

Micropropagación y aclimatación de Maguey Pitzometl (*Agave marmorata* Roezl) en la Mixteca Poblana

Micropropagation and acclimatization of Maguey Pitzometl (*Agave marmorata* Roezl) in the poblana Mixteca

Daniel Aguilar Jiménez*, José Luis Rodríguez De la O**

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v20n2.77084

RESUMEN

Agave marmorata R. es una planta que se adapta a terrenos someros y fertilidad baja, también sirve para la retención y conservación de agua de lluvia reduciendo la erosión del suelo. Actualmente se encuentra de forma silvestre y escasa en la Mixteca Poblana (México) donde es intensamente aprovechada en gastronomía y como planta medicinal. Por ello, se propuso la propagación *in vitro* como estrategia de rescate y conservación a partir de brotes *in vitro* de *Agave marmorata* en un medio de cultivo básico de Murashige y Skoog (1962) 100 %, suplementado con azúcar de caña 3 %, myo-inositol 100 mg·L⁻¹, agar 0.7 % y 0.40 mg·L⁻¹ de tiamina-HCl, donde se agregaron por separado diferentes concentraciones de 6-Bencil-adenina (BA) y ácido indol-3-acético (AIA) mediante un arreglo factorial 5x5. Se evaluó el número y longitud de brotes y de raíces obtenidos *in vitro*. Para las plantas en aclimatación sólo se evaluó el porcentaje de sobrevivencia en diferentes sustratos. Los datos de las variables se sometieron a un análisis de varianza y a una prueba de medias de Tukey (p=0.05). La mejor respuesta para longitud de brotes, número y longitud de raíces fue en el medio MS 100 % adicionando 10 mg·L⁻¹ de AIA y la proliferación de nuevos brotes fue promovida con la adición de BA y AIA en igual concentración. Finalmente, se obtuvo el 100 % de sobrevivencia de las plántulas en los sustratos de peat moss más agrolita y peat moss más arena de río.

Palabras clave: *in vitro*, organogénesis, propagación, sustrato.

ABSTRACT

Agave marmorata R. is a plant that adapts to shallow lands and low fertility, it also serves for the retention and conservation of rainwater reducing soil erosion. It is currently found in a wild and scarce form in the Mixteca Poblana (Mexico) where it is intensively used in gastronomy and as a medicinal plant. For this reason, *in vitro* propagation was proposed as a rescue and conservation strategy from *in vitro* shoots of *Agave marmorata* in a basic culture medium of Murashige and Skoog (1962) 100 %, supplemented with 3 % sugar cane, myo- inositol 100 mg·L⁻¹, agar 0.7 % and 0.40 mg·L⁻¹ thiamine-HCl, where different concentrations of 6-Benzyl-adenine (BA) and indole-3-acetic acid (IAA) were added separately by a 5x5 factorial arrangement. The number and length of shoots and roots obtained *in vitro* were evaluated. For the plants in acclimation only the percentage of survival in different substrates was evaluated. Los datos de las variables se sometieron a un análisis de varianza y a una prueba de medias de Tukey (p=0.05). The best response for shoot length, number and length of roots was in the MS 100 % medium adding 10 mg·L⁻¹ of IAA and the proliferation of new shoots was promoted with the addition of BA and IAA in the same concentration. Finally, 100 % survival of the seedlings was obtained in the substrates of peat moss plus agrolita and peat moss plus river sand.

Key words: *in vitro*, organogenesis, propagation, substrate.

Recibido: diciembre 10 de 2017 **Aprobado:** noviembre 22 de 2018

* Programa Educativo de Agrobiotecnología, Universidad Tecnológica de Izúcar de Matamoros. Prolongación Reforma No. 164, Barrio de Santiago Mihuacán, Izúcar de Matamoros, Puebla, México. C.P. 74420. *Autor para correspondencia : yolot77@hotmail.com

** Departamento de Fitotecnia, Área de Genética. Universidad Autónoma Chapingo. Km. 38.5, Car. México-Texcoco, Edo. México. jlro8@msn.com

INTRODUCCIÓN

Los agaves son recursos fitogenéticos diversos y endémicos del continente Americano (Granados, 1993; García, 2007), encontrándose principalmente en zonas árida y semiáridas de México (Pérez Molphe *et al.*, 2012). Sin embargo, estas especies se aprovechan en exceso como materia prima para la elaboración de bebidas alcohólicas y fibras naturales (Martínez-Ramírez *et al.*, 2014), y esto ha provocado la disminución de poblaciones de varias especies (SEMARNAT, 2010). Dentro de estas plantas se encuentra *Agave marmorata* Roezl, cuya existencia es de forma silvestre en cerros o montañas en la Mixteca Poblana (México) donde es obtenida para uso medicinal (Flores-Maya *et al.*, 2015) e incluirla en la gastronomía sin preocuparse por su conservación y reproducción. Además, *Agave marmorata* también tiene gran impacto ambiental por su capacidad en retener y conservar agua de lluvia y en reducir la erosión del suelo, siendo el estado de Puebla (México), después de Oaxaca, el estado con mayor diversidad de agaves (García, 2007). Una estrategia para recuperar, multiplicar y preservar especies vegetales es el cultivo de tejidos vegetales *in vitro* (Jacques, 1988; Madrigal *et al.*, 1990; Pierik, 1990), y ya existen algunos procedimientos de micropropagación y aclimatación de agaves como *Agave inaequidens* Koch (Aureoles-Rodríguez *et al.*, 2008), *A. salmiana* (Ramírez *et al.*, 2008), *A. fourcroydes* Lem. (Garriga *et al.*, 2010), *A. tequilana* Weber (Portillo *et al.*, 2007; Ramírez *et al.*, 2008; Angeles-Espino *et al.*, 2012), *A. grijalvensis* B. Ullrich (Santíz *et al.*, 2012), *A. americana* variedad oaxacensis (Luna *et al.*, 2013; Cruz-García *et al.*, 2017) *A. angustifolia* Haw. (Monja-Mio *et al.*, 2015; Ríos-Ramírez *et al.*, 2017), *A. potatorum* Zucc (Luna-Luna *et al.*, 2017). No obstante, se carece de información sobre la propagación *in vitro* de *Agave marmorata* Roezl y su aclimatación. Por ello, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de 6-Bencil-adenina (BA) con ácido indol-3-acético (AIA) para la micropropagación de *Agave marmorata* Roezl *in vitro* y estimar el porcentaje de sobrevivencia de plantas en aclimatación bajo diferentes sustratos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Origen del material vegetal

La presente investigación se llevó a cabo de en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Universidad Tecnológica de Izúcar de Matamoros, Puebla, a partir de la obtención de brotes a través del cultivo *in vitro* de ápices de plantas de *Agave marmorata* R, colec-

tadas en Tehuiztzingo, Puebla, lugar ubicado a una altitud promedio de 1060 msnm en las coordenadas 18° 19' 55" N, 98° 16' 32" O.

Condiciones de cultivo

Los brotes obtenidos fueron cultivados en un medio de cultivo básico de Murashige y Skoog (1962) al 100 %, suplementado con 3 % de azúcar de mesa, 100 mg·L⁻¹ de myo-inositol, 0.7 % agar, 0.40 mg·L⁻¹ de tiamina-HCl y pH de 5.7 ± 0.1. Se adicionaron por separado cinco concentraciones de ácido indolacético (AIA) (0.0, 0.3, 1.0, 3.0 y 10.0 mg·L⁻¹) y cinco de 6-benzyladenina (BA) (0.0, 0.3, 1.0, 3.0 y 10.0 mg·L⁻¹) efectuándose un diseño de tratamientos completamente al azar con arreglo factorial 5x5. Después de diluir el agar en el medio nutritivo, se vertió en frascos de 20 mL por frasco y se cubrieron con tapas de polipropileno para esterilizarse por 20 minutos en autoclave de vapor de agua tipo horizontal a 121 °C y 1.5 kg/cm² de presión. Una vez cultivados los explantes *in vitro* se mantuvieron en condiciones de 24 horas con luz artificial mediante lámparas de luz blanca y a una temperatura de 26 ± 2 °C en el área de incubación. Para las respuestas se evaluó: número y longitud (cm) de brotes y de raíces a las diez semanas de cultivo *in vitro*. Para ello, se retiraron las vitroplantas de los recipientes de cultivo en campana de flujo laminar y con ayuda de hojas milimétricas estériles y una regla de aluminio se tomaron los datos de cada variable.

Aclimatación de plantas obtenidas *in vitro*

Las condiciones ambientales donde se llevó a cabo la aclimatación de las plantas de *Agave marmorata* obtenidas *in vitro* fueron las del área de incubación del Laboratorio de cultivos tejidos vegetales. Los recipientes de cultivo se trasladaron al área de lavado para extraer las vitroplantas y retirarles el agar de las raíces con agua potable. Posteriormente, se colocaron en una solución de fungicida Manzate® (1 g·L⁻¹) por cinco minutos, se decantó el fungicida y se procedió a colocar las plantas de *Agave marmorata* en diferentes sustratos. Los sustratos empleados para realizar el proceso de aclimatación fueron: agrolita®, peat most (Cosmopeat®), tezontle, arena de río, peat most con agrolita® (1:1) y peat most con arena de río (1:1). Antes de llenar una charola de unicel de 200 cavidades con cada uno de los sustratos, estos se humedecieron a capacidad de campo únicamente con agua. Después de colocar una planta por cavidad, se cubrieron con plástico transparente para conservar la humedad por espacio de tres semanas, pasado ese tiempo, se retiró el plástico para tomar el porcentaje de sobrevivencia de plantas.

Análisis estadístico

Para el análisis de los resultados *in vitro* se consideraron 10 repeticiones por tratamiento tomando un tubo de ensayo como unidad experimental con un brote de *A. marmorata* cada uno y registrando las observaciones durante 10 semanas. Los datos se sometieron a análisis de varianza y se aplicó la prueba de Tukey ($p=0.05$) para determinar la diferencia entre los efectos medios de los tratamientos. El paquete estadístico empleado fue Minitab 17.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Formación de brotes *in vitro* en *Agave marmorata* R.

Los resultados obtenidos de organogénesis directa son similares a los reportados para *A. fourcroydes* (Robert *et al.* (1987), *A. sisalana* (Das, 1992) y *A. schidigera* (Rodríguez *et al.*, 1996) al obtener nuevos brotes directamente del explante sin la formación de callo, pero sólo cuando las concentraciones de AIA eran sumamente elevadas con respecto a BA, resultados que difieren con Domínguez *et al.* (2008) al obtener 10.5 y 6.9 brotes en *A. cupreata* con 1.5 mg·L⁻¹ y con 1.0 mg·L⁻¹ de BA, y 6.4 brotes en *A. difformis*, 6.1 brotes en *A. karwinskii*, 4.7 brotes en *A. obscura* y 5 brotes en *A. potatorum* con 1.0 mg·L⁻¹ de forma directa. Sin embargo, cuando las concentraciones de BA eran mayores (10.0, 3.0 y 1.0 mg·L⁻¹) con respecto a AIA (3.0, 1.0, 0.3 y 0.0 mg·L⁻¹), T24, T18, T12 y T5, respectivamente, sí se formó callo. Posteriormente, a partir de los callos se formaron pequeños brotes poco diferenciados, pero a las tres semanas de su formación presentaron hojas con puntas secas. Sin embargo, los resultados obtenidos a partir de organogénesis indirecta en *A. marmorata*, señalan que la presencia de BA es fundamental para la formación de callo como se demuestra en *A. sisalana* (Hazra *et al.*, 2002; Nikam, 1997) al obtener brotes adventicios a partir de callos con 6.0 mg·L⁻¹ de BA, y también como manifiesta Reyes-Zambrano *et al.* (2016) en *A. americana* L. obteniendo un máximo de 74 plantas por callo mediante el uso de 2.26 µM (0.5 mg·L⁻¹) de 2,4-D y 38.2 µM (8.6 mg·L⁻¹) de BA.

En el presente trabajo, el mejor tratamiento de forma estadísticamente significativa (Tukey, $p=0.05$) para la proliferación de brotes fue T25 con 41 ± 3.2 brotes nuevos, seguido de los tratamientos: T24 y T23 con 36.18 ± 3.12 y 31.85 ± 4.15 brotes respectivamente (tabla 1), resultados superiores a los obtenidos por Luna *et al.* (2014) en *A. americana* al obtener 21 brotes con 6.0 mg·L⁻¹ de BA. Se halló, que cuando AIA y BA se encuentran en igual concentración (T7, T13, y T19) con respecto a 10.0 mg·L⁻¹ de BA (T5) ó 10.0 mg·L⁻¹ de AIA (T21), la multiplicación de brotes se ve favorecida, esto

indica que en *Agave marmorata in vitro* la presencia de AIA es indispensable para la formación de nuevos brotes combinado con BA tal como sugiere Siddique *et al.* (2015) exponiendo el máximo número de brotes en *Cassia angustifolia* Vahl (Fabaceae) con 5 µM (1.1 mg·L⁻¹) de BA más 0.5 µM (0.9 mg·L⁻¹) de AIA en un medio MS, por lo tanto, los resultados sugieren que concentraciones mayores a 3.0 mg·L⁻¹ de BA sin AIA, y viceversa, inhiben la multiplicación *in vitro* de *Agave marmorata*, resultados que coinciden con Ramírez *et al.* (2008), al obtener mejor producción de brotes en *Agave spp.* en concentraciones bajas de ácido indolbutírico (AIB) y BA, pero los resultados difieren con Koné *et al.* (2013), donde la formación de brotes en *Vigna subterranea* se dio en presencia de BA con o sin ácido naftalenacético (ANA), esto revela que la formación de brotes *in vitro* no es exclusiva de la combinación de BA y AIA o AIB en agaves, sino del tipo de especie o familia vegetal con que se trabaje. Sin embargo, Luna *et al.* (2014) reportan la formación de hasta cuatro brotes en *A. americana* con 10.8 cm presentando raíces adventicias sin BA. También Ramírez *et al.* (2008), mencionan la formación de 12 brotes axilares por explante en *A. tequilana* al tratar tejidos con ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). Esto indica que la concentración endófitica de reguladores de crecimiento puede influir en el tipo de respuestas morfológicas obtenidas.

Longitud de brotes *in vitro* en *Agave marmorata* R.

Se destaca que la presencia de AIA tienen efecto en la diferenciación, crecimiento y desarrollo de brotes formados o neoformados *in vitro* en *Agave marmorata* R. pero sin la presencia de BA, siendo su efecto de manera más rápida con forme se incrementa la cantidad de AIA (desde 0.3 mg·L⁻¹ hasta 10.0 mg·L⁻¹) resultando superior de manera estadísticamente significativa (Tukey, $p=0.05$) el T21 (AIA 10.0 mg·L⁻¹ + BA 0.0 mg·L⁻¹) con 2.7 ± 0.3 cm y el T16 (AIA 3.0 mg·L⁻¹ + BA 0.0 mg·L⁻¹) con 2.4 ± 0.1 cm por brote (tabla 1), ambos tratamientos a partir de los primeros siete días evidenciaron resultados para esta variable pero son inferiores a los obtenidos por Luna *et al.* (2014) en *A. americana* logrando 6.5 cm por brote con 6.0 mg·L⁻¹ de BA y 40 g·L⁻¹ de sacarosa, esto indica que aún hay otros factores a considerarse para obtener las respuestas morfológicas deseadas. Por otra parte, el T25 (AIA y BA 10.0 mg·L⁻¹) fue de los tratamientos que al inicio empezó muy rápido a facilitar la longitud de los brotes formados, no obstante, al ser el tratamiento que originó mayor cantidad de brotes, su capacidad para favorecer la longitud se redujo conforme transcurrieron los días de cultivo *in vitro* llegando a estabilizarse a partir de la sexta semana, resultados similares en los tratamientos T24, T23, T22, T20, T19, T18,

T17, T13 y T9, donde se encuentra presente BA y AIA en concentraciones que favorecen la formación de brotes pero también la longitud (tabla 1), lo que puede crear sinergia para formar brotes, resultados similares a lo obtenido por Ríos-Ramírez *et al.* (2017), pero también antagonismo para favorecer la longitud (cm) de brotes entre los reguladores de crecimiento en esas concentraciones de acuerdo a los resultados obtenidos en *A. marmorata*. 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, es decir, a mayor multiplicación de nuevos brotes *in vitro* de *Agave marmorata*, la longitud (cm) de ellos se ve reducida y viceversa, 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 y raíces.

Formación de raíz en brotes *in vitro* de *Agave marmorata* R.

A partir de la primera semana de cultivo *in vitro*, los tratamientos T6 (AIA 0.3 mg·L⁻¹ + BA 0.0 mg·L⁻¹), T11 (AIA 1.0 mg·L⁻¹ + BA 0.0 mg·L⁻¹), T16 (AIA 3.0 mg·L⁻¹ + BA 0.0 mg·L⁻¹) y T21 (AIA 10.0 mg·L⁻¹ + BA 0.0 mg·L⁻¹) favorecieron la diferenciación de brotes y formación de raíces. Esto parece estar relacionado por el tipo de regulador de crecimiento vegetal que es una auxina (AIA) similar a lo que reporta Enríquez-del Valle *et al.* (2016) en la aparición de raíces en *A. potatorum*, entre 10 y 14 días de cultivo *in vitro* empleando 1.0 mg·L⁻¹ de AIB, pues al originar raíces a los brotes, éstos tienen mayor capacidad de absorber nutrientes, lo que favorece un mayor crecimiento y desarrollo, resultados que igualmente coinciden con Luna *et al.* (2013), en brotes de *A. americana* variedad oaxacansis, llegando a la conclusión que la adición de AIB en 0.5 ó 1.0 mg·L⁻¹ al medio de cultivo estimula no sólo mayor cantidad de raíces, sino también el crecimiento de brotes en menor tiempo. También se observó en *A. marmorata* que la presencia de BA inhibió el efecto de AIA para formar raíces a medida que aumenta su concentración en los medios de cultivo (tabla 1), resultados similares a los obtenidos por Luna *et al.* (2014) en *A. marmorata* con BA, la cual inhibió la formación de raíces, pero en ausencia de BA sí hubo presencia de raíz, resultado que también coincide en este estudio con *A. marmorata* para T1 (AIA y BA 0.0 mg·L⁻¹) (tabla 1). Por otra parte, varios autores reportan que las sales inorgánicas MS al 50 % de su concentración son suficientes para inducir la aparición de raíces como lo menciona Martínez y Pacheco (2006) logrando el 100 % de brotes con raíz *in vitro* después de 30 días de cultivo en un medio MS modificado y suple-

mentado con AIA, AIB o en ausencia de reguladores de crecimiento vegetal. Así mismo, Siddique *et al.* (2015) reporta la eficiencia del medio MS 50 % para el enraizamiento de brotes de *Cassia angustifolia* Vahl pero adicionado con 2.0 µM (0.4 mg·L⁻¹) de AIB. De igual forma, Santacruz *et al.*, (1999) reporta el enraizamiento de brotes *in vitro* en *Agave parrasana* al emplear un medio MS sin reguladores de crecimiento, lo que coincide con Powers y Backhaus (1989) y con este trabajo para T1 (control) con únicamente sales MS al 100 % para favorecer la presencia de raíces en *Agave marmorata in vitro* (1.88 ± 0.82 bc) pero estadísticamente no significativo (Tukey, p=0.05) comparado con T6 (4.11 ± 1.09 ab), T16 (3.95 ± 0.45 ab) y T21 (4.98 ± 1.12 a), resultado esperado también para T11 ya que tiene 1.0 mg·L⁻¹ de AIA (tabla 1), sin embargo, 1.0 mg·L⁻¹ de AIA en *Agave marmorata in vitro* parece ser menos eficaz que 1.0 mg·L⁻¹ de AIB (Enríquez-del Valle *et al.*, 2005). También es importante resaltar que 70 días de cultivo *in vitro* de *Agave marmorata* fue suficiente para considerar que el efecto de los reguladores de crecimiento y las sales inorgánicas MS fuera eficaz según Nikam (1997), quien recomienda un periodo de 21 a 35 días para lograr el enraizamiento usando diferentes combinaciones de BA, ANA, AIA y 2,4-D.

Longitud de raíz en brotes *in vitro* de *A. marmorata* R.

La longitud de raíces formadas estuvo determinada estadísticamente significativa (Tukey, p=0.05) por los tratamientos que contenían 3.0 y 10.0 mg·L⁻¹ de AIA (T16 y T21) con 8.2 ± 0.6 cm y 9.3 ± 0.7 cm, respectivamente, seguidos por el tratamiento control (T1) y por 0.3 mg·L⁻¹ de AIA (T6) con 6.4 ± 0.16 cm y 6.7 ± 0.4 cm, respectivamente, con relación a los demás tratamientos (tabla 1). Un dato interesante de mencionar es el hecho de que 1.0 mg·L⁻¹ de AIA para *Agave marmorata in vitro* sólo parece tener efecto en la formación de brotes nuevos al combinarse con 1.0 mg·L⁻¹ de BA, pues para favorecer la longitud de raíces fue superado estadísticamente significativa (Tukey, p=0.05) por 0.3 y 0.0 mg·L⁻¹ de AIA (tabla 1). También, la forma de raíz que se formó dependió de los tratamientos con únicamente AIA, donde aparecieron raíces ramificadas (T1 y T6) y raíces tipo pivotante cada vez más vigorosas conforme aumentaba la concentración de AIA (T11, T16 y T21) pero sin raíces secundarias como en T1 y T6. Estos resultados facilitan tomar decisiones a la hora de elegir el medio de cultivo, regulador de crecimiento y concentración si el siguiente paso del cultivo *in vitro* de *Agave marmorata* es la aclimatación. Sin embargo, los resultados distan mucho de lo mencionado por Enríquez-del Valle *et al.* (2005) en *A. angustifolia* con 1.0 mg·L⁻¹ de AIB y a lo mencionado por Enríquez-del Valle *et al.* (2016) en *A.*

Tabla 1. Efecto final de cada tratamiento en brotes *in vitro* de *Agave marmorata* Roetzl.).

No.	Tratamiento	Número de brotes	Longitud de brotes (cm)	Número de raíz	Longitud de raíz (cm)
T1	AIA 0.0 mg·L ⁻¹ + BAP 0.0 mg·L ⁻¹	0.5 ± 0.25 g	2.0 ± 0.2 bc	1.88 ± 0.82 bc	6.4 ± 0.16 b
T2	AIA 0.0 mg·L ⁻¹ + BAP 0.3 mg·L ⁻¹	6.0 ± 1.8 e	1.2 ± 0.11 d	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
T3	AIA 0.0 mg·L ⁻¹ + BAP 1.0 mg·L ⁻¹	9.75 ± 3.15 de	1.3 ± 0.13 d	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
T4	AIA 0.0 mg·L ⁻¹ + BAP 3.0 mg·L ⁻¹	12.28 ± 2.92 d	1.5 ± 0.12 cd	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
T5	AIA 0.0 mg·L ⁻¹ + BAP 10.0 mg·L ⁻¹	1.35 ± 0.52 fg	1.3 ± 0.2 d	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
T6	AIA 0.3 mg·L ⁻¹ + BAP 0.0 mg·L ⁻¹	1.5 ± 0.85 fg	2.1 ± 0.2 b	4.11 ± 1.09 ab	6.7 ± 0.4 b
T7	AIA 0.3 mg·L ⁻¹ + BAP 0.3 mg·L ⁻¹	23.55 ± 2.35 c	2.2 ± 0.2 ab	3.02 ± 1.04 ab	6.2 ± 0.3 bc
T8	AIA 0.3 mg·L ⁻¹ + BAP 1.0 mg·L ⁻¹	26.0 ± 1.0 c	1.7 ± 0.1 c	3.0 ± 0.5 b	5.8 ± 0.2 c
T9	AIA 0.3 mg·L ⁻¹ + BAP 3.0 mg·L ⁻¹	27.5 ± 1.85 bc	1.8 ± 0.12 bc	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
T10	AIA 0.3 mg·L ⁻¹ + BAP 10.0 mg·L ⁻¹	9.0 ± 2.0 de	1.5 ± 0.25 cd	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
T11	AIA 1.0 mg·L ⁻¹ + BAP 0.0 mg·L ⁻¹	1.5 ± 0.58 f	1.9 ± 0.15 bc	1.14 ± 1.06 c	2.18 ± 0.2 e
T12	AIA 1.0 mg·L ⁻¹ + BAP 0.3 mg·L ⁻¹	5.25 ± 2.75 ef	1.2 ± 0.1 d	1.08 ± 1.02 c	1.74 ± 0.24 e
T13	AIA 1.0 mg·L ⁻¹ + BAP 1.0 mg·L ⁻¹	26.5 ± 2.5 bc	1.8 ± 0.12 bc	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
T14	AIA 1.0 mg·L ⁻¹ + BAP 3.0 mg·L ⁻¹	10.12 ± 5.88 de	1.9 ± 0.3 bc	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
T15	AIA 1.0 mg·L ⁻¹ + BAP 10.0 mg·L ⁻¹	6.24 ± 2.14 ef	1.6 ± 0.1 cd	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
T16	AIA 3.0 mg·L ⁻¹ + BAP 0.0 mg·L ⁻¹	2.5 ± 1.15 f	2.4 ± 0.1 ab	3.95 ± 0.45 ab	8.2 ± 0.6 a
T17	AIA 3.0 mg·L ⁻¹ + BAP 0.3 mg·L ⁻¹	9.11 ± 3.07 de	1.4 ± 0.12 d	2.02 ± 0.96 bc	4.23 ± 0.27 d
T18	AIA 3.0 mg·L ⁻¹ + BAP 1.0 mg·L ⁻¹	7.2 ± 4.82 def	1.6 ± 0.2 cd	2.05 ± 0.45 bc	4.0 ± 0.42 d
T19	AIA 3.0 mg·L + BAP 3.0 mg·L ⁻¹	29.14 ± 2.24 bc	1.4 ± 0.2 cd	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
T20	AIA 3.0 mg·L ⁻¹ + BAP 10.0 mg·L ⁻¹	14.2 ± 3.3 d	2.1 ± 0.1 b	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
T21	AIA 10.0 mg·L ⁻¹ + BAP 0.0 mg·L ⁻¹	3.04 ± 1.02 f	2.7 ± 0.3 a	4.98 ± 1.12 a	9.3 ± 0.7 a
T22	AIA 10.0 mg·L ⁻¹ + BAP 0.3 mg·L ⁻¹	7.65 ± 1.45 e	1.8 ± 0.22 bc	3.0 ± 0.45 b	5.2 ± 0.41 c
T23	AIA 10.0 mg·L ⁻¹ + BAP 1.0 mg·L ⁻¹	31.85 ± 4.15 b	1.4 ± 0.23 cd	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
T24	AIA 10.0 mg·L ⁻¹ + BAP 3.0 mg·L ⁻¹	36.18 ± 3.12 ab	1.4 ± 0.2 cd	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
T25	AIA 10.0 mg·L ⁻¹ + BAP 10.0 mg·L ⁻¹	41.0 ± 3.2 a	2.0 ± 0.2 bc	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0

Respuestas de brotes *in vitro* de *Agave marmorata* R., por tratamiento. Los tratamientos que tienen la misma letra, no son estadísticamente diferentes (Tukey, p = 0.05).



Figura 1. Micropropagación y aclimatación de *Agave marmorata*. **A)** Obtención de brotes con 10.0 mg·L⁻¹ de BA y AIA (T25) **B)** Obtención de brotes con 3.0 mg·L⁻¹ de BA y AIA (T19) **C)** Crecimiento de brotes con 10.0 mg·L⁻¹ de AIA (T21) **D)** Plantas aclimatadas (100 % de sobrevivencia) a las 3 semanas en condiciones *ex vitro* **E)** Plantas de *Agave marmorata* con 3 meses de edad después del periodo de aclimatación.

potatorum. Como se puede observar en la tabla 1, 1.0 mg·L⁻¹ de AIA (T11) es el tratamiento que menos favoreció la presencia y longitud (cm) de raíces (2.18 ± 0.2) en *Agave marmorata* siendo superado por el tratamiento control (T1) y por T6 con 0.3 mg·L⁻¹ de AIA de manera estadísticamente significativa (Tukey, $p=0.05$). A pesar de, los resultados de este estudio con *A. marmorata* muestran que a mayor concentración de AIA en el medio de cultivo, la presencia y longitud de raíces se ve favorecida de forma estadísticamente significativa (T16 y T21) con respecto a T6 (0.3 mg·L⁻¹ de AIA) y T1 (control) (tabla 1).

Aclimatación de plantas obtenidas *in vitro*

La supervivencia de las plantas a condiciones ambientales fue del 100 % en los sustratos a base de peat most con agrolita y peat most con arena de río. Sin embargo, agrolita®, arena de río y tezontle mostraron menor supervivencia de plantas de *A. marmorata* obtenidas *in vitro* en un 38.7 %, 35.7 % y 72.4 % de sobrevivencia respectivamente, resultados similares a los obtenidos por Domínguez *et al.* (2008) en Agaves mexicanos (*Agave cupreata*, *A. difformis*, *A. karwinskii*, *A. obscura* y *A. potatorum*) logrando un porcentaje de sobrevivencia del 53, 73, 60, 100 y 73 %, respectivamente, en un

suelo comercial para macetas y arena (1:1). Esto indica que el sustrato peat most y arena de río es una buena alternativa para la aclimatación de plantas de *Agave marmorata* obtenidas *in vitro*, reduciendo costos al sustituir la arena de río a otro sustrato comercial. También, Siddique *et al.* (2015), reporta el 80 % de supervivencia de plantas de *Cassia angustifolia* Vahl aclimatadas en macetas con suelo de jardín, entendiéndose que un sustrato con buena retención de humedad, aireación y buen drenaje son ideales para favorecer la supervivencia de plantas *ex vitro*. No obstante, los resultados obtenidos por Cruz-García *et al.* (2017), mostraron que el sustrato y la disponibilidad de nutrientes influyen durante la aclimatación de plantas de *A. americana* var. *oaxacensis*, por lo tanto, es importante seguir evaluando diferentes sustratos para cada especie propagada *in vitro* y que se pretenda aclimatar con éxito para ser llevada a campo.

CONCLUSIONES

Se logró propagar *in vitro* la especie *Agave marmorata* Roez y se determinó que los mejores sustratos para la aclimatación de plantas de *Agave marmorata* obtenidas *in vitro* son las mezclas de peat most más agrolita y

peat most más arena de río. También se encontró que la multiplicación y diferenciación *in vitro* de brotes de *Agave marmorata* Roezl es favorecida cuando las concentraciones de AIA y BA se adicionan al medio de cultivo MS en iguales concentraciones.

La realización de la presente investigación *in vitro* permite contar con información confiable para desarrollar un proyecto de micropropagación y aclimatación de *Agave marmorata* ya que se tiene el protocolo para cada una de las etapas del cultivo de tejidos vegetales *in vitro* de dicha planta.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Angeles-Espino, A., Valencia-Botín, A. J., Virgen-Calleros, G., Ramírez-Serrano, C., Paredes-Gutiérrez, L., Hurtado-De la Peña, S. (2012) Micropropagación de agave (*Agave tequilana* Weber. var. Azul) a través de yemas axilares. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 15(3), 693-698.
- Aureoles-Rodríguez, F., Rodríguez-de la O, J. L., Legaria-Solano, J. P., Sahagún-Castellanos, J., Peña-Ortega, M. G. (2008). Propagación *in vitro* del maguey bruto (*Agave inaequidens* Koch), una especie amenazada de interés económico. *Revista Chapingo. Serie Horticultura*, 14(3), 263-269.
- Cruz-García, H., Campos-Ángeles, G. V., Enríquez-del Valle, J. R., Velasco-Velasco, V. A., Rodríguez-Ortiz, G. (2017). Senescencia foliar en plantas micropropagadas de *Agave americana* durante su aclimatización. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 8(2), 381-391.
- Das, T. (1992). Micropropagation of *Agave sisalana*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 31, 253-255.
- Domínguez, R. M. S., Alpuche, S. A. G., Vasco, M. N. L., Pérez, M. B. E. (2008). Efecto de citocininas en la propagación *in vitro* de agaves mexicanos. *Rev. Fitotec. Mex.* 31(4), 317-322.
- Enríquez-del Valle, J.R., Carrillo-Castañeda, G., Rodríguez-de la O, J. L. (2005). Sales inorgánicas y ácido indolbutírico en el enraizamiento *in vitro* de brotes de *Agave angustifolia*. *Rev. Fitotec. Mex.* 28(2),175-178.
- Enríquez-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. *Cien. Inv. Agr.* 43(2), 263-272.
- Flores-Maya, S., Vargas-Jurado, M. A., Suárez-Mota, M. E., Barrera-Escorcia, H. (2015). Análisis cariotípico de *Agave marmorata* y *Agave peacockii* (Agavaceae) ubicados en las terrazas aluviales del río Zapotitlán, Puebla, México. *POLIBOTANICA*, ISSN2395-9525, 40: 109-125. DOI: 10.18387/polibotanica.40.7.
- García, M. A. J. (2007). Los Agaves de México. Jardín Botánico. Instituto de Biología. Universidad Autónoma de México. México. *Revista Ciencias*, 87, 14-23.
- Garriga, C. M., González, O. G., Alemán, G. S., Abreu, C. E., Quiroz, B. K., Caligari, P. D. S., García-González, R. (2010). Management of auxin-cytokinin interactions to improve micropropagation protocol of henequen (*Agave fourcroydes* Lem.). *Chilean Journal of Agricultural Research* 70(4), 545-551.
- Granados, S. D. (1993). Los Agaves en México. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 252 p.
- Hazra, S. K., Das, S., Das, A. K. (2002). Sisal plant regeneration via organogénesis. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 708(3), 235-240.
- Jacques, M. (1988). Multiplicación Vegetativa y Cultivo *in vitro*. Los Meristemas y la Organogénesis. Mundi-Prensa. Madrid, España. 232 p.
- Koné, M., Koné, T., Kouakou, T. H., Konaté, S. J., Ochatt, S. J. S. (2013). Plant regeneration via direct shoot organogénesis from cotyledon explants of *Bambusa groundnut*, *Vigna subterranea* (L.) Verdc. *Revista Biotechnol. Agron. Soc. Environ*, 17(4), 584-592.
- Luna-Luna, S., Enríquez-del Valle, J. R., Rodríguez-Ortiz, G. (2017). Anatomía y morfología de plantas micropropagadas-aclimatadas de *Agave potatorum* Zucc. fertirrigadas en vivero. *Rev. Fitotec. Mex.*, 40 (4), 491-494.
- Madrigal, L. R., Pineda, F. E. and Rodríguez-de la O, J. L. (1990). Agave. In: handbook of plant cell culture. Ammirato, P. V., Evans, D. A., Sharp, W. R. and Bajaj, Y. P. S. (Eds.) McGraw-Hill Publishing Company. New York, USA. (5):206- 227.
- Martínez, A. M., Pacheco, J. C. (2006). Protocolo para la micropropagación de *Furcraea macrophylla* Baker. *Agronomía colombiana*, 24(2), 207-213.

- Martínez-Ramírez, S., Bautista-Sánchez, G., Pedro-Santos, E. C., Guerrero-Cruz, P. D. (2014). Crecimiento y contenido de clorofila del maguey mezcalero (*Agave potatorum* Zucc.) en policultivo con maíz y frijol. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 378(3), 297-304.
- Luna, M. E. M., Enríquez-del Valle, J. R., Velasco-Velasco, V. A., Villegas-Aparicio, Y., Carrillo-Rodríguez, J. C., Rodríguez-Ortiz, G. (2013). Composición del medio de cultivo y la incubación para enraizar brotes de *Agave*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas (Pub. Esp.)*6, 1151-1159.
- Luna, M. E. M., Enríquez-del Valle, J. R.; Velasco-Velasco, V. A.; Villegas-Aparicio, Y.; Carrillo-Rodríguez, J. C. (2014). Concentración de benciladenina, tipo y dosis de carbohidratos en el medio de cultivo para proliferación de brotes de *Agave Americana*. *Rev. FCA UNCUYO*, 46(1), 97-107.
- Monja-Mio, K. M., Barredo, P. F., Herrera, H. G., Esqueda, V. M. and Robert, M. L. (2015). Development of the stomatal complex and leaf surface of *Agave angustifolia* Haw. 'Bacanora' plantlets during the *in vitro* to *ex vitro* transition process. *Scientia Horticulturae*, 189, 32-40.
- Murashige, T.; Skoog, F. (1962). A revised médium for rapid growth and bioassays with Tobacco Tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15(3), 473- 497.
- Nikam, T. D. (1997). High frequency shoot regeneration in *Agave sisalana*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 51(3), 225-228.
- Pérez Molphe, B. E., Esparza A. M. J. y Pérez R. M. E. (2012) Conservación *in vitro* de germoplasma de *Agave spp.* bajo condiciones de crecimiento retardado. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 35(4), 279-287.
- Pierik, R. L. M. (1990). Cultivo *in vitro* de las Plantas Superiores. Mundi-Prensa. Madrid, España. 325 p.
- Portillo, M. L., Santacruz-Ruvalcaba, F., Gutiérrez-Mora, A., Rodríguez-Garay, B. (2007). Somatic embryogenesis in *Agave tequilaza* Weber cultivar Azul. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 43(6), 569-575.
- Powers, D. E., Backhaus, R. A. (1989). *In vitro* propagation of *Agave arizonica* Gentry y Webwer. *Plant cell tiss. Org. Cult.*, 16(1), 57-60.
- Reyes-Zambrano, S. J., Lecona-Guzman, C. A., Barredo-Pool, F. A., Ambrosio-Calderón, J. D., Abud-Archila, M., Rincón-Rosales, R., Ruiz-Valdiviezo, V. M., Gutiérrez-Miceli, F. A. (2016). Plant growth regulators optimization for maximize shoots number in *Agave americana* L. by indirect organogenesis. *Gayana Bot.*, 73(1), 124-131.
- Ríos-Ramírez, S. 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 *Agave angustifolia* adventitious shoots. *Cien. Inv. Agr.*, 44(3), 285-294.
- Robert, M. L., Herrera, J. L., Contreras, F., Scorer, K. N. (1987). *In vitro* propagation of *Agave fourcroydes* Lem. (Henequen). *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 8(1), 37-48.
- Rodríguez, G. B., Gutiérrez, M. A., Santacruz, R. F. (1996). Métodos de propagación biotecnológicos y convencionales en agaváceas para zonas áridas. Técnicas convencionales y biotecnológicas para la propagación de plantas de zonas áridas. Santiago (Chile). FAO. pp. 57-86.
- Santacruz, R. F., Gutiérrez, P. H., Rodríguez, G. B. (1999). Efficient *in vitro* propagation of *Agave parrasana* Berger. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 56(3), 163-167.
- Santíz, J. A., Rincón-Rosales, R., Gutiérrez-Miceli, F. A. (2012). Propagación *in vitro* de *Agave grijalvensis* B. Ullrich, una especie endémica de Chiapas bajo protección especial. *Gayana Botánica* 69(Número especial): 23-30.
- SEMARNAT, Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (2010). Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010. Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio. Lista de especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación, Segunda Sección. 30 de diciembre de 2010. México, D.F. 78 p.
- Siddique, I., Bukhari, N. A. W., Perveen, K., Siddiqui, I. (2015). Influence of Plant Growth Regulators on *In Vitro* Shoot Multiplication and Plantlet Formation in *Cassia angustifolia* Vahl. *Journal. Braz. Arch. Biol. Technol.*, 58(5), 686-691.