

Ensayo expositivo

Alternativas innovadoras en la micropropagación de agaves mezcaleros

Recibido: 10-12-2019 Aceptado: 20-07-2020 (Artículo Arbitrado)

Resumen

La producción de Mezcal es una de las actividades económicas más importantes en varias regiones de México. Las especies de agaves utilizadas para tal fin son explotadas cada vez más por la industria del mezcal, y a diferencia del *A. tequilana*, aún son pocas las plantaciones comerciales que existen de especies mezcaleras. Una alternativa ante esta situación sería el establecimiento de un sistema de propagación masiva de agaves mezcaleros. De acuerdo a la literatura sobre los protocolos de propagación *in vitro* de los principales agaves mezcaleros, se identificaron dos innovaciones que actualmente están siendo aplicados en la propagación: 1) Sistemas de Inmersión Temporal y 2) Diodos Emisores de Luz (LED). Las principales ventajas de ambas técnicas son: el incremento en la multiplicación y calidad en las plantas obtenidas *in vitro*, además de reducir los costos de producción. Asegurando así un futuro prometedor, en el escalamiento de la propagación de estas especies. Sin embargo, a pesar de la implementación de estas innovaciones en el cultivo *in vitro*, los conocimientos sobre propagación de agaves mezcaleros son limitados y se requiere realizar más investigaciones que permitan a través de la micropropagación, satisfacer la demanda de un mercado pujante.

Abstract

Mezcal production is one of the most important economic activities in several regions of Mexico. The agave species used in its production are increasingly exploited by the mezcal industry, although unlike *A. tequilana*, there are still only a few commercial plantations of mezcal species. An alternative to this situation would be the establishment of a wider propagation system of mezcal agaves. According to the literature on *in vitro* propagation protocols of the main mezcal agaves, two innovations were identified that are currently being applied in propagation: 1) Temporary Immersion Systems and 2) Light Emitting Diodes (LEDs). The main advantages of both techniques are the increase in the multiplication and quality of the plants obtained *in vitro* as well as lowering production costs. This, consequently, ensures a promising future for increasing the propagation of these species. However, despite the implementation of these innovations in *in vitro* cultivation, knowledge about the propagation of mezcal agaves is limited and more research is needed to satisfy the demand of this thriving market through micropropagation.

Résumé

La production de mezcal est l'une des activités économiques les plus importantes dans diverses régions du Mexique. Les espèces d'agave utilisées à cet effet sont de plus en plus exploitées par l'industrie du mezcal, et contrairement à *A. tequilana*, il existe encore peu de plantations commerciales d'espèces de mezcal. Une alternative à cette situation serait la mise en place d'un système de propagation massive pour les agaves mezcalero. Selon la littérature sur les protocoles de propagation *in vitro* des principaux agaves mezcalero, deux innovations actuellement appliquées dans la propagation ont été identifiées: 1) les systèmes d'immersion temporaire et 2) les diodes électroluminescentes (LED). Les principaux avantages des deux techniques sont: l'augmentation de la multiplication et de la qualité des plantes obtenues *in vitro*, en plus de réduire les coûts de production. Assurant ainsi un avenir prometteur dans l'intensification de la propagation de ces espèces. Cependant, malgré la mise en œuvre de ces innovations en culture *in vitro*, les connaissances sur la propagation des agaves mezcal sont limitées et des recherches supplémentaires sont nécessaires pour permettre, grâce à la micropropagation, de satisfaire la demande d'un marché en plein essor.

Alondra Viviana Pérez de León¹
José Humberto Caamal Velázquez^{1*}
Juan Carlos Alamilla Magaña¹
María Asunciona Criollo Chan¹
Cristina Isabel Chanatasig Vaca²
René Garruña Hernández³

Palabras clave: Embriogénesis somática; micropropagación; maguey.
Keywords: Somatic embryogenesis; micropropagation; maguey
Mots-clés: Embryogenèse somatique; micropropagation; maguey.

Correspondencia:
*hcaamal@colpos.mx

¹Colegio de Postgraduados campus Campeche

²Agropecuaria Santa Genoveva S.A.P.I. de C.V.

³Instituto Tecnológico de Conkal

Introducción

El género agave se encuentra distribuido a lo largo del continente americano, más del 75% (aproximadamente más de 150 especies) se encuentra en México, esto se debe a la ubicación geográfica y a las condiciones ambientales; México es considerado el centro de origen de este género (León et al., 2013; Avendaño-Arrazate et al., (2015); Mariles-Flores et al., 2016; Aguilar y Rodríguez 2018).

Los agaves han llegado a ser el soporte económico de algunas regiones del país (Torres, Blancas, León y Casas 2015; González y Núñez 2015; Figueroa et al., 2014; Arzate-Fernández y Mejía-Franco 2011; CONABIO 2008). Las bebidas alcohólicas, artesanías, fibras y medicinas son algunos de los productos que se obtienen de estas plantas. A pesar de la gran importancia de los agaves, son pocos los estudios realizados sobre la propagación masiva, el mejoramiento y la conservación de estas especies. Sobre todo, las que son de vida silvestres, como la mayoría de los agaves mezcaleros.

La mayoría de los estudios se han realizado en especies comerciales destinadas para la producción de tequila y son pocas las investigaciones en especies mezcaleras. No obstante, hay especies de vida silvestre como el *Agave potatorum* que no son cultivadas de manera comercial, pero son sobreexplotadas para la producción de bebidas fermentadas (Delgado-Lemus, Casas y Téllez 2014; Torres et al., 2015). *A. potatorum* no cuenta con protocolos para su propagación masiva, y así muchas otras especies que se encuentran en peligro de extinción; según la NOM-059ECOL-2001 hay 18 especies de agaves severamente amenazadas en México (SEGOB, 2020). Por lo anterior surgió la necesidad de implementar técnicas en la propagación de las especies de agaves. En este sentido el cultivo de tejidos vegetales como herramienta en la biotecnología vegetal ha sido una de las alternativas para la propagación masiva de estas especies (Puente-Garza, Gutiérrez-Mora y García-Lara 2015).

Los sistemas de inmersión temporal (SIT) son una innovación en el escalamiento de la propagación masiva, los SIT ayudan a reducir los costos de mano de obra y medios de cultivo, aumentan la tasa de multiplicación y aclimatación, entre muchas otras ventajas para la propagación de plantas (Alamilla-

Magaña et al., 2019). Por otro lado, la implementación de la iluminación con Diodos Emisores de Luz (LED, por sus siglas en inglés) en el cultivo *in vitro* ha sido exitosa en diferentes especies vegetales y sobre diferentes procesos morfogénicos (Bello-Bello, et al., 2016d; Murillo et al., 2016).

Por todo lo mencionado, este trabajo, tuvo como objetivo analizar el potencial que ofrecen los sistemas de inmersión temporal y el uso de luces tipo LED, sobre la propagación de agaves mezcaleros.

Los Agaves: propagación y amenazas

La propagación de los agaves en campo puede darse de tres vías diferentes, y dependerá del tipo de especie (ver la Tabla 1) (CONABIO 2006).

1) **Propagación por semillas:** Las semillas, son producto de la fecundación de los óvulos, esto se da cuando la planta produce un tallo floral y las flores funcionan como hembra y macho a la vez; primero funciona como macho y produce polen y después de unos días se comporta como hembra al recibir el polen y de esta manera se da la fertilización de los óvulos para luego generar nuevas plantas en donde heredan los genes de la planta madre y los genes de la planta de la que proviene el polen.

2) **Propagación por hijuelos:** Los hijuelos brotan a partir de las raíces o tallos subterráneos de la planta madre, estos hijuelos emergen antes de que la planta madre florezca, es decir las plantas producen hijuelos a lo largo de su vida antes de llegar a la floración, esta es una de las maneras más eficientes de propagación de manera natural.

Tabla 1. Especies mezcaleras y su propagación.

Especie	Propagación	Tipo de mezcal
<i>Agave angustifolia</i>	Hijuelos y bulbilos	Bacanora
<i>A. potatorum</i>	Semillas	Mezcal
<i>A. salmiana</i>	Semillas e hijuelos	Pulque
<i>A. maximiliana</i>	Semillas	Raicilla
<i>A. durangensis</i>	Semillas e hijuelos	Pulque y mezcal
<i>A. inaequidensis</i>	Semillas	Aguamiel, pulque y raicilla
<i>A. curpreata</i>	Semillas	Mezcal
<i>A. americana</i>	Semillas e hijuelos	Mezcal
<i>A. americana var. Oaxacensis</i>	Semillas e hijuelos	Pulque
<i>A. karwinski</i>	Semillas, hijuelos y bulbilos	Mezcal
<i>A. tequilana</i>	Hijuelos	Tequila

Fuente: Información obtenida de CONABIO 2006.

3) **Propagación por bulbilos:** Los bulbilos (comúnmente conocidos como quiote), se desarrollan en las yemas que dejan las flores que se secan sin haber generado frutos.

La propagación natural presenta dos dificultades, 1) baja reproducibilidad por bulbilos o hijuelos y 2) el porcentaje en la germinación de semillas es muy baja (Domínguez-Rosales et al., 2008e; Arzate-Fernández et al., 2016).

Por otra parte, las actividades antropogénicas son la principal amenaza que se presenta en la propagación de estas especies, sobre todo cuando los productores cortan las plantas antes de llegar a su floración para aprovechar el azúcar de la piña y las hojas, provocando de esta manera que no se generen semillas, bulbilos o hijuelos.

Las especies mezcaleras más utilizadas son *A. angustifolia* (Espadín) y *A. potatorum* (Tobalá), la primera se debe a que es la especie con el mayor volumen de producción y el segundo es porque genera un mezcal de alta demanda. Para ambas especies su manera de reproducción natural está limitada, es por ello que a pesar del potencial que presentan los agaves, los productores están conscientes de que se enfrentan a un gran problema, ya que no hay suficiente

material vegetal para procesar (Aureoles-Rodríguez et al., 2008).

La biotecnología en la propagación de agaves mezcaleros

La alta demanda de los productos obtenidos de los agaves pone en peligro de extinción a las poblaciones silvestres (López et al., 2018). Se debe considerar que la propagación convencional no es una alternativa eficiente para el escalamiento de plantas, y por lo consiguiente, no satisfacen la alta demanda que existe. En este sentido, la micropropagación *in vitro* es una herramienta de la biotecnología que ha tomado el papel más importante para propagar masivamente especies de plantas (Puente-Garza et al., 2015).

La micropropagación está basada en la propagación asexual de plantas, en la que se toman segmentos de una planta madre (hoja, tallo, semillas, raíces ápices, meristemas, etc.) para luego seguir dos vías de propagación, embriogénesis u organogénesis (directa e indirecta) y el resultado de esto es la regeneración de nuevos brotes, que dan paso a la obtención de plantas genéticamente idénticas (Espinosa-Leal et al., 2018). En agaves mezcaleros se han reportado algunos casos de éxito utilizando técnicas de cultivo *in vitro* (ver la Tabla 2).

Tabla 2. Resultados más destacados y tiempo de obtención de brotes en estudios de cultivo *in vitro* en agaves mezcaleros

Especie	Método aplicado	Tiempo de obtención	Resultados más destacados	Autor y año
Propagación <i>in vitro</i> del 'Maguey bruto' (<i>Agave inaequidens</i> Koch), una especie amenazada de interés económico.	Organogénesis directa	6 meses	Las secciones de tallo formaron hasta 72 brotes, la concentración 3.0 mg·litro ⁻¹ de BA incrementó la altura de brotes y la formación de nuevas hojas. Los reguladores BA, Kin y Zip en las concentraciones de 3 y 10 mg·litro ⁻¹ generaron una mayor altura de la planta, mayor número de hojas y brotes nuevos además hubo presencia de estructuras globulares y raíces.	Aureoles-Rodríguez et al., (2008).
Efecto de citocininas en la propagación <i>in vitro</i> de agaves mexicanos.	Organogénesis directa	5 meses	Sus resultados indicaron que en <i>A. cupreata</i> y <i>A. karwinskii</i> se obtuvieron 10.5 y 6.1 brotes por explante con 1.5 y 1 mg L ⁻¹ de BA. En <i>A. difformis</i> y <i>A. obscura</i> las mejores respuestas se obtuvieron con 0.2 mg L ⁻¹ TDZ dando 8.5 y 11 brotes por explante. En <i>A. potatorum</i> se produjeron 6.9 brotes por explante con 3 mgL ⁻¹ Kin.	Domínguez Rosales et al., (2008e).
Capacidad embriogénica de callos inducidos en ejes embrionarios cigóticos de <i>Agave angustifolia</i> Haw.	Organogénesis indirecta	6 meses	Obtuvieron la formación de callos embriogénicos en aquellos que fueron inducidos en el medio MS-25 adicionado con 3.0 mg L ⁻¹ de 2,4-D y 1.0 mg L ⁻¹ de BA, en condiciones de oscuridad. Se logró la germinación de todos los embriones somáticos en el medio MS-50 sin reguladores de crecimiento vegetal, y se dio la regeneración plantas completas de <i>A. angustifolia</i> .	Arzate-Fernández y Mejía-Franco., (2011).
Micropropagation de <i>Agave americana</i> .	Organogénesis directa	6 meses	Obtuvieron 18.5 brotes por explante provenientes de tallos en la concentración de 13.32 μM de BA. Obtuvieron la formación de brotes advérticos a partir de segmentos foliares en la combinación de hormonas de 2.68 μM ANA más 13.32 μM BA. También se dio la frecuencia de enraizamiento más alta en las concentraciones de hormonas: 4.92 μM de AIB y 1.48 μM mas 1.61 μM de ANA.	Ying Chen et al., (2014).
Regeneration of Agave (<i>Agave angustifolia</i> Haw.) from encapsulated somatic embryos.	Organogénesis indirecta	7.5 meses	Se dio el 100% de germinación de las semillas sintéticas y sobrevivencia de las plántulas en ambos casos, estas semillas procedieron de los embriones somáticos encapsulados con 3% de la matriz de alginato de sodio disuelta en el medio MS a 100% y suplementado con 4.4 μmol de BAP, con 15 0 30 minutos en cloruro de calcio.	Arzate- Fernández et al., (2016).
Organogénesis <i>in vitro</i> en tejidos de tallo de <i>Agave marmorata</i> y <i>Agave angustifolia</i> .	Organogénesis directa	3 meses	Se obtuvieron 586 explantes de tejidos de tallo a partir de 20 plantas de <i>A. angustifolia</i> , en el que 202 plantas estaban asépticos, viables, con pigmentación verde e inicios de respuesta de organogénesis y para <i>A. marmorata</i> se obtuvieron 228 explantes de tejido de tallo a partir de 15 plantas, de los 228, 65 resultaron asépticos, viables con pigmentación verde e inicios de respuesta de organogénesis.	Aguilar et al., (2018 a).
Obtención de brotes in vitro en <i>Agave potatorum</i> Zucc.	Organogénesis directa	-----	En sus resultados demuestran que los mejores tratamientos para la generación de brotes fueron BA 10 mg L ⁻¹ y AIA con 0.3 mg L ⁻¹ con 14.5 ± 2 brotes por explante.	Aguilar et al., (2018 a).

Innovaciones en la micropropagación de agaves mezcaleros

Con el paso del tiempo, la ciencia ha trascendido en diversas áreas, siempre en la búsqueda de alternativas que hagan más eficientes los procesos de producción. En este sentido los laboratorios de micropropagación incrementan la multiplicación de plantas a escalas comerciales y disminuyen costos de producción con el uso de los SIT y luces tipo LED.

Sistemas de Inmersión Temporal (SIT) en agaves

Los SIT son sistemas semiautomatizados que utilizan medios de cultivos líquidos que permiten la inmersión de las plantas en ciclos alternos y de esta manera aprovechan mejor los nutrientes disponibles en el medio de cultivo, su principal ventaja es que es un sistema desarrollado que simplifica el proceso de micropropagación, reduce los costos de producción y aumenta el número de especies vegetales a escala comercial (Pramita et al 2018; Kunakhonnuruk et al., 2019).

Se han reportado una serie de SIT, que se basan en los diseños originales tales como: RITA® (Recipiente para Inmersión Temporal) de Teisson y Alvard, BIT® (Biorreactor de Inmersión Temporal) de Escalona et al., (1999) y BIOMINT® de Robert et al., (2006), y dentro de los modelos existentes basados en los diseños originales se encuentran: MATIS®, SETIS®, PLANTIMA® y ORBITABIÓN®, (Orellano, Dellagiovanna, Imanishi, Mazzone y Faedo 2016); así mismo existen prototipos que aún no han sido registrados o se encuentran en el proceso, como los Biorreactores de Inmersión por gravedad (BIG), PLANTFORM, entre otros (ver la Figura 1).

El uso de SIT se implementa cada vez más en diversos laboratorios de cultivo *in vitro* para la propagación de agaves. Flores-Solares y Muñoz-Palenius (2017), establecieron explantes *in vitro* de *Agave durangensis*; utilizaron MS (Murashigue y Skoog, 1962) al 50%, suplementado con 3 mg/L de Ácido Indol Butírico (IBA por sus siglas en inglés) y 10 mg/L de cinetina (KIN por sus siglas en inglés), el SIT utilizado fue del tipo frascos gemelos modificados, las inmersiones fueron 1 minuto cada 72 horas. Obtuvieron 3.33 brotes por explante en un tiempo de 4 semanas.

En otro estudio realizado por Liberato-Portillo y Santacruz-Ruvalcaba (2006) evaluaron la factibilidad de un SIT (Orbitabiión®) para la micropropagación vía embriogénesis somática de *Agave tequilana*, uti-

lizando medio MS (Murashige y Skoog 1962) líquido, suplementado con vitaminas de Phillips y Collins 1979 y hormonas de crecimiento: 2 mg L⁻¹ de ácido 2,4-diclorofenoxiacético(2.4D) y 0.3 mg L⁻¹ de 6-bencilaminopurina (BAP) con inmersiones de 1 minuto cada 24 y 48 h y en continuo; reportan haber logrado la maduración del 80 % de los embrioides, sin embargo, reportan haber tenido problemas hiperhibrididad, por lo que recomiendan establecer nuevos tiempos de inmersión.

González y Núñez en el (2015) utilizaron un SIT del tipo frascos gemelos, en *Agave durangensis* utilizando un medio MS (Murashige y Skoog 1962), suplementado con 0.3 mg/L de IBA y 3 mg/L de Kinetina, con inmersiones de 1 minuto cada 24 horas, obteniendo 4.33 brotes por explante.

Morales y Núñez (2015) utilizaron un SIT de tipo de frascos gemelos en *Agave tequilana* Weber variedad azul utilizando un medio MS suplementado con: 0.053 y 0.525 mg/L de IBA y 0.525 y 1.050 2iP (2-isopentenil-adenina) respectivamente, con una inmersión de 1 minuto por día, en sus resultados obtuvieron 1.67 brotes por explante en un periodo de 4 semanas.

La utilización de los SIT es ideal para la propagación a escala comercial de especies vegetales, no obstante, su éxito radica principalmente en el tiempo y la frecuencia de inmersión a los que son sometidos los explantes (Orellano et al., 2016).

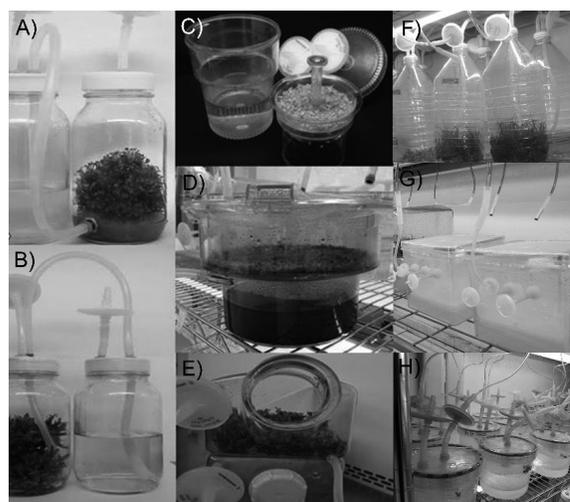


Figura 1. Sistemas de Inmersión Temporal (SIT). A) de tipo frascos gemelos, B) Biorreactor de Inmersión por gravedad (BIG); C) Recipiente de Inmersión Temporal Automatizada (RITA); D) MATIS; E) SETIS; F) Modificación del SIT de tipo frascos gemelos; G) Plantfoam y H) Versión modificada del RITA.

A pesar de los estudios antes descritos, es necesario realizar más investigaciones con el fin de mejorar los sistemas de producción, establecer protocolos funcionales para cada una de las especies requeridas, pero sobre todo trabajar en la trazabilidad de los protocolos descritos para alcanzar una propagación de escala comercial y mejorar la calidad de plántulas *in vitro* de agaves mezcaleros.

Luces tipo LED en la micropropagación de plantas

La luz es un factor importante en el desarrollo de las plantas, por lo que su presencia en un laboratorio de micropropagación es de suma importancia. Los LED se han tomado como una nueva alternativa en los laboratorios de micropropagación, sustituyendo a las lámparas fluorescentes.

Algunos estudios indican que los LED presentan grandes ventajas frente a la luz fluorescente, generan menos radiación de calor, son de espectro monocromático, de mayor durabilidad, bajo consumo de energía y lo más importante es que proporcionan luz en diversas regiones espectrales, aumentando la fotosíntesis y el desarrollo de las plantas, (Martínez-Estrada et al., 2016; Bello-Bello et al., 2017c).

Al utilizar diferentes colores de LED se observan efectos positivos sobre el desarrollo morfológico de las plantas *in vitro*, mayor desarrollo de embriones somáticos, incremento en el número de brotes, promoción en el desarrollo de raíces, estimulación en la síntesis de pigmentos fotosintéticos, y plántulas de mayor calidad (Botero y López (2015); Martínez-

Estrada (2016); Murillo-Talavera et al., (2016); Chen et al., (2016); Ramírez-Mosqueda et al., 2017).

En un estudio realizado por Martínez-Estrada et al., (2016) utilizaron diferentes espectros de luz visible con luces tipo LED, y reportaron un incremento en la tasa de multiplicación y en la calidad de los explantes (ver la Figura 2).

En un estudio que realizamos en el Laboratorio del Colegio de Postgraduados campus Campeche en el 2018, evaluamos el efecto de los LED en la micropropagación de 3 especies de interés comercial (*Agave tequilana*, *Saintpaulia ionantha* y *Spathiphyllum wallisii* variedad Sensación). Los resultados obtenidos concuerdan con lo reportado por varios autores acerca de los efectos positivos que los LED tienen sobre el desarrollo de las plantas *in vitro*; solo el cambio de iluminación fluorescente con iluminación LED blanco mejoró la tasa de multiplicación y la calidad de los explantes.

En *A. Tequilana*, el efecto de los LED más relevante fue la inducción de callos embriogénicos (ver la Figura 3), utilizando la combinación LED rojo + azul (50% respectivamente); las plántulas inicialmente presentaron clorosis y posteriormente presentaron callos embriogénicos en la parte meristemática, que a su vez dio paso a la formación de algunos embriones somáticos. De esta manera concluimos que se presenta una oportunidad de generar embriogénesis somática solamente con el uso de iluminación LED, proceso muy complejo de generar en los agaves.

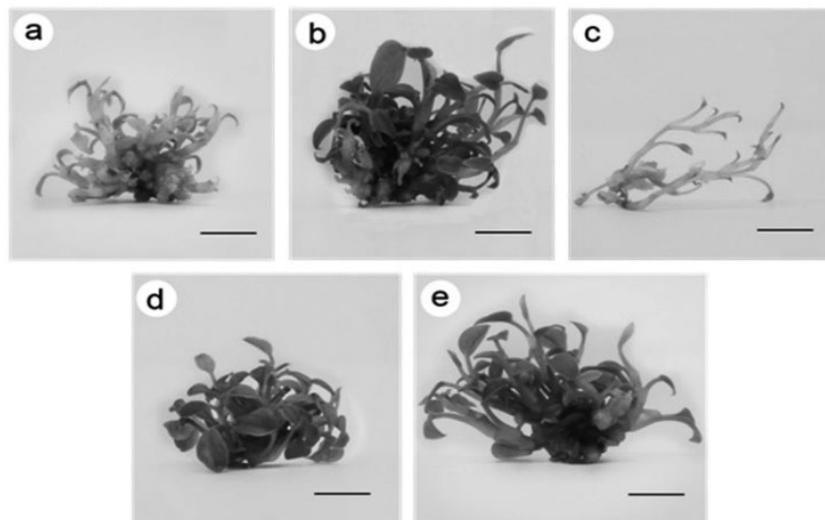


Figura 2. Efecto de la Iluminación LED sobre la multiplicación de *Anthurium andreaeanum* "Rosa" después de 60 días de cultivo. a) Lámpara fluorescente, b) LED Blanco, c) LED Rojo, d) LED azul y e) LED rojo + azul en un 50% c/u. FUENTE: Tomado de Martínez-Estrada et al., 2016.

En los resultados anteriores podemos hacer énfasis, que la iluminación LED puede tener un papel importante en el desarrollo de nuevos protocolos de propagación de agaves mezcaleros y sobre todo mejorando los procesos sin utilizar hormonas vegetales inductoras de embriogénesis somática.

Conclusiones

La información sobre la multiplicación *in vitro* de agaves mezcaleros es limitada, esto evita que se pueda incrementar la eficiencia de los procesos de propagación y poder proporcionar plantas suficientes para la industria del mezcal, el desarrollo de protocolos de propagación eficientes es requerido para evitar la sobre explotación de especies de interés económico. Se lograron identificar 2 tecnologías que están siendo aplicadas en la micropropagación de agaves (SIT y LED) en el que los SIT son los que han sido más aplicados para propagar agaves con resultados estadísticamente iguales a los sistemas convencionales. De la misma manera, es importante realizar más estudios para propagar agaves mezcaleros empleando SIT e iluminación LED, tanto por separado como en combinación; la combinación de estas innovaciones puede ser la repuesta para poder escalar la micropropagación de agaves mezcaleros, proporcionando una mejor calidad y mayor eficiencia, sobre todo a menores costos de producción.

Agradecimientos

Se agradece al Dr. Jericó Bello Bello, del Laboratorio de cultivo de Tejidos Vegetales del Colegio de Postgraduados campus Córdoba, por haber donado las imágenes de los Sistemas de Inmersión Temporal.

Bibliografía

- Aguilar, D., Rodríguez, J. y Herrera, H. (2018a). Obtención de brotes *in vitro* en *Agave potatorum* Zucc. *Universo de la Tecnología*. 2(29), 5-7.
- Aguilar, D. y Rodríguez, L. (2018b). Micropropagación y aclimatación de Maguey Pitzometl (*Agave marmorata* Roezl) en la Mixteca poblana. *Colomb. Biotec.* 20(2), 124-131.
- Alamilla-Magaña, J., Caamal-Velázquez, J., Criollo-Chan, M., Vera-López, J. y Reyes-Montero, J. (2019). Biofábricas y biorreactores de inmersión temporal: Propagación *in vitro* de *Anthurium andreaeanum* L., y su viabilidad económica. *Agroproductividad*. 12(10), 23-29.
- Arzate-Fernández, A., y Mejía-Franco, R. (2011). Capacidad embriogénica de callos inducidos en ejes embrionarios cigóticos de *Agave angustifolia* Haw. *Fitotecnía mexicana*. 34(2), 101-106.
- Arzate-Fernández, A., Piña-Escutia, J., Norman-Mondragón, T., Reyes-Díaz, J., Guevara-Suárez, K. y Vázquez-García, L. (2016). Regeneración de Agave mezcalero (*Agave angustifolia* Haw.) A partir de embriones somáticos encapsulados. *Fitotec. Mex.* 39(4), 359-366.
- Aureoles-Rodríguez, F., Rodríguez-de la O, J., Legaria-Solano, J., Sahagún-Castellanos, J., y Peña-Ortega, M. (2008). Propagación *in vitro* del Maguey bruto (*Agave inaequalis* Koch), una especie amenazada de interés económico. *Chapingo, Serie horticultura*. 14(3), 263-269.

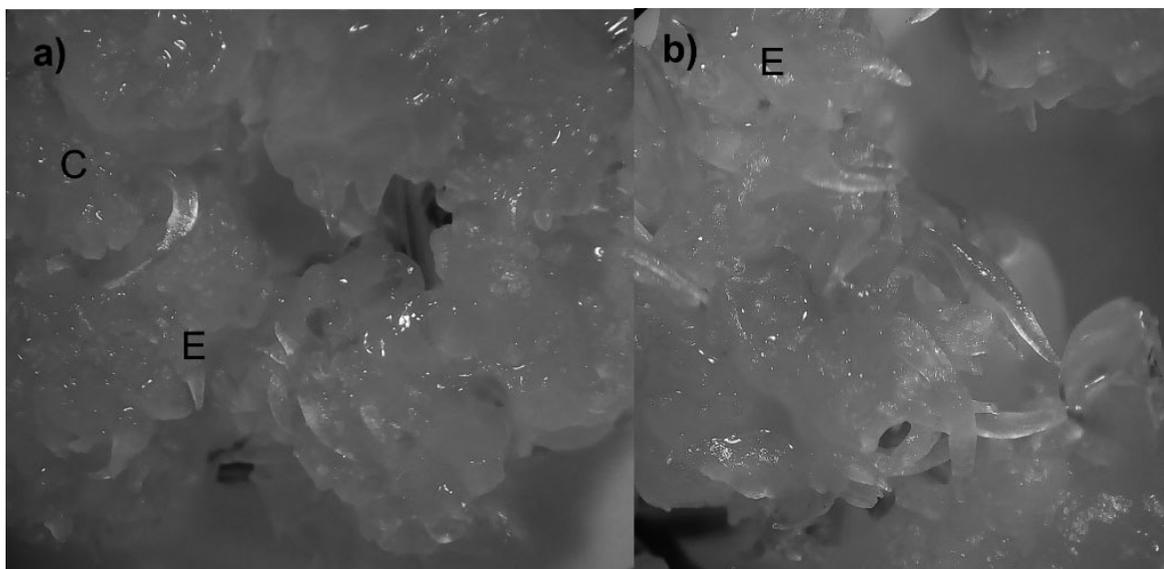


Figura 3. Proceso de des diferenciación hacia la formación de embriones somáticos de *Agave tequilana*, sembradas en medio MS suplementado con 3% de sacarosa, 10 mg/l de Benziaminopurina y 3 mg/l de gellan gum. a) Callos embriogénicos, se incubaron en luz LED rojo + azul en un 50 %, por 12 semanas. b) Regeneración de embriones somáticos, incubados en luz blanca por 8 semanas, C, Callo embriogénico; E, Embrión somático. Fuente: propia.

- Avenidaño-Arazate, C., Iracheta-Donjuan, L., Godínez-Aguilar J., López-Gómez, P. y Barrios-Ayala, A. (2015). Caracterización morfológica de *Agave cupreata*, especie endémica de México. *QUITON*. 84, 184-162.
- Bello-Bello, J., Pérez-Sato, J., Cruz-Cruz, C., Martínez-Estrada, E. (2017c). Light-Emitting Diodes: Progress in Plant Micropropagation. *CLOROPHYL*. Rijeka Croatia: InTech.
- Bello-Bello, J., Martínez-Estrada, E., Caamal, H. y Morales, V. (2016d). Effect of LED light quality on *in vitro* shoot proliferation and growth of vanilla (*Vanilla planifolia* Andrews). *African Journal of Biotechnology*. 15, 272-277.
- Botero, L. y López, J. (2015). Efecto de diferentes longitudes de onda procedentes de luces LED sobre el crecimiento y morfogénesis de la especie recalcitrante *Peltogyne purpurea* Pittier bajo condiciones de cultivo *in vitro*. *XVI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería*. Guadalajara Jalisco México.
- Chen, C., Agrawal, D., Lee, M., Lee, R., Kuo, C., Wu, C., Tsay, H. y Chang, H. (2016). Influence of LED light spectra on *in vitro* somatic embryogenesis and LC-MS analysis of chlorogenic acid and rutin in *Peucedanum japonicum* Thunb a medicinal herb. *Botanical studies*. 57(9).1-8.
- CONABIO. (2006). *Mezcales y diversidad*. 2a ed. Consejo Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México.
- CONABIO. (2008). Reseña de “Mezcales y diversidad”. *Ciencias*. 1(91). 74.
- Delgado-Lemus, A., Casas, A. y Téllez, O. (2014). Distribution abundance and traditional management of *Agave potatorum*. In the Tehuacán Valley Mexico: bases for sustainable use of non-timber forest products. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*. 10(63), 1-12.
- Domínguez-Rosales, M., González, M., Rosales, C., Quiñones, C., Díaz, S., Mireles, S. y Molphe, E. (2008e). El cultivo *in vitro* como herramienta para el aprovechamiento, mejoramiento y conservación de especies del género *Agave*. *Investigación y Ciencia*. 16(41), 53-62.
- Domínguez-Rosales, M.; Alpuche-Solís, Á.; Vasco-Méndez, N.; Pérez-Molphe, B. (2008f). Efecto de citocininas en la propagación *in vitro* de agaves mexicanos. *Fitotecnia Mexicana*. 31(4), 317-322.
- Escalona, M., Lorenzo, J., González, B., Daquinta, M., González, J., Desjardins, Y. y Borroto, C. (1999). Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) micropropagation in temporary immersion systems. *Plant Cell Reports*. 18 (9), 743-748.
- Espinosa-Leal, C., Puente-Garza, C. y García-Lara. (2018). *In vitro* plant tissue culture: means for production of biological active compounds. *Planta*. 248, 1-18.
- Figueredo, C., Casas, A., Colunga-García, M., Nassar, J. y González-Rodríguez, A. (2014) Morphological variation, management and domestication of ‘maguey alto’ (*Agave inaequidens*) and ‘maguey manso’ (*A. hookeri*) in Michoacán. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*. 10(66), 2-12.
- Flores, N. y Muñoz, H. (2017). Micropropagación de *Agave durangensis* en un sistema de inmersión temporal (SIT). *Jóvenes en la ciencia*. 3(2), 107-111.
- González, B. y Núñez, H., (2015) Micropropagación de *Agave durangensis* en un Sistema de Inmersión Temporal (SIT). *Jóvenes en la ciencia*. 1(2), 8-13.
- Kunakhonnuruk, B., Inthima, P. y Kongbangkerd, A. (2019). *In vitro* propagation of Rheophytic Orchid, *Epipactis Flava Seidenf*. A comparison of semi-solid, Continuous Immersion and Temporary Immersion Systems. *Biology*. 8(4), 2-8.
- López, L., Merino, Y., Enríquez, J., Rodríguez, G. y Lagunas, Z. (2018). Organogénesis *in vitro* en tejidos de tallo de *Agave marmorata* y *Agave angustifolia*. *Revista Mexicana de Agroecosistemas*. 5(2), 98-105.
- Liberato-Portillo y Santacruz-Ruvalcaba (2006). Factibilidad de uso de un nuevo sistema de inmersión temporal (orbitación®1) para embriogénesis somática de *Agave tequilana* weber cultivar azul. *Bol. Nakari*. 17(2), 43-48.
- León, N., Campos, G., Enríquez-del Valle, J., Velasco, V., Marini, F. y Rodríguez, G. (2013). Diversidad de especies de agave en San Miguel Tilquiapam, Ocotlán, Oaxaca. *Rev. Mexicana de Ciencias Agrícolas*. Vol. Especial (6), 1185-1195.
- Martínez-Estrada, E. Caamal-Velázquez, J., Morales-Ramos, V. y Bello-Bello, J. (2016). Light Emitting Diodes improve *in vitro* shoot multiplication and growth of *Anthurium andreaeanum* Lind. *Propagation of Ornamental Plants*. 16(1), 3-8.
- Mariles-Flores, V., Ortiz-Solorio, C., Gutiérrez-Castorena, M., Sánchez-Guzmán, P. y Cano-García, M. (2016). Las clases de Tierras productoras de maguey mezcalero en La Soledad Salinas, Oaxaca. *Rev. Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 7(5), 1199-1210.
- Morales, B. y Núñez, H., (2015). Micropropagación de *Agave tequilana* weber variedad Azul “El Coronel” en un Sistema de Inmersión Temporal (SIT). *Jóvenes en la ciencia*. 1(2), 77-82.
- Murillo, M., Pedraza, M., Gutiérrez, N., Rodríguez, M., Lobit, P. y Martínez, A. (2016). Calidad de luz LED y desarrollo *in vitro* de *Oncidium tigrinum* y *Laelia autumnalis* (ORCHIDACEAE). *Agrociencia*. 8(50), 1065-1080.
- Murashige, T. y Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth an bioassays with tobacco tissue cultures, *Physiol Plant*. 15, 473-497.
- Norma Oficial Mexicana. Protección ambiental-especies nativas de México de flora y fauna silvestres categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión o cambio. Lista de especies en riesgo. NOM-059-Ecol-2001. p. 158-169. México, D. F., 2001.
- Orellano, J., Dellagiovanna, A., Imanishi, L., Mazzone, V. y Faedo, N. (2016). Sistema de Inmersión Temporal: Automatización de Propagación *in vitro* de Plantas Utilizando Herramientas Libres. *25° Congreso Argentino de Control Automático*.

- Pramita, A., Kristanti, A., Sugiharto, Utami, E. y Manuhara, Y. (2018). Production of biomass and flavonoid of *Gynura Procumbens* (Lour.) Merr shoots culture in temporary immersion system. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 16(2), 639-643.
- Puente-Garza, C., Gutiérrez-Mora, A., y García-Lara, S. (2015). Micropropagation of *Agave salmiana*: Means to production of antioxidant and bioactive principles. *Frontiers in plant science*. 6, 1-9.
- Ramírez-Mosqueda, M., Iglesias-Andreu, L. y Luna-Sánchez, I. (2017). Light quality affects growth and development of in vitro plantlet of *Vanilla planifolia* Jacks. *South African Journal of Botany*. 109, 288-293.
- Robert, M., Herrera-Herrera, J., Herrera-Herrera, G., Herrera-Alamillo, M. y Fuentes-Carrillo, P. (2006). A New Temporary Immersion Bioreactor System for Micropropagation. *Methods in Molecular Biology Plant Cell Culture Protocols*. Towota New Jersey. Vol. 318, segunda edición.
- SEGOB (Secretaría de Gobernación). (2020) Diario Oficial de la federación 06/03/2002, segunda sección Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales, Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001, consultado el 29 de junio de 2020 de https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=735036&fecha=06/03/2002.
- Torres, I., Blancas, J., León, A. y Casas, A. (2015). TEK, local perceptions of risk, and diversity of management practices of agave *inaequidens* in Michoacán, México. *Journal of Ethnobiology and ethnomedicine*. 11(61), 2-20.
- Ying, C., Chen, X., Hu, F., Yang, H., Yue, L. Trigiano, R. y Cheng, M. (2014). Micropropagation of *Agave americana*. *HortScience*. 49(3), 320-327.