generar mayor número de raíces y de mayor longitud, así como crecimiento de la parte aérea de las plántulas con un incremento en el tamaño, biomasa e índice de crecimiento. Estos resultados van acordes con lo reportado por San José *et al.*, en 2020 utilizando el sistema RITA con *Alnus glutinosa*, en *Xanthosoma sagittifolium*, (Vilchez *et al.*, 2011), en *Rubus adenotrichus* (Flores *et al.*, 2012), y caña de azúcar *Saccharum sp.* híbrido (Rodríguez *et al.*, 2000).

En nuestro estudio, los valores para los parámetros evaluados se diferenciaron por el sistema de cultivo ya que el SIT tuvo mejor rendimiento que el sistema semisólido. Sin embargo, entre los tratamientos SIT-8, SIT-24 y SIT-72 no se observaron diferencias significativas en los parámetros. Un detalle importante a destacar es que a mayor intermitencia entre inmersiones hubo mayor rendimiento en el enraizamiento. La selección de los tiempos de inmersión y frecuencia difiere mucho entre especies, por ejemplo, en tiempos de inmersión poco frecuentes (1min cada 12h) se ha logrado estimular exitosamente la producción de embriones somáticos de *C. arabica* (Etienne *et al.*, 1997) mientras que, en la tuberización de papa, la inmersión de 1h cada 6h mostró ser la frecuencia más efectiva (Etienne *et al.*, 2002).

En el desarrollo del sistema radicular, los resultados señalan que hay una eficiencia para generar más raíces por brote en SIT que el medio semisólido, esto puede deberse a que existe una mayor superficie de contacto con el brote, la recirculación de medio líquido permite un flujo más uniforme de los nutrientes y al mismo tiempo aumenta el intercambio de gases al tiempo de que evita su acumulación (Latawa *et al.*, 2003). La capacidad de recirculación a tiempo y frecuencia controlada del diseño del sistema de inmersión desarrollado influye directamente en estos factores.

Ahora bien, acorde con lo señalado por Yan *et al.*(2010), la ventilación en los contenedores de cultivos juega un papel importante en el desarrollo del sistema radicular. En sus reportes, las plantas de *S. grosvenorii* cultivadas en medios sin ventilación tenían un sistema radicular poco desarrollado a comparación de aquellas plántulas que fueron cultivadas bajo ventilación con CO<sub>2</sub>.

En cuanto al desarrollo aéreo de los brotes es importante destacar que el efecto del sistema de cultivo no sólo se limitó al sistema radicular, sino que también tuvo una influencia en las características morfológicas, tamaño y peso de los brotes enraizados.

El SIT aumentó el tamaño de los brotes y la biomasa fresca (SIT-72 con  $3.10 \pm 1.26$ cm y  $0.69 \pm 0.20$ g respectivamente), lo que se tradujo en un índice de crecimiento más alto ( $3.28 \pm 1.46$ ) que el observado en medio semisólido, ( $1.247 \pm 0.61$ ). Existen reportes del uso de los biorreactores para aumentar la producción de biomasa y compuestos fitoquímicos, para esto, las condiciones ambientales en el SIT han demostrado tener una influencia importante en el crecimiento, la fisiología y el metabolismo del carbono en sus hojas. El SIT favorece la nutrición autótrofa en mayor medida que el medio semisólido y al mismo tiempo de metabolitos secundarios (Aragón *et al.*, 2014).

Esta ventaja ha sido empleada en el cultivo rápido y eficiente de plantas de interés médico, tales como *Siraitia grosveronii* y *Dioscorea fordii*, en las cuales se reportó un rango de hasta 2.2% más alto de proliferación y biomasa comparado con las plantas de cultivo en medio semisólido (De Carlo *et al.*, 2021).

### **8.5 Efecto de la iluminación y sistema de cultivo en el desarrollo radicular y aéreo de los brotes de *A. cupreata*.**

En el proceso de micropropagación y producción de material vegetal *in-vitro* la luz es uno de los factores principales utilizados para controlar los procesos de fotomorfogénesis ya que empleando diferentes tipos de luz se logra controlar la energía transmitida, densidad de flujo y longitud de onda. En la actualidad, gran parte de los procesos estándar para el cultivo de tejido emplean luz artificial blanca (Favetta *et al.*, 2017).

Avances recientes en el cultivo de tejidos *in-vitro* proponen que el uso de diodos de luz azul/roja LED generan una mejora significativa en el crecimiento (peso fresco) y desarrollo radicular en comparación con otros tratamientos de luz (He *et al.*, 2020). Aunque estudios previos sobre el efecto del tipo de luz utilizado durante el enraizamiento señalan que la luz LED que combina el espectro azul y rojo tiene un efecto positivo en el desarrollo de las plántulas, los resultados obtenidos en este estudio no mostraron diferencias significativas en el desarrollo del sistema radicular y aéreo de los brotes enraizados de *A. cupreata*.

Acorde con el trabajo de Murillo-Talavera *et al.*, en 2016 la iluminación con LEDs blancos no provoca diferencias significativas en el desarrollo *in-vitro* de plántulas de *O. tigrinum* la iluminación con luz fluorescente. En *A. tequilana* el uso de diferentes fuentes de luz en la fase de inducción no mostraron un efecto significativo en la eficiencia de la producción de callo e incluso determinaron que la composición del medio de cultivo tiene una considerable influencia en la eficiencia de crecimiento (Rodríguez-Sahagún *et al.*, 2010).

La reducción en el desarrollo de las plántulas cultivadas en sistema de cultivo semisólido bajo luz LED puede deberse a varios factores, como la posición de la fuente de luz y el contenedor de cultivo. Mientras que en el cultivo SIT las tiras de luz LED fueron colocadas en la parte de arriba a lo largo del contenedor con una tapa transparente, en el sistema semisólido la parte de arriba de las tapaderas es oscura lo que puede limitar la transmitancia de la luz.

Piqueras & Debergh, (1999), señalaron que las características del frasco de cultivo influyen en gran medida el crecimiento y desarrollo de tejidos vegetales en cultivo ya que afectan la transmitancia de luz a los brotes. En esta misma línea Nguyen & Kozai (1998), reportaron que la posición afecta la intensidad de la luz con la que los contenedores son iluminados, puede marcar una diferencia hasta cinco veces mayor en desarrollo de las plantas de durazno cuando la luz impacta de lado los brotes en lugar de por arriba.

### **8.6 Efecto de luz y sistema de cultivo en el contenido de pigmentos fotosintéticos en plantas de *A. cupreata*.**

Las variaciones en el contenido de clorofila encontradas en este estudio están directamente relacionadas con la calidad de la luz utilizada ya que la luz es esencial en la síntesis de clorofila, como regla general los pigmentos fotosintéticos aumentan cuando la intensidad de la luz se reduce (Brant *et al.*, 2009).

El sistema de cultivo marcó una diferencia significativa en el contenido de clorofila, el SIT demostró tener una mayor cantidad de clorofila en comparación con el sistema semisólido, independientemente del tipo de luz empleado.

Se ha comprobado que la luz LED blanca tiene la capacidad de aumentar los niveles de clorofila en cultivo de banana *in-vitro*, (157.03 µg/g), y la luz LED roja/blanca tuvo el mejor rendimiento generando 167.09 µg/g, a comparación de las lámparas de luz fluorescente (104.49 µg/g de clorofila), además se observó que estimulaba la formación de estomas en la parte abaxial y adaxial de la superficie de las hojas en mayor medida (Do Nascimento V. *et al.*, 2015).

En plantas de *Doritaenopsis* cultivadas *in-vitro* el contenido de clorofila total y carotenoides fue mayor bajo cultivo de luz roja/azul LED 3.1 mg/g y 0.5 mg/g respectivamente ya que bajo luz fluorescente solo fue de 2.3 mg/g y 0.4 mg/g (Shin *et al.*, 2008).

Se observó que entre menor fuera la frecuencia de inmersión mayor era la producción de clorofila. Una de las razones para esta diferencia puede ser la disponibilidad de nutrientes, Escalona *et al.* (2003), señalaron que el crecimiento en SIT no es totalmente dependiente en el proceso fotosintético, sus reportes en plantas de piña cultivadas en SIT, señalan que las plantas utilizaban más los nutrientes disponibles en el medio de cultivo que de los que obtenían de la fotosíntesis. En resumen, al haber mayor frecuencia de inmersión, existe mayor contacto con el medio de cultivo limitando la capacidad fotosintética de las plántulas lo que indica que el metabolismo de *A.cupreata* tiene capacidad fotomixotrófica.

La estimación del contenido de carotenoides provee información complementaria sobre el estatus fisiológico de las plantas. Se observó que la luz fluorescente en combinación con SIT-8 registró el mayor contenido de carotenoides, es posible que este aumento se deba a que, a la frecuencia de inmersión 1min cada 8h las plántulas no sean incapaces de continuar su desarrollo. Es común que las condiciones *in-vitro*, generen anomalías morfológicas y funcionales en las plantas haciendo que estas sean más susceptibles, (Pospíšilová *et al.*, 1999). Es probable que bajo la luz fluorescentes las plántulas del tratamiento SIT-8 se encuentren en condiciones de mayor estrés y respondan a través de la generación de carotenoides. Varios estudios han demostrado que estos compuestos son muy importantes en la protección del aparato fotosintético gracias a la interconversión entre las moléculas xantofilas. En el ciclo de las xantofilas, la violaxantina es de-epoxidada para dar lugar a la anteroxantina y finalmente la zeaxantina. Esta molécula participa intensamente en la disipación de la energía del fotosistema II, cuando es sometida a una sobrecarga energética (Netto *et al.*, 2005).

La medición del relación Chl/Car nos provee información sobre la adaptabilidad de las plantas a la luz, las plantas adaptadas a la sombra tienen en general, un relación Chl/Car menor que aquellas adaptadas a la luz solar(Zarafshar *et al.*, 2014). Esto nos da información sobre el estado de las plantas de los tratamientos SS, SIT-8 y SIT-24 que, aunque sin diferencias significativas, presentaron los valores más bajos de Chl/Car. Esto puede estar directamente relacionado con el hecho de que las plántulas de estos tratamientos mostraron un menor desarrollo en comparación con los tratamientos SIT-72, LED-SS y LED-72.

Es importante destacar que en los tratamientos en los que se favoreció en contenido de clorofila se determinó una alta concentración de nitrógeno, esto puede deberse a que el nitrógeno es considerado como un componente básico en el aparato fotosintético las proteínas del ciclo de Calvin, tilacoides y las enzimas fotosintéticas, además de ser esencial para la formación de nuevos cloroplastos (Elazazy, 2018).

En lo que respecta al contenido de nitrógeno, nuestros resultados (figura 21 y figura 23), concuerdan con lo propuesto por Bennett *et al.*, en 2017, quienes establecen que el contenido de clorofila y nitrógeno están directamente correlacionados y estos a su vez con la apariencia del color de la hoja. Ahora bien, en suculentas, las hojas

con un crecimiento acelerado tienen un menor número de células por unidad de área una gran proporción de ésta ocupada por protoplastos de mesófilo muy fotosintéticamente activos y con alto contenido de nitrógeno (Vendramini *et al.*, 2002)

Los tejidos de *A. cupreata* son fuertemente asociados con la retención hídrica ya que es su forma de adaptarse a lugares de baja disponibilidad de agua. En el sistema de inmersión temporal al extender los periodos entre inmersiones, se extiende el periodo de intercambio de gases, simulando los periodos de baja disponibilidad de agua que experimentan las plantas en su ambiente natural, lo que beneficia el crecimiento y disponibilidad de nutrientes para la expansión de tejido, de esta forma se estimula su capacidad para acumular reservas. Esta acumulación de nutrientes está relacionada directamente con el alto contenido de N encontrado en los tejidos (Ripley *et al.*, 2013).

## **7.7 Adaptación *ex-vitro* de plántulas de *Agave cupreata*.**

### **7.7.1 Supervivencia de las plántulas de *Agave cupreata***

Las plantas de *A. cupreata* que provenían del tratamiento de cultivos en medio semisólido presentaron una supervivencia del  $50 \pm 1.16\%$ , similares a los reportados por Domínguez *et al.*, en 2008 que reportaron una supervivencia del 53%.

En general, plantas que provenían del sistema de inmersión temporal alcanzaron porcentajes de aclimatación significativamente mayores Tukey ( $p < 0.05$ ). con el mayor porcentaje de supervivencia en el tratamiento SIT-72, (85.6%). Este aumento considerable en la supervivencia puede deberse principalmente a que las condiciones de cultivo en SIT permiten una transición a medio *ex-vitro* más controlada. La ventaja de estos sistemas radica en que tienen un porcentaje de humedad relativamente menor y al alto índice de intercambio de gases que se da en el contenedor por el sistema de ventilación, lo que permite que la plantas tengan un desarrollo anatómico superior, así como caracteres anatómicos más adaptables a condiciones *ex-vitro* (Mendoza-Morales *et al.*, 2022)

### **7.7.2 Evaluación de caracteres morfológicos de plantas aclimatadas de *Agave cupreata***

Durante la aclimatación existió poca diferencia en el número de hojas generados entre tratamientos del SIT. Sin embargo, el tratamiento SS experimentó una disminución del número de hojas en los primeros 30 días de aclimatación, es común que plántulas *in-vitro* presenten hojas necrosadas en la aclimatación ya que en condiciones controladas las condiciones morfológicas de las hojas tienden a presentar anomalías (Monja-mio *et al.*, 2020).

En la fase final de la aclimatación las plántulas, las plantas de sistema de inmersión temporal mantuvieron un aumento constante en clorofila durante los 60 días de aclimatación, y al final no presentaron diferencias significativas con entre

tratamientos, mientras que en el sistema semisólido el contenido de clorofila se mantuvo por debajo de los tratamientos SIT. Este fenómeno puede ser explicado por la pérdida de hojas ocurrida durante la aclimatación ya que los tejidos especializados en la fotosíntesis como los mesófilos, además de venas y epidermis, se encuentran en la parte interna de la hoja (Ayaz, E. *et al.*, 2020).

Por otra parte, estudios anteriores han reportado bajos niveles de fotosíntesis en condiciones *in-vitro* la mayoría de los tejidos presentan un aparato fotosintético de desarrollo lento que no es lo suficientemente activo como para producir un balance de carbono. Los cloroplastos tienen una baja tasa de transporte de electrones, baja cantidad de clorofila y poca actividad enzimática (Hazarika *et al.*, 2006). Incluso en la mayoría de estos reportes se propone que las plantas necesitan un suplemento extra de azúcar como fuente de carbono y fuente de energía para crecer (Grout & Donkin, 1987).

Nuestros resultados muestran la capacidad de las plántulas cultivadas en SIT para ser fotosintéticamente competentes al tener una actividad fotosintética más alta que aquellas cultivadas en medio semisólido. Y que esta capacidad se desarrolla con más efectividad cuando estas plantas son cultivadas en luz LED roja/azul. Entre especies de plantas existe una fuerte relación directa en el contenido de nitrógeno, RuBP carboxilasa y clorofila, en muchos casos la luz LED tiene la capacidad de aumentar la partición del nitrógeno en clorofila y tilacoides (Evans *et al.*, 1989). Nuestros resultados indican que las plantas *A. cupreata* cultivados en luz LED en SIT-72 presentan valores superiores de clorofila de a las plántulas de luz fluorescente.

Independientemente del cultivo y del tipo de luz, todas las plantas coincidieron en no generar diferencias significativas en el número de raíces por planta durante la aclimatación, aunque el desarrollo del sistema radicular fue mayor en el tratamiento SIT. Es común que, durante la aclimatación, las plántulas acumulen fotoasimilados antes de la emergencia de las raíces, con esto varios tipos de carbohidratos son trasladados posteriormente a los tejidos en crecimiento, por lo que influye directamente el desarrollo de la parte radicular de la planta (Van Huylenbroeck & De Riek, 1995). Es importante destacar que en mayor medida la luz LED roja/azul favoreció la generación de raíces, estos datos concuerdan con Barrales-López *et al.*, (2015) que determinó que la densidad de flujo de fotones fotosintéticos si se ve afectada por el tipo de luz utilizado, y el uso de LED roja/azul se puede utilizar para el enraizamiento exitoso de brotes adventicios de *C. chinense*.

## 8. Conclusiones

Basado en los resultados de la investigación, se encontró que el uso de un sistema de inmersión temporal modificado (SIT) para el enraizamiento de plantas de *A. cupreata* resultó en mejores tasas de supervivencia en comparación con los métodos de micropropagación tradicionales. El sistema SIT proporcionó una forma más eficiente de promover el desarrollo de raíces y mejorar el crecimiento de las plantas, lo que resultó en tasas de supervivencia más altas y una mejor adaptación a las condiciones.

1. Se estableció el cultivo *in-vitro* de *A. cupreata* a través de métodos tradicionales a través de la selección de reguladores de crecimiento y cultivo en medio semisólido. Los resultados de la investigación mostraron que la escarificación mecánica o química podía estimular la germinación de las semillas de *A. cupreata*, pero esta última fue más efectiva para la germinación *in-vitro* ya que aumentó la velocidad y longitud de emergencia y eliminó la contaminación. Para la micropropagación, la adición de 1,5 mg/L de 6-bencilaminopurina (BAP) y 1,5 mg/L de Ci tenía la capacidad de generar el mayor número de brotes durante la fase de multiplicación, pero muchos brotes tendían a desarrollarse a partir del callo y generaban necrosis con el tiempo. Una concentración de 1,5 mg/L de BAP generó brotes sin anomalías morfológicas, mientras que la combinación de 1 mg/L de BAP y 1,5 mg/L de Ci favoreció el crecimiento de brotes. Para la inducción de raíces, un pulso de 1  $\mu$ M de AIB fue 100% efectivo, generando  $2,46 \pm 1,06$  raíces por brote.
2. Se diseñó un sistema de inmersión temporal para el enraizamiento de brotes de *A. cupreata*. El SIT modificado aumenta la capacidad de flujo de aire mejorando la inducción de raíces en comparación con el medio semisólido.
3. Se determinaron los tiempos óptimos de inmersión y condiciones de luz para el enraizamiento de brotes en cultivo en SIT modificado, con la frecuencia de inmersión de 1 min cada 72 h mostrando los mejores resultados en términos de longitud de la planta, número de raíces, aumento del tamaño del brote, acumulación de biomasa fresca e índice de crecimiento. Bajo luz LED, el SIT aumentó significativamente el contenido de clorofila y nitrógeno, mientras que la relación Chl/Car aumentó ligeramente. La frecuencia de 1 min de inmersión cada 72 h bajo luz LED fue el tratamiento más adecuado para favorecer la síntesis de clorofila. Para el contenido de carotenoides, el SIT bajo luz fluorescente con frecuencias de inmersión más altas tuvo un efecto positivo, mientras que la luz LED y las frecuencias de inmersión más bajas disminuyeron la síntesis.

4. Durante la evaluación del efecto del SIT en los caracteres morfológicos de las plantas, se encontró que el uso del sistema SIT condujo a una mejora significativa en el desarrollo del sistema de raíces. Las plantas enraizadas a través del sistema SIT mostraron un mayor número de raíces y una longitud de raíz más larga en comparación con aquellas enraizadas a través de métodos de micropropagación tradicionales. Este desarrollo de raíces mejorado podría atribuirse a las condiciones optimizadas del sistema SIT, que proporcionaron un suministro de nutrientes más eficiente a las plantas.
5. Además, el uso del sistema SIT también resultó en niveles más altos de clorofila, nitrógeno y carotenoides, que son esenciales para el crecimiento y la supervivencia de las plantas. Los niveles aumentados de estos pigmentos indican que las plantas pudieron sintetizar y acumular eficientemente estos compuestos esenciales, lo que finalmente condujo a mejores tasas de crecimiento y supervivencia.
6. En general, los resultados de la investigación sugieren que el uso del sistema SIT para el enraizamiento de plantas de *A. cupreata* puede mejorar significativamente el desarrollo de raíces, promover el crecimiento y mejorar las tasas de supervivencia en comparación con los métodos de micropropagación tradicionales.

## 9. Referencias

- 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>
- Abreu, E., González, G., Ortiz, R., Rodríguez, P., Domech, R., & Garriga, M. (2006). Evaluación de vitroplantas de henequén (*A. fourcroydes Lem*) durante la fase de aclimatización. *Cultivos Tropicales*, 28(1), 5–11.
- Agrawal, D. C., Pawar, S. S., Morwal, G. C., & Mascarenhas, A. F. (1991). *In-vitro* Micropropagation of *Delphinium malabaricum (Huth) Munz.*—a Rare Species\*. *Annals of Botany*, 68(3), 243–245. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a088249>
- Aguilar-Jiménez, D., & Rodríguez-De la O, J. L. (2018). Micropropagación y aclimatación de Maguey Pitzometl (*A. marmorata Roezl*) en la Mixteca Poblana. *Revista Colombiana De Biotecnología*, 20(2), 124–131. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v20n2.77084>
- Aguirre-Dugua, X. & Eguiarte, L. (2013). Genetic diversity, conservation and sustainable use of wild *A. cupreata* and *A. potatorum* extracted for mezcal production in Mexico. *Journal of Arid Environments*, 90, 36–44. <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2012.10.018>
- Ahmadian, M., Babaei, A., Shokri, S., & Hessami, S. (2017). Micropropagation of carnation (*Dianthus caryophyllus L*) in liquid medium by temporary immersion bioreactor in comparison with solid culture. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 15(2), 309–315. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2017.07.005>
- Ahumada-Santos, Y. P., Montes-Avila, J., Uribe-Beltrán, M. D. J., Díaz-Camacho, S. P., López-Angulo, G., Vega-Aviña, R., López-Valenzuela, J. N., Heredia, J. B. & Delgado-Vargas, F. (2013). Chemical characterization, antioxidant and antibacterial activities of six *A.* species from Sinaloa, Mexico. *Industrial Crops and Products*, 49, 143–149. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.04.050>
- Akdemir, H., Süzerer, V., Onay, A., Tilkat, E., Ersali, Y., & Çiftçi, Y. O. (2014). Micropropagation of the pistachio and its rootstocks by temporary immersion system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 117(1), 65–76. doi:10.1007/s11240-013-0421-0
- Akita, M., & Takayama, S. (1994). Stimulation of potato (*Solanum tuberosum L.*) tuberization by semicontinuous liquid medium surface level control. *Plant Cell Reports*, 13–13(3–4). <https://doi.org/10.1007/bf00239889>

- Alister, B.M., Finnie, J., Watt, M., Blakeway, F. (2005). Use of the temporary immersion bioreactor system (RITA®) for production of commercial *Eucalyptus* clones in Mondi Forests (SA). In: *Hvoslef-Eide, A.K., Preil, W. (eds) Liquid Culture Systems for in-vitro Plant Propagation. Springer, Dordrecht.* [https://doi.org/10.1007/1-4020-3200-5\\_33](https://doi.org/10.1007/1-4020-3200-5_33)
- Alvard, D., Cote, F., & Teisson, C. (1993). Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 32(1), 55–60. <https://doi.org/10.1007/bf00040116>
- Amine Mazri, M., & Meziani, R. (2015). Micropropagation of Date Palm: A Review. *Cell & Developmental Biology*, 04(03). <https://doi.org/10.4172/2168-9296.1000160>
- Amoo, S. O., Finnie, J. F. & Van Staden, J. (2009). *In-vitro* propagation of *Huernia hystrix*: an endangered medicinal and ornamental succulent. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 96(3), 273-278. <https://doi.org/10.1007/s11240-008-9484-8>
- Annandarajah, C., Li, P., Michel, M., Chen, Y., Jamshidi, R., Kiziltas, A., Hoch, R., Grewell, D. & Montazami, R. (2018). Study of Agave Fiber-Reinforced Biocomposite Films. *Materials*, 12(1), 99. <https://doi.org/10.3390/ma12010099>
- Aragón, C. E., Sánchez, C., Gonzalez-Olmedo, J., Escalona, M., Carvalho, L., & Amâncio, S. (2014). Comparison of plantain plantlets propagated in temporary immersion bioreactors and gelled medium during *in-vitro* growth and acclimatization. *Biologia Plantarum*, 58(1), 29–38. <https://doi.org/10.1007/s10535-013-0381-6>
- Arcos Pérez, G. A., & Vivar Robles, A. E. (2015). Evaluación de la actividad de las saponinas extraídas de *A. americana* como agentes precipitantes y coadyuvantes para la remediación de aguas contaminadas con cromo hexavalente y arsénico (Tesis Licenciatura).
- Avendaño-Arrazate, CH, Iracheta-Donjuan, L, Gódinez-Aguilar, JC, López-Gómez, P, & Barrios-Ayala, A. (2015). Caracterización morfológica de *A. cupreata*, especie endémica de México. *Phyton (Buenos Aires)*, 84(1), 148-162. Recuperado en 02 de diciembre de 2022, de [http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1851-56572015000100022&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1851-56572015000100022&lng=es&tlng=es).
- Avendaño-Azarrate, CH. Iracheta-Donjuan, L., Gódinez-Aguilar, J., López-Gómez, P. & Barrios-Ayala, A. (2015). Morphological characterization of endemic *A. cupreata* species of Mexico. *Phyton*, 84(1), 148-162. <https://doi.org/10.32604/phyton.2015.84.148>
- Ayaz Tilkat, E., Hoşgören, H., Kaplan, A., & Tilkat, E. (2020). Influence of *in-vitro* Micropropagation Growth Conditions on Stomatal and Morphological Characteristics of Mature *Pistacia vera* L. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 799–807. <https://doi.org/10.21597/jist.658085>

- Barba-Espín, G., Diaz-Vivancos, P., Job, D., Belghazi, M., Job, C., & Hernández, J. A. (2011). Understanding the role of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> during pea seed germination: a combined proteomic and hormone profiling approach. *Plant, Cell & Environment*, 34(11), 1907–1919. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2011.02386.x>
- Barrales-López, A., Robledo-Paz, A., Trejo, C., Espitia-Rangel, E., & Rodríguez-De La O, J. L. (2015). Improved *in-vitro* rooting and acclimatization of *Capsicum chinense* Jacq. plantlets. *In-vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 51(3), 274–283. <https://doi.org/10.1007/s11627-015-9671-3>
- Baskin, J. M., Davis, B. H., Baskin, C. C., Gleason, S. M., & Cordell, S. (2004). Physical dormancy in seeds of *Dodonaea viscosa* (Sapindales, Sapindaceae) from Hawaii. *Seed Science Research*, 14(1), 81–90. <https://doi.org/10.1079/ssr2003157>
- Bautista Castellanos, A. I. (2019). *PROPAGACIÓN in-vitro, Aclimatación Y Desarrollo En Vivero De A. potatorum Zuc* [Tesis de Maestría]
- Bautista, Juan Antonio, & Ramírez Juárez, Javier. (2008). Agricultura y pluriactividad de los pequeños productores de agave en la región del mezcal, Oaxaca, México. *Agricultura técnica en México*, 34(4), 443-451. Recuperado en 02 de diciembre de 2022, [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S05682517200800040007&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S05682517200800040007&lng=es&tlng=es).
- 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>
- Bellini, E., & Giordani, E. (1997). *In-vitro* culture establishment and shoot elongation of “kaki tipo” (*diospyros kaki l.*) dormant buds. *Acta Horticulturae*, 436, 129–134. <https://doi.org/10.17660/actahortic.1997.436.13>
- Bennett, M. G., Schofield, K. A., Lee, S. S., & Norton, S. B. (2017). Response of chlorophyll a to total nitrogen and total phosphorus concentrations in lotic ecosystems: a systematic review protocol. *Environmental Evidence*, 6(1). <https://doi.org/10.1186/s13750-017-0097-8>
- Berthouly, M., & Etienne, H. (2005). Temporary immersion system: a new concept for use liquid medium in mass propagation. *Liquid Culture Systems for in-vitro Plant Propagation*, 165–195. [https://doi.org/10.1007/1-4020-3200-5\\_11](https://doi.org/10.1007/1-4020-3200-5_11)
- Bhojwani, S. S., & Dantu, P. K. (2013). Micropropagation. *Plant Tissue Culture: An Introductory Text*, 245-274. [https://doi.org/10.1007/978-81-322-1026-9\\_17](https://doi.org/10.1007/978-81-322-1026-9_17)
- Binh, L. T., Muoi, L. T., Oanh, H. T. K., Thang, T. D., & Phong, D. T. (1990). Rapid propagation of agave by *in-vitro* tissue culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 23(1), 67–70. <https://doi.org/10.1007/bf00116091>

- Borkowska, B. (2001). Morphological and physiological characteristics of micropropagated strawberry plants rooted *in-vitro* or *ex vitro*. *Scientia Horticulturae*, 89(3), 195–206. [https://doi.org/10.1016/s0304-4238\(00\)00230-2](https://doi.org/10.1016/s0304-4238(00)00230-2)
- Borland, A. M., Hartwell, J., Weston, D. J., Schlauch, K. A., Tschaplinski, T. J., Tuskan, G. A., Yang, X. & Cushman, J. C. (2014). Engineering crassulacean acid metabolism to improve water-use efficiency. *Trends in Plant Science*, 19(5), 327-338. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2014.01.006>
- Brant, R. D. S., Pinto, J. E. B. P., Rosa, L. F., Albuquerque, C. J. B., Ferri, P. H., & Correa, R. M. (2009). Growth, content and composition of lemon balm essential oil cultivated under color shading nets/Crescimento, teor e composicao do oleo essencial de melissa cultivada sob malhas fotoconversoras. *Ciencia Rural*, 39(5), 1401+. <https://link.gale.com/apps/doc/A212210568/IFME?u=anon~2c96972b&sid=google Scholar&xid=7cd614eb>
- Cardoso, J. C., Sheng Gerald, L. T., & Teixeira da Silva, J. A. (2018). Micropropagation in the Twenty-First Century. *Plant Cell Culture Protocols*, 17–46. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8594-4\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8594-4_2)
- Carvalho, L. S. O., Ozudogru, E. A., Lambardi, M., & Paiva, L. V. (2018). Temporary Immersion System for Micropropagation of Tree Species: a Bibliographic and Systematic Review. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 47(2), 269–277. <https://doi.org/10.15835/nbha47111305>
- Castillo-Quiroz, D., Antonio-Bautista, A., Ávila-Flores, D. Y., Sáenz-Reyes, J. T., & Castillo-Reyes, F. (2018). Tratamientos químicos y biológicos para estimular la germinación en semillas de *Nolina cespitifera* Trel.. *Polibotánica*, (45), 147-156. <https://doi.org/10.18387/polibotanica.45.11>
- Chen, Y., Chen, X., Hu, F., Yang, H., Yue, L., Trigiano, R. N., & Cheng, Z. M. M. (2014). Micropropagation of *A. americana*. *HortScience*, 49(3), 320–327. <https://doi.org/10.21273/hortsci.49.3.320>
- Colunga-García Marín, P., & Zizumbo-Villarreal, D. (2006). Tequila and other Agave spirits from west-central Mexico: current germplasm diversity, conservation and origin. *Plant Conservation and Biodiversity*, 79–93.
- Correa-Hernández, L., Baltazar-Bernal, O., Sánchez-Páez, R., & Bello-Bello, J. (2022). *In-vitro* multiplication of agave tobala (*A. 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>
- CRT. (s. f.). <https://www.crt.org.mx/estadisticascrtweb/>
- Cruz-Guerrero, A. E., Olvera, J. L., García-Garibay, M., & Gómez-Ruiz, L. (2006). Inulinase-hyperproducing strains of *Kluyveromyces* sp. isolated from aguamiel (Agave spp) and pulque. *World journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(2), 115-117.

- Das, T. (1992). Micropropagation of *A. sisalana*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 31(3), 253–255. <https://doi.org/10.1007/bf00036233>
- Davis, S. C., Dohleman, F. G. & Long, S. P. (2010). The global potential for Agave as a biofuel feedstock. *GCB Bioenergy*, 3(1), 68-78. <https://doi.org/10.1111/j.1757-1707.2010.01077.x>
- De Carlo, A., Tarraf, W., Lambardi, M., & Benelli, C. (2021). Temporary Immersion System for Production of Biomass and Bioactive Compounds from Medicinal Plants. *Agronomy*, 11(12), 2414. <https://doi.org/10.3390/agronomy11122414>
- Delgado-Aceves, L., Portillo, L., Folgado, R., de Jesús Romo-Paz, F., & González-Arno, M. T. (2022). New approaches for micropropagation and cryopreservation of *A. peacockii*, an endangered species. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 150(1), 85–95. <https://doi.org/10.1007/s11240-022-02246-z>
- Delgado-Lemus, A., Torres, I., Blancas, J. & Casas, A. (2014). Vulnerability and risk management of Agave species in the Tehuacán Valley, México. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/1746-4269-10-53>
- Do Nascimento Vieira, L., de Freitas Fraga, H. P., dos Anjos, K. G., Puttkammer, C. C., Scherer, R. F., da Silva, D. A., & Guerra, M. P. (2015). Light-emitting diodes (LED) increase the stomata formation and chlorophyll content in *Musa acuminata* (AAA) ‘Nanicão Corupá’ *in-vitro* plantlets. *Theoretical and Experimental Plant Physiology*, 27(2), 91–98. <https://doi.org/10.1007/s40626-015-0035-5>
- Domínguez Rosales, Manuel Salvador; González Jiménez, Ma. de la Luz; Rosales Gómez, Citlalli; Quiñones Valles, César; Delgadillo Díaz de León, Silvestre; Mireles Ordaz, Silvia Julieta; Pérez Molphe Balch, Eugenio. (2008). El cultivo *in-vitro* como herramienta para el aprovechamiento, mejoramiento y conservación de especies del género agave *Investigación y Ciencia*, vol. 16, núm. 41, mayo-agosto, , pp. 53-62 Universidad Autónoma de Aguascalientes Aguascalientes, México
- Draget, K., Ostgaard, K., & Smidsrad, O. (1989). Alginate-based solid media for plant tissue culture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 31(1). <https://doi.org/10.1007/bf00252532>
- Durán, M. C. y H. G. Núñez P. 2015. Utilización de un sistema de inmersión temporal (SIT) para multiplicar plantas ornamentales de *A. victoriae-reginae*. *Jóvenes en la Ciencia* 1(2): 66-71. <http://www.jovenesenlaciencia.ugto.mx/index.php/jovenesenlaciencia/article/view/381>
- El Oudiani, A., Msahli, S. & Sakli, F. (2017). In-depth study of agave fiber structure using Fourier transform infrared spectroscopy. *Carbohydrate Polymers*, 164, 242-248. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.01.091>

- Elazazy, Amjad. (2018). Inspect the potential of using leaf image analysis procedure in estimating nitrogen %0D status in citrus leaves. *Middle East J. Agric. Res.*, 7(3): 1059-1071, 2018
- Enrriquez-del Valle, J. R., Antonio-Luis, K. H., Rodríguez-Ortiz, G., & Campos-Ángeles, G. V. (2016). EFFECT OF CULTURE MEDIUM AND INCUBATION ON THE CHARACTERISTICS OF MICROPROPAGATED AGAVE PLANTS. *Ciencia E Investigación Agraria*, 43(2), 9–9. <https://doi.org/10.4067/s0718-16202016000200009>
- Escalona, M., Lorenzo, J. C., González, B., Daquinta, M., González, J., Desjardins, Y., & Borroto, C. G. (1999). Pineapple (*Ananas comosus L. Merr*) micropropagation in temporary immersion systems. *Plant Cell Reports*, 18(9), 743–748. <https://doi.org/10.1007/s002990050653>
- Escalona, M., Samson, G., Borroto, C., & Desjardins, Y. (2003). Physiology of effects of temporary immersion bioreactors on micropropagated pineapple plantlets. *In-vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 39(6), 651–656. <https://doi.org/10.1079/ivp2003473>
- Escamilla-Treviño, L. L. (2011). Potential of Plants from the Genus Agave as Bioenergy Crops. *BioEnergy Research*, 5(1), 1–9. doi:10.1007/s12155-011-9159-x.
- Estadísticas – COMERCAM.* (s. f.). <https://comercam-dom.org.mx/estadisticas/>
- Etienne, H., Berthouly, M. (2002). Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 69, 215–231 <https://doi.org/10.1023/A:1015668610465>
- Etienne, H., Lartaud, M., Michaux-Ferrière, N., Carron, M. P., Berthouly, M., & Teisson, C. (1997). Improvement of somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis* (Müll. Arg.) using the temporary immersion technique. *In-vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 33(2), 81–87. <https://doi.org/10.1007/s11627-997-0001-2>
- Evans, J. R. (1989). Photosynthesis and nitrogen relationships in leaves of C3 plants. *Oecologia*, 78(1), 9–19. <https://doi.org/10.1007/bf00377192>
- Faisal, M., Ahmad, N., Anis, M., Alatar, A. A., & Qahtan, A. A. (2018). Auxin-cytokinin synergism *in-vitro* for producing genetically stable plants of *Ruta graveolens* using shoot tip meristems. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 25(2), 273-277. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.09.009>
- Favetta, V., Colombo, R. C., Mangili Júnior, J. F., & Faria, R. T. D. (2017). Light sources and culture media in the *in-vitro* growth of the Brazilian orchid *Microlaelia lundii*. *Semina: Ciências Agrárias*, 38(4), 1775. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2017v38n4p1775>

- Ferreira, L. T., de Araújo Silva, M. M., Ulisses, C., Camara, T. R., & Willadino, L. (2016). Using LED lighting in somatic embryogenesis and micropropagation of an elite sugarcane variety and its effect on redox metabolism during acclimatization. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 128(1), 211-221. <https://doi.org/10.1007/s11240-016-1101-7>
- Figueredo, C., Casas, A., Colunga-GarcíaMarín, P., Jafet, M., González-Rodríguez, A. (2014). Morphological variation, management and domestication of 'maguey alto' (*A. inaequidens*) and 'maguey manso' (*A. hookeri*) in Michoacán, México. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 10 (66), 1-12.
- Flores Mora, D., Chacón Cerdas, R., Jiménez Bonilla, V., & Ortiz Sancho, F. (2012). Enraizamiento de mora (*Rubus adenotrichus*) en medio líquido en el sistema de inmersión temporal y su aclimatación en invernadero. *Revista Tecnología En Marcha*, 25(2), 3. <https://doi.org/10.18845/tm.v25i2.300>
- Florez, S. L., Curtis, M. S., Shaw, S. E., Hamaker, N. K., Larsen, J. S., & Curtis, W. R. (2016). A temporary immersion plant propagation bioreactor with decoupled gas and liquid flows for enhanced control of gas phase. *Biotechnology Progress*, 32(2), 337–345. <https://doi.org/10.1002/btpr.2221>
- Fogaça, L. A., Pedrotti, E. L., & Alves, A. C. (2016). Micropropagation of *Agapanthus umbellatus* var. *minor* by using two systems of multiplication. *Semina: Ciências Agrárias*, 37(5), 2923. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2016v37n5p2923>
- Fonseca Varela, M. & Chalita Tovar, L. E. (2021). Evaluación financiera de producción de agave y mezcal: caso de estudio Caltepec, Puebla. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 12(2), 263-273. <https://doi.org/10.29312/remexca.v12i2.2583>
- Fonseca Varela, M. & Chalita Tovar, L. E. (2021b). Evaluación financiera de producción de agave y mezcal: caso de estudio Caltepec, Puebla. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 12(2), 263-273. <https://doi.org/10.29312/remexca.v12i2.2583>
- García Vásquez, A. J. (2018). *Competitividad en la producción y comercialización de mezcal artesanal certificado en el distrito de Tlacolula, Oaxaca* (Tesis de Maestría).
- García, T. M., Heyduk, K., Kuzmick, E., & Mayer, J. A. (2014). Crassulacean acid metabolism biology. *New Phytologist*, 204(4), 738–740. <https://doi.org/10.1111/nph.13127>
- García-Mendoza, A. J. & Chávez-Rendón, C. (2013). *A. kavandivi* (Agavaceae: grupo *Striatae*), una especie nueva de Oaxaca, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 84(4), 1070-1076. <https://doi.org/10.7550/rmb.35241>
- García-Meneses, P. M. (2004). *Reproducción y germinación de A. cupreata Trel. & Berger (Agavaceae) en la localidad de Ayahualco, Guerrero*. [Tesis de licenciatura]. Universidad Autónoma de México.

- García-Moya, E., Romero-Manzanares, A., & Nobel, P. S. (2010). *Highlights for A. Productivity. GCB Bioenergy*, 3(1), 414. doi:10.1111/j.17571707.2010.01078
- García-Pérez, M. C., & López, M. G. (2015). Factors affecting fructosyltransferases and fructan exohydrolase activities in *A. tequilana* Weber var. azul. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 25(2), 147–154. <https://doi.org/10.1007/s13562-015-0320-z>
- García-Vidal, F., Flores, F. & Davison, S. (2003). Propagator theory of quantum-wire transmission. *Progress in Surface Science*, 74(1-8), 177-184. <https://doi.org/10.1016/j.progsurf.2003.08.013>
- Garriga Caraballo, M., González Oramas, G., Alemán García, S., Abreu Cruz, E., Quiroz Bravo, K., D.S. Caligari, P., & García-González, R. (2010). Management of Auxin-Cytokinin Interactions to Improve Micropropagation Protocol of Henequen (*A. fourcroydes* Lem.). *Chilean Journal of Agricultural Research*, 70(4), 545–551. <https://doi.org/10.4067/s0718-58392010000400003>
- Gaspar, T., Kevers, C., Hausman, J., Berthon, J., & Ripetti, V. (1992). Practical uses of peroxidase activity as a predictive marker of rooting performance of micropropagated shoots. *Agronomie*, 12(10), 757–765. <https://doi.org/10.1051/agro:19921003>

## GENTRY

- Gentry, H. S. 1982. *Agaves of continental North America*. University of Arizona Press. Tucson, Arizona. 670 pp.
- George, E. F., Hall, M. A. & Klerk, G. J. D. (2008). Micropropagation: Uses and Methods. *Plant Propagation by Tissue Culture*, 29-64. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5005-3\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5005-3_2)
- Georgiev, V., Schumann, A., Pavlov, A., & Bley, T. (2014). Temporary immersion systems in plant biotechnology. *Engineering in Life Sciences*, 14(6), 607–621. <https://doi.org/10.1002/elsc.201300166>
- Good-Avila, S. V., Souza, V., Gaut, B. S. & Eguiarte, L. E. (2006). Timing and rate of speciation in *Agave* (*Agavaceae*). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(24), 9124-9129. <https://doi.org/10.1073/pnas.0603312103>
- Grout, B. W., & Donkin, M. E. (1987). Photosynthetic Activity Of Cauliflower Meristem Cultures *In-vitro* And At Transplanting Into Soil. *Acta Horticulturae*, 212, 323–328. <https://doi.org/10.17660/actahortic.1987.212.49>
- Guillén-Jiménez, F. D. M., Cristiani-Urbina, E., Cancino-Díaz, J. C., Flores-Moreno, J. L. & Barragán-Huerta, B. E. (2012). Lindane biodegradation by the *Fusarium verticillioides* AT-100 strain, isolated from *A. tequilana* leaves: Kinetic study and identification of metabolites. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 74, 36-47. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.04.020>

- Guzmán, A. B. M. (2016). Utilización de un sistema de inmersión temporal (SIT) para multiplicar plantas ornamentales de *A. Victoriae-Reginae* (T. Moore).
- Guzmán-Pedraza, R. & Contreras-Esquivel, J. C. (2018). Aguamiel y su fermentación: Ciencia más allá de la tradición. *Mexican Journal of Biotechnology*, 3(1), 1-22. <https://doi.org/10.29267/mxjb.2018.3.1.1>
- Hassan, S., & Zayed, N. S. (2018). Factor Controlling Micropropagation of Fruit Trees: A Review. *Science International*, 6(1), 1–10. <https://doi.org/10.17311/sciintl.2018.1.10>
- Hazarika, B. J. A. T. da Silva, Akshay Talukdar, & J. A. Teixeira da Silva. (2005). Effective acclimatization of *in-vitro* cultured plants: methods, physiology and genetics. *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology*, 427–438.
- He, C., Zeng, Y., Fu, Y., Wu, J., & Liang, Q. (2020). Light quality affects the proliferation of *in-vitro* cultured plantlets of *Camellia oleifera* Huajin. *PeerJ*, 8, e10016. <https://doi.org/10.7717/peerj.10016>
- Hempfling, T., & Preil, W. (2005). Application of a temporary immersion system in mass propagation of Phalaenopsis. *Liquid Culture Systems for in-vitro Plant Propagation*, 231–242. [https://doi.org/10.1007/1-4020-3200-5\\_15](https://doi.org/10.1007/1-4020-3200-5_15)
- Hernández-Carbajal, G., Rutiaga-Quiñones, O. M., Pérez-Silva, A., Saucedo-Castañeda, G., Medeiros, A., Soccol, C. R., & Soto-Cruz, N. S. (2013). Screening of native yeast from *A. duranguensis* fermentation for isoamyl acetate production. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 56(3), 357–363. <https://doi.org/10.1590/s1516-89132013000300002>
- Herrera-Isidró, J. A., Núñez-Palenius, H., Herrera-Isidró, L., Isidró-Pérez, M., & Trejo-Rodríguez, R. (2016). *In-vitro* culture of Agave spp. in biorreactors under LED light. *Sustainable and Integrated use of Agave*, 43.
- Herrera-Isidró, L., Isidró-Pérez, M., Herrera-Isidró, J. A., Castro-López, S., Nieto-González, A., & Núñez-Palenius, H. (2016)-*In-vitro* conservation of three species of agaves by using temporary immersion system. *Sustainable and Integrated use of Agave*, 39.
- Hill, K., & Schaller, G. E. (2013). Enhancing plant regeneration in tissue culture. *Plant Signaling & Behavior*, 8(10), e25709. <https://doi.org/10.4161/psb.25709>
- Honda, H., Liu, C., & Kobayashi, T. (2001). Large-Scale Plant Micropropagation. *Plant Cells*, 157–182. [https://doi.org/10.1007/3-540-45302-4\\_6](https://doi.org/10.1007/3-540-45302-4_6)
- Hung, C. D., Hong, C. H., Kim, S. K., Lee, K. H., Park, J. Y., Nam, M. W., Choi, D. H., & Lee, H. I. (2016). LED light for *in-vitro* and ex vitro efficient growth of economically important highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.). *Acta Physiologiae Plantarum*, 38(6). <https://doi.org/10.1007/s11738-016-2164-0>

- Hvoslef-Eide, Trine & Preil, W.. (2005). Liquid Culture Systems for *in-vitro* Plant Propagation. 10.1007/1-4020-3200-5.
- Ingram, J., Dawson, B., Goodman, C., Wallman, K., & Beilby, J. (2009). Effect of water immersion methods on post-exercise recovery from simulated team sport exercise. *Journal of Science and Medicine in Sport*, 12(3), 417–421. <https://doi.org/10.1016/j.jsams.2007.12.011>
- Islam, M. T., Dembele, D. P., & Keller, E. J. (2005). Influence of explant, temperature and different culture vessels on *in-vitro* culture for germplasm maintenance of four mint accessions. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 81(2), 123–130. <https://doi.org/10.1007/s11240-004-3307-3>
- Jiménez, E., Pérez, N., de Feria, M. *et al.* Improved production of potato microtubers using a temporary immersion system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 59, 19–23 (1999). <https://doi.org/10.1023/A:1006312029055>
- Jiménez-Barron, O., García-Sandoval, R., Magallón, S., García-Mendoza, A., Nieto-Sotelo, J., Aguirre-Planter, E. & Eguiarte, L. E. (2020). Phylogeny, Diversification Rate, and Divergence Time of *A. sensu lato* (*Asparagaceae*), a Group of Recent Origin in the Process of Diversification. *Frontiers in Plant Science*, 11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.536135>
- Klerk, G. J. (2002). Rooting of microcuttings: Theory and practice. *In-vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 38(5), 415–422. <https://doi.org/10.1079/ivp2002335>
- Kodym, A., & Zapata-Arias, F. J. (2001). Low-cost alternatives for the micropropagation of banana. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 66(1), 67–71. <https://doi.org/10.1023/a:1010661521438>
- Koroch, A. R., Juliani Jr., H. R., Juliani, H. R., & Trippi, V. S. (1997). Micropropagation and acclimatization of *Hedeoma multiflorum*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 48(3), 213–217. <https://doi.org/10.1023/a:1005804121136>
- Kozai, T. (1991). Acclimatization of Micropropagated Plants. *High-Tech and Micropropagation I*, 127–141. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-76415-8\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-642-76415-8_8)
- Kozai, T., Afreen, F., & Zobayed, S. M. A. (2010). *Photoautotrophic (Sugar-Free Medium) Micropropagation as a New Micropropagation and Transplant Production System* (Softcover reprint of hardcover 1st ed. 2005). Springer.
- Krikorian, A. D. (1995). Hormones in Tissue Culture and Micropropagation. *Plant Hormones*, 774-796. [https://doi.org/10.1007/978-94-011-0473-9\\_35](https://doi.org/10.1007/978-94-011-0473-9_35)
- Kulus, Dariusz. (2014). Micropropagation of selected *Agave* species. In book: PhD *Interdisciplinary Journal. Chapter: 8*. Editors: Czubenko M.

- Lambardi, M., Ozudogru, E. A., & Jain, S. M. (Eds.). (2013). Protocols for Micropropagation of Selected Economically-Important Horticultural Plants. *Methods in Molecular Biology*. <https://doi.org/10.1007/978-1-62703-074-8>
- Latawa, J., Shukla, M. R., & Saxena, P. K. (2016). An efficient temporary immersion system for micropropagation of hybrid hazelnut. *Botany*, *94*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1139/cjb-2015-0111>
- Leva, A. (2011). Innovative protocol for “ex vitro rooting” on olive micropropagation. *Open Life Sciences*, *6*(3), 352–358. <https://doi.org/10.2478/s11535-011-0010-3>
- Loberant, B., & Altman, A. (2010). Micropropagation of plants. *Encyclopedia of industrial biotechnology: bioprocess, bioseparation, and cell technology*. Wiley, New York, 3499-3515.
- Lu, M. L. & Wyman, C. E. (2021). Elucidation of native California *A. americana* and *A. deserti* biofuel potential: Compositional analysis. *PLOS ONE*, *16*(5), e0252201. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0252201>
- Luciana, C. N. L., Wander, S. V., Selma, S. R., Pedro, G. M. D. A., Jéssica, G. C., Júlio, C. G. P., & Nívio. (2019). Use of temporary immersion bioreactors on *in-vitro* culture of cactus pear. *African Journal of Agricultural Research*, *14*(32), 1487–1492. <https://doi.org/10.5897/ajar2019.14138>
- Luna, M. Elisama, M. Enríquez-del Valle, Raymundo, J. Velasco Velasco, Vicente A. Villegas A. Y. Carrillo, J. C., & Rodríguez O, G. (2013). Composición del medio de cultivo y la incubación para enraizar brotes de Agave. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, *4*(spe6), 1151-1159. Recuperado en 04 de diciembre de 2022, de [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2007-09342013001000007&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-09342013001000007&lng=es&tlng=es).
- Maene, L., & Debergh, P. (1985). Liquid medium additions to established tissue cultures to improve elongation and rooting in vivo. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *5*(1), 23–33. <https://doi.org/10.1007/bf00033566>
- Aloufa, M. A. I Bezerra, S. M., & Jordão, G. P. (2003). *In-vitro* clonal mass propagation of *Ximenia americana* L. *Fruits*, *58*(3), 175–178. <https://doi.org/10.1051/fruits:2003006>
- Mahaveer Suman, Pency D. Sangma, Deva Ram Meghawal, & Om Prakash Sahu. (2017). Effect of plant growth regulators on fruit crops. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, *6*(2), 331–337.
- Maiquetía, M., Vargas, E. T., Toro García, M., & García de García, E. C. (2020). Estudios en la germinación y propagación *in-vitro* de tres especies de Leguminosae: *Calopogonium* sp., *Stylosantes capitata* Y *Cassia moschata*. *REVISTA CIENTÍFICA ECOCIENCIA*, *7*(6), 1–25. <https://doi.org/10.21855/ecociencia.76.393>

- Mamun, N. H. A., Egertsdotter, U., & Aidun, C. K. (2015). Bioreactor technology for clonal propagation of plants and metabolite production. *Frontiers in Biology*, *10*(2), 177–193. <https://doi.org/10.1007/s11515-015-1355-1>
- Manuel S. Domínguez Rosales, Ma. de la Luz González Jiménez, Citlalli Rosales Gómez, César Quiñones Valles, Silvestre Delgado Díaz de León, Silvia Julieta Mireles Ordaz, & Eugenio Pérez Molphe Balch. (2007). El cultivo *in-vitro* como herramienta para el aprovechamiento, mejoramiento y conservación de especies del género *Agave*. *Investigación Y Ciencia: De La Universidad Autónoma De Aguascalientes*, *16*(41), 53–62.
- Marchant, M. J., Molina, P., Montecinos, M., Guzmán, L., Balada, C., Fassio, C., & Castro, M. (2021). *In-vitro* Propagation of Easter Island *Curcuma longa* from Rhizome Explants Using Temporary Immersion System. *Agronomy*, *11*(11), 2121. <https://doi.org/10.3390/agronomy11112121>
- Martínez Salvador, M., Arias, H. R. & Rubio, A. O. (2005). Population Structure of Maguey (*A. salmianasp.crassispina*) in Southeast Zacatecas, Mexico. *Arid Land Research and Management*, *19*(2), 101-109. <https://doi.org/10.1080/15324980590916495>
- Martinez-Gutierrez, F., Ratering, S., Juárez-Flores, B., Godinez-Hernandez, C., Geissler-Plaum, R., Prell, F., Zorn, H., Czermak, P. & Schnell, S. (2017). Potential use of *A. salmiana* as a prebiotic that stimulates the growth of probiotic bacteria. *LWT*, *84*, 151-159. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.05.044>
- Maryam Nazir, Shahab Sadat, & Mehdi Soltani Howyzeh. (2018). The effect of different hormone combinations on direct and indirect somatic embryogenesis in *A. americana*. *Plant Physiology*, *9*(2), 2739–2747. <https://doi.org/10.22034/ijpp.2019.664579>
- McClelland, M. T., Smith, M. A. L., & Carothers, Z. B. (1990). The effects of *in-vitro* and ex vitro root initiation on subsequent microcutting root quality in three woody plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *23*(2), 115–123. <https://doi.org/10.1007/bf00035831>
- Méndez-Rodríguez, L. C., Vargas-Ponce, O., Zizumbo-Villarreal, D., & Colunga-GarcíaMarín, P. (2018). Management of *A. cupreata* Trel. & Berger, an underutilized resource of the dry tropics of Guerrero, Mexico. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, *14*(1), 1-13. <https://doi.org/10.1186/s13002-018-0277-6>
- Mendoza-Galindo, E. J., & Mora-Herrera, M. E. (2022). Germinación de semillas de agave angustifolia en diferente madurez fisiológica de la inflorescencia. *Ciencia Tecnología E Información Para El Desarrollo De México*. <https://pcti.mx/articulos/pcti-197-germinacion-de-semillas-de-agave-angustifolia-en-diferente-madurez-fisiologica-de-la-inflorescencia/>
- Mendoza-Morales, C., Dolcet-Sanjuan, R., Orellana Caballero, M., Lopez Sanchez, I., Vargas, B., & Rivera, I. (2022). Micropropagación de *A. marmorata* utilizando un

Nuevo Sistema de Inmersión Temporal. *Revista Ciencia, Tecnología Y Sociedad*, 2, 1.

- Mielenz, J. R., Rodriguez, M., Thompson, O. A., Yang, X. & Yin, H. (2015). Development of Agave as a dedicated biomass source: production of biofuels from whole plants. *Biotechnology for Biofuels*, 8(1). <https://doi.org/10.1186/s13068-015-0261-8>
- Mio, K. M., Olvera-Casanova, D., Herrera-Herrera, G., Herrera-Alamillo, M. N., Sánchez-Teyer, F. L., & Robert, M. L. (2020). Improving of rooting and ex vitro acclimatization phase of *A. tequilana* by temporary immersion system (BioMINT™). *In-vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 56(5), 662–669. <https://doi.org/10.1007/s11627-020-10109-5>
- Mohnen, D. (1994). Novel Experimental Systems for Determining Cellular Competence and Determination. *Biology of Adventitious Root Formation*, 87–98. [https://doi.org/10.1007/978-1-4757-9492-2\\_7](https://doi.org/10.1007/978-1-4757-9492-2_7)
- Monja-Mio, K.M., Herrera-Alamillo, M.A., Sánchez-Teyer, L.F., Robert, M.L. (2019). Breeding Strategies to Improve Production of Agave (*Agave* spp.). In: Al-Khayri, J., Jain, S., Johnson, D. (eds) *Advances in Plant Breeding Strategies: Industrial and Food Crops*. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-23265-8\\_10](https://doi.org/10.1007/978-3-030-23265-8_10)
- Moura-Costa, P. H., & Lundoh, L. (1994). The Effects Of Auxins (Eba, Naa And 2,4-D) On Rooting Of *Dryobalanops Lanceolata* (*Kapur Dipterocarpaceae*) Cuttings. *Journal of Tropical Forest Science*, 7(2), 338–340. <http://www.jstor.org/stable/43581821>
- Mousumi, D., Mukeshwar, P., Rohit, S., Gulab, S. T., & Pushpa, L. (2010). Biotechnological intervention of *A. sisalana*: a unique fiber yielding plant with medicinal property. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(3), 177-187.
- Muneer, S., Soundararajan, P., & Jeong, B. R. (2016). Proteomic and Antioxidant Analysis Elucidates the Underlying Mechanism of Tolerance to Hyperhydricity Stress in *In-vitro* Shoot Cultures of *Dianthus caryophyllus*. *Journal of Plant Growth Regulation*, 35(3), 667-679. <https://doi.org/10.1007/s00344-015-9569-7>
- Murillo-Talavera, Martha M., Pedraza-Santos, Martha E., Gutiérrez-Rangel, Nicolás, Rodríguez-Mendoza, María de las N., Lobit, Philippe, & Martínez-Palacios, Alejandro. (2016). Calidad de la luz led y desarrollo *in-vitro* de *Oncidium tigrinum* y *Laelia autumnalis* (*orchidaceae*). *Agrociencia*, 50(8), 1065-1080. Recuperado en 04 de diciembre de 2022, de [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S140531952016000801065&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S140531952016000801065&lng=es&tlng=es).
- Nava, J., Jimenez-Aparicio, A., de Jesús-Sanchez, A., Arenas-Ocampo, M. L., Ventura-Zapata, E., & Evangelista-Lozano, S. (2011). Estudio de la morfología y aclimatación de plantas de *Laelia eyermaniana* RCHB. f. generadas *in-vitro*. *Polibotánica*, 32, 107-117. Retrieved from <http://www.redalyc.org/pdf/621/62119933006.pdf>

- Nava-Cruz, N. Y., Medina-Morales, M. A., Martinez, J. L., Rodriguez, R. & Aguilar, C. N. (2014). Agave biotechnology: an overview. *Critical Reviews in Biotechnology*, 35(4), 546-559. <https://doi.org/10.3109/07388551.2014.923813>
- Netto, A. T., Campostrini, E., Oliveira, J. G. D., & Bressan-Smith, R. E. (2005). Photosynthetic pigments, nitrogen, chlorophyll a fluorescence and SPAD-502 readings in coffee leaves. *Scientia Horticulturae*, 104(2), 199–209. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2004.08.013>
- Newell, C., Grown, D., & McComb, J. (2006). Aeration is more important than shoot orientation when rooting lentil (*Lens culinaris* Medik.) cv. 'Digger' microcuttings *in-vitro*. *In-vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 42(2), 197–200. <https://doi.org/10.1079/ivp2006747>
- Nguyen, Q. T., & Kozai, T. (1998). Environmental Effects on the Growth of Plantlets in Micropropagation. *Environment Control in Biology*, 36(2), 59–75. <https://doi.org/10.2525/ecb1963.36.59>
- Nikam, T. D., Mulye, K. V., Chambhare, M. R., Nikule, H. A., & Ahire, M. L. (2019). Reduction in hyperhydricity and improvement in *in-vitro* propagation of commercial hard fibre and medicinal glycoside yielding *A. sisalana* Perr. ex Engelm by NaCl and polyethylene glycol. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 138(1), 67–78. <https://doi.org/10.1007/s11240-019-01603-9>
- Nobel, P. S. & Hartsock, T. L. (1978). Resistance Analysis of Nocturnal Carbon Dioxide Uptake by a Crassulacean Acid Metabolism Succulent, *A. deserti*. *Plant Physiology*, 61(4), 510-514. <https://doi.org/10.1104/pp.61.4.510>
- Nobel, P. S. & Hartsock, T. L. (1979). Environmental Influences on Open Stomates of a Crassulacean Acid Metabolism Plant, *A. deserti*. *Plant Physiology*, 63(1), 63-66. <https://doi.org/10.1104/pp.63.1.63>
- Nolasco Jáuregui, F. E. (2020). Propagación *in-vitro* de *A. angustifolia*, *A. karwinskii* y *A. parrasana* en sistemas de inmersión temporal (BITs).
- NORMA Oficial Mexicana NOM-070-SCFI-1994, Bebidas alcohólicas-Mezcal-Especificaciones. DOF: 12/06/1997
- Paek, K. Y., Chakrabarty, D., & Hahn, E. J. (2005). Application of bioreactor systems for large scale production of horticultural and medicinal plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 81(3), 287–300. <https://doi.org/10.1007/s11240-004-6648-z>
- Paek, K. Y., Hahn, E. J., & Son, S. H. (2001). Application of bioreactors for large-scale micropropagation systems of plants. *In-vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 37(2), 149–157. <https://doi.org/10.1007/s11627-001-0027-9>
- Parker, K. C., Trapnell, D. W., Hamrick, J. L., Hodgson, W. C. & Parker, A. J. (2010). Inferring ancient *Agave* cultivation practices from contemporary genetic patterns. *Molecular Ecology*, 19(8), 1622-1637. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294x.2010.04593.x>

- Patel, A. K., Phulwaria, M., Rai, M. K., Gupta, A. K., Shekhawat, S., & Shekhawat, N. (2014). *In-vitro* propagation and ex vitro rooting of *Caralluma edulis* (Edgew.) Benth. & Hook. f.: An endemic and endangered edible plant species of the Thar Desert. *Scientia Horticulturae*, 165, 175–180. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.10.039>
- Pavlisca, L. L., & Fehmi, J. S. (2020). *A. palmeri* restoration: salvage and transplantation of population structure. *Arid Land Research and Management*, 35(2), 177–188. <https://doi.org/10.1080/15324982.2020.1821829>
- Peña-Valdivia, C. B., García-Nava, J. R., Aguirre R, J. R., Ybarra-Moncada, M. C., & López H, M. (2011). Variation in Physical and Chemical Characteristics of Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Grain along a Domestication Gradient. *Chemistry & Biodiversity*, 8(12), 2211–2225. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201100102>
- Perales Aguilar, L., Santos Díaz, M. D. S., Gómez Aguirre, Y. A., Ramos Gómez, M. S., & Perez Molphe Balch, E. (2020). Análisis *in-vitro* de la acumulación de metales pesados en plantas de la familia Asparagaceae tolerantes a la baja disponibilidad de agua. *Nova Scientia*, 12(24). <https://doi.org/10.21640/ns.v12i24.2081>
- Pérez-Barcena, J. F., Cruz-Castillo, J. G., De Jesús-Sánchez, A., Jiménez-Aparicio, A. R., & Evangelista-Lozano, S. (2021). Condiciones de germinación y desarrollo de plantas de *Pouteria campechiana* (Sapotaceae). *Botanical Sciences*, 99(2), 377–387. <https://doi.org/10.17129/botsci.2796>
- Pérez-Tornero, O., & Burgos, L. (2000). Different media requirements for micropropagation of apricot cultivars. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 63(2), 133–141. <https://doi.org/10.1023/a:1006430718024>
- Pérez-Zavala, M. D. L., Hernández-Arzaba, J. C., Bideshi, D. K. & Barboza-Corona, J. E. (2020). Agave: a natural renewable resource with multiple applications. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(15), 5324-5333. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10586>
- Pérez-Zavala, M. D. L., Hernández-Arzaba, J. C., Bideshi, D. K. & Barboza-Corona, J. E. (2020). Agave: a natural renewable resource with multiple applications. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(15), 5324-5333. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10586>
- Piatczak, E., Wielanek, M., & Wysokinska, H. (2005). Liquid culture system for shoot multiplication and secoiridoid production in micropropagated plants of *Centaureum erythraea* Rafn. *Plant Science*, 168(2), 431–437. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2004.08.013>
- Piqueras, A., & Debergh, P. C. (1999). Morphogenesis in Micropropagation. *Morphogenesis in Plant Tissue Cultures*, 443–462. [https://doi.org/10.1007/978-94-015-9253-6\\_15](https://doi.org/10.1007/978-94-015-9253-6_15)

- Piven, N. M., Barredo-Pool, F. A., Borges-Argáez, I. C., Herrera-Alamillo, M. A., Mayo-Mosqueda, A., Herrera-Herrera, J. L. & Robert, M. L. (2001). Reproductive biology of henequén (*A. fourcroydes*) and its wild ancestor *A. Angustifolia* (Agavaceae). i. Gametophyte development. *American Journal of Botany*, 88(11), 1966-1976. <https://doi.org/10.2307/3558424>.
- Plascencia de la Torre, M. F. & Peralta Gordon, L. M. (2018). Análisis histórico de los mezcales y su situación actual desde una perspectiva ecomarxista/ Historical analysis of mezcales and their current situation from an eco-marxist approach. *Eutopía, Revista de Desarrollo Económico Territorial*, 14. <https://doi.org/10.17141/eutopia.14.2018.3579>
- Plessis, H. J. D., Nikolova, R. V., Kleynhans, R., & Egan, B. A. (2020). *In-vitro* seed germination and seedling performance of *Hibiscus coddii* subsp. *barnardii*. *Ornamental Horticulture*, 26(4), 598–606. <https://doi.org/10.1590/2447-536x.v26i4.2191>
- Pospíšilová, J., Tichá, I., Kadleček, P., Haisel, D., & Plzánková, Š. (1999). *Biologia Plantarum*, 42(4), 481–497. doi:10.1023/a:1002688208758
- Powers, D. E., & Backhaus, R. A. (1989). *In-vitro* propagation of *A. arizonica* Gentry & Weber. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 16(1), 57–60. <https://doi.org/10.1007/bf00044072>
- Preece, J. E., & Sutter, E. G. (1991). Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. *Micropropagation*, 71–93. [https://doi.org/10.1007/978-94-009-2075-0\\_5](https://doi.org/10.1007/978-94-009-2075-0_5)
- Puente-Garza, C. A., García-Lara, S. & Gutiérrez-Urbe, J. A. (2017). Enhancement of saponins and flavonols by micropropagation of *A. salmiana*. *Industrial Crops and Products*, 105, 225-230. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.05.014>
- Quambusch, M., Groß, S., Pscherer, T., Winkelmann, T., & Bartsch, M. (2017). Improved *in-vitro* rooting of *Prunus avium* microshoots using a dark treatment and an auxin pulse. *Scientia Horticulturae*, 220, 52–56. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.03.020>
- Rahman, M. M., Ahammad, K. U., & Alam, M. M. (2011). Effect of Soaking Condition and Temperature on Imbibition Rate of Maize and Chickpea Seeds. *Research Journal of Seed Science*, 4(2), 117–124. <https://doi.org/10.3923/rjss.2011.117.124>
- Ramírez-Mosqueda, M. A. & Iglesias-Andreu, L. G. (2016). Evaluation of different temporary immersion systems (BIT®, BIG, and RITA®) in the micropropagation of *Vanilla planifolia* Jacks. *In-vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 52(2), 154-160. <https://doi.org/10.1007/s11627-015-9735-4>
- Ramírez-Mosqueda, M. A., Cruz-Cruz, C. A., Cano-Ricárdez, A., & Bello-Bello, J. J. (2019). Assessment of different temporary immersion systems in the micropropagation of

anthurium (*Anthurium andreanum*). *3 Biotech*, 9(8). <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1833-2>

Ramírez-Tobías, H. M., Peña-Valdivia, C. B., Aguirre R., J. R., Reyes-Agüero, J. A., Sánchez-Urdaneta, A. B., & Valle G., S. (2011). Seed germination temperatures of eight Mexican Agave species with economic importance. *Plant Species Biology*, 27(2), 124–137. <https://doi.org/10.1111/j.1442-1984.2011.00341.x>

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>

Rangel, B. C. S. (2019, 30 diciembre). *Nanomateriales celulósicos para la adsorción de contaminantes emergentes* Tecnura. <https://revistas.udistrital.edu.co/index.php/Tecnura/article/view/15451>

Rathore, J. S., Rai, M. K., Phulwaria, M., & Shekhawat, N. S. (2013). A Liquid Culture System for Improved Micropropagation of Mature *Acacia nilotica* (L.) Del. ssp. *indica* and Ex Vitro Rooting. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 84(1), 193–200. <https://doi.org/10.1007/s40011-013-0204-8>

Reyes-Chilpa, R., & Cámara-Leret, R. (2018). El vulnerable maguey papalote *A. cupreata* Trel. & Berger en Guerrero, México: etnobotánica, estructura poblacional y estado de conservación. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 14(1), 1-17. <https://doi.org/10.1186/s13002-018-0229-5>

Ríos-Ramírez, S. D. C., Enríquez-del Valle, J. R., Rodríguez Ortiz, G., & Ruíz-Luna, J. (2017). Benzylaminopurine and indol-3-acetic acid concentrations in *in-vitro* proliferation of *A. angustifolia* adventitious shoots. *Ciencia E Investigación Agraria*, 44(3), 284–293. <https://doi.org/10.7764/rcia.v44i3.1810>

Ripley, B. S., Abraham, T., Klak, C., & Cramer, M. D. (2013). How succulent leaves of Aizoaceae avoid mesophyll conductance limitations of photosynthesis and survive drought. *Journal of Experimental Botany*, 64(18), 5485–5496. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert314>

Robert, M. L., Herrera, J. L., Chan, J. L., & Contreras, F. (1992). Micropropagation of Agave spp. *High-Tech and Micropropagation III*, 306–329. [https://doi.org/10.1007/978-3-662-07770-2\\_19](https://doi.org/10.1007/978-3-662-07770-2_19)

Robert, M. L., Herrera, J. L., Contreras, F., & Scorer, K. N. (1987). *In-vitro* propagation of *A. fourcroydes* Lem. (Henequen). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 8(1), 37–48. <https://doi.org/10.1007/bf00040731>

- Robert, M. L., Herrera-Herrera, J. L., Castillo, E., Ojeda, G., & Herrera-Alamillo, M. A. (2006). An Efficient Method for the Micropropagation of Agave spp. Species. *Plant Cell Culture Protocols*, 165–178. <https://doi.org/10.1385/1-59259-959-1:165>
- Rocha, P. S. G., Oliveira, R. P. D., & Scivittaro, W. B. (2015). New light sources for in-vitro potato micropropagation. *Bioscience Journal*, 31(5), 1312–1318. <https://doi.org/10.14393/bj-v31n5a2015-26601>
- Rodríguez, Y., Escalona, M., González-Olmedo, J. L., Cid, M., & Rodríguez, R. (2000). Aclimatación de plántulas de caña de azúcar (*Saccharum sp. híbrido*) provenientes de sistemas de inmersión temporal. *Cultivos Tropicales*, 21(3), 51-56.
- Rodríguez-de la O, J. L., Aureoles-Rodríguez, F., Legaria-Solano, J. P., Sahagún-Castellanos, J., & Peña Ortega, M. G. (2008). Propagación *In-vitro* Del 'Maguey Bruto' (*A. Inaequidens* Koch), Una Especie Amenazada De Interés Económico. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, XIV(3). <https://doi.org/10.5154/r.rchsh.2007.11.050>
- Rodríguez-Garay, B. & Rodríguez-Domínguez, J. M. (2018b). Micropropagation of Agave Species. *Plant Cell Culture Protocols*, 151-159. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8594-4\\_8](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8594-4_8)
- Rodríguez-Saghún, A., Acevedo Hernandez, G. J., Rodríguez, J. M., Rodríguez-Garay, B., Cervantes Martínez, J., & Castellanos-Hernández, O. A. (2011). Effect of light quality and culture medium on somatic embryogenesis of *A. tequilana* Weber var. Azul. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 104(2), 271–275.
- Ruta, C., De Mastro, G., Ancona, S., Tagarelli, A., De Cillis, F., Benelli, C., & Lambardi, M. (2020). Large-Scale Plant Production of *Lycium barbarum* L. by Liquid Culture in Temporary Immersion System and Possible Application to the Synthesis of Bioactive Substance. *Plants*, 9(7), 844. MDPI AG. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.3390/plants9070844>
- Salinas, E. & Alcaraz, J. V. (2021). Análisis de la competitividad exportadora de los productores de mezcal de Oaxaca y Michoacán al mercado de los Estados Unidos. *Espacios*, 42(23), 16-37. <https://doi.org/10.48082/espacios-a21v42n21p02>
- San José, M. C., Cernadas, M. J., & Janeiro, L. V. (2021). Optimization of Micropropagation Protocols in Some Woody Plants Using Meta-topolin. *Meta-topolin: A Growth Regulator for Plant Biotechnology and Agriculture*, 221-240. [https://doi.org/10.1007/978-981-15-9046-7\\_16](https://doi.org/10.1007/978-981-15-9046-7_16)
- Sánchez Mendoza, S., Bautista-Cruz, A., & Martínez-Gallegos, V. (2018). Fosfobacterias promueven la emergencia y el crecimiento de agaves silvestres. *Entreciencias: Diálogos En La Sociedad Del Conocimiento*, 6(17). <https://doi.org/10.22201/enesl.20078064e.2018.17.63408>

- Sánchez Mendoza, Saúl, & Bautista-Cruz, Angélica, & Martínez-Gallegos, Verónica (2018). Fosfobacterias promueven la emergencia y el crecimiento de agaves silvestres. *Entreciencias: Diálogos en la Sociedad del Conocimiento*, 6(17). [fecha de Consulta 16 de Enero de 2020]. ISSN: Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=4576/457655955008>
- Sánchez, A., Coronel-Lara, Z., Gutiérrez, A., Vargas, G., Coronado, M. L., & Esqueda, M. (2020). Aclimatación y trasplante de vitroplantas de *A. angustifolia* Haw. en condiciones silvestres. *Revista Mexicana De Ciencias Agrícolas*, 11(7), 1593–1605. <https://doi.org/10.29312/remexca.v11i7.2403>
- Sánchez-González, L. A., Echavarría-Cháirez, F. G., Carrillo-Parra, A., & Pedroza-Sandoval, A. (2020). Morphological and molecular variation of *A. cupreata* Trel. & Berger in the Mexican state of Guerrero. *Plant Systematics and Evolution*, 306(3), 1-17. <https://doi.org/10.1007/s00606-020-01699-2>
- Santíz, J., Rincón Rosales, R., & Gutierrez Miceli, A. (2012). Propagación *in-vitro* de *A. grijalvensis* B.Ullrich, una especie endémica de Chiapas bajo protección especial. *Goyana Botánica*, 69(69), Número especial.
- Santos-Zea, L., Leal-Díaz, A., Cortes-Ceballos, E. & Gutierrez-Uribe, J. (2012). Agave (*Agave spp.*) and its Traditional Products as a Source of Bioactive Compounds. *Current Bioactive Compounds*, 8(3), 218-231. <https://doi.org/10.2174/157340712802762410>.
- Sharma., H. (2017). Role Of Growth Regulators In Micropropagation Of Woody Plants-A Review. *International Journal of Advanced Research*, 5(2), 2378-2385. <https://doi.org/10.21474/ijar01/3421>
- Shin, K. S., Murthy, H. N., Heo, J. W., Hahn, E. J., & Paek, K. Y. (2008). The effect of light quality on the growth and development of *in-vitro* cultured *Doritaenopsis* plants. *Acta Physiologiae Plantarum*, 30(3), 339–343. <https://doi.org/10.1007/s11738-007-0128-0>
- Sifuentes-Nieves, I., Yáñez Macías, R., Neira Velázquez, G., Velázquez, G., García Hernández, Z., González Morones, P. & Hernández-Hernández, E. (2021). Biobased sustainable materials made from starch and plasma/ultrasound modified Agave fibers: Structural and water barrier performance. *International Journal of Biological Macromolecules*, 193, 2374-2381. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.11.071>
- Simonton, W., Robacker, C., & Krueger, S. (1991). A programmable micropropagation apparatus using cycled liquid medium. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 27(2), 211–218. <https://doi.org/10.1007/bf00041292>
- Smith, J. A. C., Schulte, P. J., & Nobel, P. S. (1987). Water flow and water storage in *A. deserti*: osmotic implications of crassulacean acid metabolism. *Plant, Cell & Environment*, 10(8), 639-648.

- Solís-García, A., Rivas-García, P., Escamilla-Alvarado, C., Rico-Martínez, R., Bravo-Sánchez, M., & Botello-Álvarez, J. (2019). METHANOL PRODUCTION KINETICS DURING AGAVE COOKING FOR MEZCAL INDUSTRY. *Revista Mexicana De Ingeniería Química*, 16(3), 827-834. Retrieved from <http://www.rmiq.org/ojs311/index.php/rmiq/article/view/944>
- Somerville, C., Bauer, S., Brininstool, G., Facette, M., Hamann, T., Milne, J., Osborne, E., Paredez, A., Persson, S., Raab, T., Vorwerk, S. & Youngs, H. (2004). Toward a Systems Approach to Understanding Plant Cell Walls. *Science*, 306(5705), 2206-2211. <https://doi.org/10.1126/science.1102765>
- Steinmacher, D. A., Guerra, M. P., Saare-Surminski, K., & Lieberei, R. (2011). A temporary immersion system improves *in-vitro* regeneration of peach palm through secondary somatic embryogenesis. *Annals of Botany*, 108(8), 1463–1475. <https://doi.org/10.1093/aob/mcr033>
- Teisson, C., & Alvard, D. (1995). A New Concept of Plant *In-vitro* Cultivation Liquid Medium: Temporary Immersion. *Current Issues in Plant Molecular and Cellular Biology*, 105–110. [https://doi.org/10.1007/978-94-011-0307-7\\_12](https://doi.org/10.1007/978-94-011-0307-7_12)
- Tewari, D., Tripathi, Y. C., & Anjum, N. (2014). *A. sisalana*: a plant with high chemical diversity and medicinal importance. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 3(8), 238-249.
- Tofanelli, M. B. D., Freitas, P. L., & Pereira, G. E. (2014). 2,4-dichlorophenoxyacetic acid as an alternative auxin for rooting of vine rootstock cuttings. *Revista Brasileira De Fruticultura*, 36(3), 664–672. <https://doi.org/10.1590/0100-2945-266/13>
- Torres, I., Blancas, J., León, A. & Casas, A. (2015). TEK, local perceptions of risk, and diversity of management practices of *A. inaequidens* in Michoacán, Mexico. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/s13002-015-0043-1>
- Torres, I., Casas, A., Vega, E., Martínez-Ramos, M. & Delgado-Lemus, A. (2015). Population Dynamics and Sustainable Management of Mescal Agaves in Central Mexico: *A. potatorum* in the Tehuacán-Cuicatlán Valley. *Economic Botany*, 69(1), 26-41. <https://doi.org/10.1007/s12231-014-9295-2>
- Torres, K. C. (1989). Stages of Micropropagation. *Tissue Culture Techniques for Horticultural Crops*, 52-65. [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-9756-8\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-9756-8_3)
- Uma, S., Karthic, R., Kalpana, S., Backiyarani, S., & Saraswathi, M. S. (2021). A novel temporary immersion bioreactor system for large scale multiplication of banana (Rasthali AAB—Silk). *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-99923-4>
- Uribe, M. E., Ulloa, J., Delaveau, C., Sáez, K., Muñoz, F., & Cartes, P. (2012). Influencia de las auxinas sobre el enraizamiento *in-vitro* de microtallos de *Nothofagus glauca*

(Phil.) Krasser. *Gayana. Botánica*, 69(1), 105–112. <https://doi.org/10.4067/s0717-66432012000100010>

- Vaidya, B. N., Asanakunov, B., Shahin, L., Jernigan, H. L., Joshee, N., & Dhekney, S. A. (2019). Improving micropropagation of *Mentha × piperita* L. using a liquid culture system. *In-vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 55(1), 71–80. <https://doi.org/10.1007/s11627-018-09952-4>
- Valenzuela-Sánchez, K. K., Juárez-Hernández, R. E., Cruz-Hernández, A., Olalde-Portugal, V., Valverde, M. E., & Paredes-Lopez, O. (2006). Plant regeneration of *A. tequilana* by indirect organogenesis. *In-vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 42(4), 336–340. <https://doi.org/10.1079/ivp2006788>
- Van Huylenbroeck, J., & De Riek, J. (1995). Sugar and starch metabolism during ex vitro rooting and acclimatization of micropropagated *Spathiphyllum* 'Petite' plantlets. *Plant Science*, 111(1), 19–25. [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(95\)04223-h](https://doi.org/10.1016/0168-9452(95)04223-h)
- Vargas-Ponce, O., Zizumbo-Villarreal, D., Martínez-Castillo, J., Coello-Coello, J., & Colunga-GarcíaMarín, P. (2009). Genetic erosion and conservation of domesticated plant genetic resources: The case of the endemic *A. cupreata* in México. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 56(7), 947-961. <https://doi.org/10.1007/s10722-009-9421-6>
- Vázquez Díaz, Erasmo, García Nava, J. Rodolfo, Peña Valdivia, Cecilia B., Ramírez Tobías, Hugo M., & Morales Ramos, Victorino. (2011). Tamaño de la semilla, emergencia y desarrollo de la plántula de maguey (*A. salmiana* Otto ex Salm-Dyck). *Revista fitotecnia mexicana*, 34(3), 167-173.
- Vendramini, F., Díaz, S., Gurvich, D. E., Wilson, P. J., Thompson, K., & Hodgson, J. G. (2002). Leaf traits as indicators of resource-use strategy in floras with succulent species. *New Phytologist*, 154(1), 147–157. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2002.00357.x>
- Vesali, F., Omid, M., Mobli, H., & Kaleita, A. (2017). Feasibility of using smart phones to estimate chlorophyll content in corn plants. *Photosynthetica*, 55(4), 603–610. <https://doi.org/10.1007/s11099-016-0677-9>
- Vidal, N., & Sánchez, C. (2019). Use of bioreactor systems in the propagation of forest trees. *Engineering in Life Sciences*, 19(12), 896–915. <https://doi.org/10.1002/elsc.201900041>
- Vilchez Perozo, J. A., & Albany de Vilchez, N. R. (2014). Multiplicación *in-vitro* de *Psidium guajava* L. en sistemas de inmersión temporal. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 16(2), 96-103. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v16n2.42180>
- Vilchez, J. Albany, N., Martínez, L., Molina, M., Pirela, C., Molina, M., Alvarez, C., & Chirinos, J. (2011). Multiplicación en sistemas de inmersión temporal y

enraizamiento *ex-vitro* de ocumo blanco (*Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 13(1), 94-102.

- Watt, M.P (2012). The status of temporary immersion system (TIS) technology for plant micropropagation. *African Journal Of Biotechnology*, 11(76). <https://doi.org/10.5897/ajb12.1693>
- Westphal, K. (1990). Large-Scale Production of New Biologically Active Compounds in Plant-Cell Cultures. *Progress in Plant Cellular and Molecular Biology*, 601–608. [https://doi.org/10.1007/978-94-009-2103-0\\_90](https://doi.org/10.1007/978-94-009-2103-0_90)
- Yan, H., Liang, C., & Li, Y. (2010). Improved growth and quality of *Siraitia grosvenorii* plantlets using a temporary immersion system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 103(1), 131–135. <https://doi.org/10.1007/s11240-010-9752-2>
- Yan, H., Liang, C., Yang, L., & Li, Y. (2009). *In-vitro* and *ex vitro* rooting of *Siratia grosvenorii*, a traditional medicinal plant. *Acta Physiologiae Plantarum*, 32(1), 115–120. <https://doi.org/10.1007/s11738-009-0386-0>
- Yasmin, S., Hasan, J., Hossain, S., Saha, S., & Khatun, F. (2022). Auxin and cytokinin synergism in micropropagation for mass production of *Aloe vera*. *BioTechnologia*, 103(3), 301-310. <https://doi.org/10.5114/bta.2022.118672>
- Zárate-Salazar, J. R., Souza, L. M. D., Morais, M. B. D., Palhares Neto, L., Willadino, L., Gouveia-Neto, A., & Ulisses, C. (2020). Light-emitting diodes and gas exchange facilitation minimize hyperhydricity in *Lippia grata*: Physiological, biochemical and morpho anatomical aspects. *South African Journal of Botany*, 135, 164-171. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.08.019>
- Ziv, M. (2010). Bioreactor Technology for Plant Micropropagation. *Horticultural Reviews*, 1–30. <https://doi.org/10.1002/9780470650776.ch1>
- Zizumbo-Villarreal, D., González-Zozaya, F., Olay-Barrientos, A., Platas-Ruiz, R., Cuevas-Sagardí, M., Almendros-López, L., & Colunga-GarcíaMarín, P. (2009). Archaeological evidence of the cultural importance of *Agave* spp. in pre-Hispanic Colima, Mexico. *Economic Botany*, 63(3), 288-302.