

**Polibotánica**

ISSN electrónico: 2395-9525

polibotanica@gmail.com

Instituto Politécnico Nacional

México

<http://www.polibotanica.mx>

EFFECTO DE OSMOLITOS, INHIBIDORES Y REGULADORES DEL CRECIMIENTO VEGETAL EN LA CONSERVACIÓN *in vitro* DE TRES ESPECIES DE *Agave* spp.

EFFECT OF OSMOLYTES, INHIBITORS, AND PLANT GROWTH REGULATORS ON THE *in vitro* CONSERVATION OF THREE *Agave* spp. SPECIES

Vega García, J.A., A.M. Arzate Fernández, H. G. García Núñez y J.I. Reyes-Díaz
EFECTO DE OSMOLITOS, INHIBIDORES Y REGULADORES DEL CRECIMIENTO
VEGETAL EN LA CONSERVACIÓN *in vitro* DE TRES ESPECIES DE *Agave* spp.
EFFECT OF OSMOLYTES, INHIBITORS, AND PLANT GROWTH REGULATORS ON
THE *in vitro* CONSERVATION OF THREE *Agave* spp. SPECIES



Efecto de osmolitos, inhibidores y reguladores del crecimiento vegetal en la conservación *in vitro* de tres especies de *Agave* spp.

Effect of osmolytes, inhibitors, and plant growth regulators on the *in vitro* conservation of three *Agave* spp. species

Jesús Antonio Vega García,
Amaury Martín Arzate
Fernández, Hilda G. García
Núñez, Jesús Ignacio Reyes-
Díaz

EFFECTO DE OSMOLITOS,
INHIBIDORES Y
REGULADORES DEL
CRECIMIENTO VEGETAL
EN LA CONSERVACIÓN *in vitro*
DE TRES ESPECIES DE
Agave spp.

EFFECT OF OSMOLYTES,
INHIBITORS, AND PLANT
GROWTH REGULATORS
ON THE *in vitro*
CONSERVATION OF
THREE *Agave* spp. SPECIES

POLIBOTÁNICA

Instituto Politécnico Nacional

Núm. 59: 225-236. Enero 2025

DOI:
10.18387/polibotanica.59.14

Jesús Antonio Vega-García

Amaury Martín Arzate-Fernández: *Autor de correspondencia:*
amaury1963@yahoo.com.mx / <https://orcid.org/0000-0001-8603-0099>

Hilda G. García-Núñez

Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Fitomejoramiento (CIEAF)
Facultad de Ciencias Agrícolas, UAEMéx, Toluca, Estado de México, México

Jesús Ignacio Reyes-Díaz <https://orcid.org/0000-0001-9234-6575>

Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Fitomejoramiento (CIEAF).
Facultad de Ciencias Agrícolas, UAEMéx, Toluca, Estado de México, México
Dirección de Procesos Alimentarios y Química Área Biotecnología
Unidad Académica de Capulhuac, Universidad Tecnológica del Valle de Toluca
Lerma, México

RESUMEN: El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto de diferentes tratamientos para la conservación *in vitro* de tres especies de *agave*: *Agave tequilana*, *A. salmiana* y *A. marmorata*, durante un período de 4 meses. Se adicionó al medio de cultivo MS los osmolitos: Polietilenglicol (PEG) a 10 y 15 g L⁻¹ y Manitol a 40 y 50 g L⁻¹, el inhibidor Paclobutrazol (PBZ) a 1, 3 y 5 mg L⁻¹, y los reguladores del crecimiento vegetal: Ácido Abscísico (ABA) a 1, 3 y 5 mg L⁻¹ y Ácido Salicílico (AS) a 1, 5 y 10 mg L⁻¹. Después de 120 días de cultivo *in vitro*, se evaluaron las variables, como el número y largo de hojas y raíces, el peso de la planta, y la altura total de la planta. También se determinó el porcentaje de supervivencia a los 120 días. Finalmente se realizó una aclimatación en invernadero durante 30 días para evaluar la supervivencia en condiciones *ex vitro*. Después de este periodo, las tres especies de *Agave* mostraron una notable capacidad de adaptación y supervivencia en el invernadero. Los tratamientos con ABA fueron particularmente eficaces, en concentraciones de 1, 3 y 5 mg L⁻¹ para *A. tequilana* y *A. salmiana*, 5 mg L⁻¹ para *A. marmorata*, demostrando ser los más efectivos. Estos tratamientos mostraron una inhibición significativa del crecimiento, y en consecuencia una alternativa para la conservación *in vitro* de las especies estudiadas. Se observó un 100 % de supervivencia para las tres especies de *agave* evaluadas.

Palabras clave: Inhibidores, Reguladores, Osmolitos, Conservación, *Agave*.

ABSTRACT: The objective of this study was to evaluate the effect of different treatments for the *in vitro* conservation of three *agave* species: *Agave tequilana*, *A. salmiana*, and *A. marmorata* over a period of 4 months. Osmolytes were added to the MS culture medium: Polyethylene Glycol (PEG) at 10 and 15 g L⁻¹, and Mannitol at 40 and 50 g L⁻¹; the inhibitor Paclobutrazol (PBZ) at 1, 3, and 5 mg L⁻¹; and plant growth regulators: Absciscic Acid (ABA) at 1, 3, and 5 mg L⁻¹, and Salicylic Acid (SA) at 1, 5, and 10 mg L⁻¹. After 120 days of *in vitro* culture, variables such as the number and length of leaves and roots, plant weight, and total plant height were evaluated. The survival rate was also determined at 120 days. Finally, acclimatization was conducted in a greenhouse over 30 days to assess survival under *ex vitro* conditions. After this period, the three *agave* species demonstrated notable adaptation and survival in the greenhouse. Treatments with ABA were particularly effective at concentrations of 1, 3, and 5 mg L⁻¹ for *A. tequilana* and *A. salmiana*, and 5 mg L⁻¹ for *A. marmorata*, proving to be the most

effective. These treatments showed significant growth inhibition, thus providing an alternative for the *in vitro* conservation of the studied species. A 100% survival rate was observed for all three agave species evaluated.

Key words: Inhibitors, Regulators, Osmolytes, Conservation, *Agave*.

INTRODUCCIÓN

Los agaves, son plantas emblemáticas de México, tienen un papel crucial tanto cultural como económico en el país. Además de su uso tradicional en la producción de tequila y mezcal, los científicos están explorando diversas aplicaciones industriales de estas plantas, con el desafío de asegurar que su explotación no comprometa la sustentabilidad ni el medio ambiente (Nava-Cruz, 2014).

El ciclo de vida de los agaves varía entre 10 y 20 años, después de florecer, la planta muere, lo que hace que su regeneración natural sea lenta y dificultosa. Asimismo, las plantas obtenidas por semilla tienen un desarrollo lento y una baja tasa de éxito en el trasplante por lo que la reproducción asexual mediante hijuelos es considerado el método más empleado para su propagación (Arzate-Fernández A. M.-F., 2011) (Arzate-Fernández, y otros, 2016). Sin embargo, la baja eficiencia de estos métodos resalta la necesidad de alternativas efectivas para la conservación y propagación a gran escala de estas especies.

El cultivo de tejidos vegetales se ha propuesto como una solución viable para la conservación, propagación masiva y mejoramiento genético de especies del género *Agave* (Martínez-Martínez, 2021). Estas estrategias no solo podrían garantizar la preservación de las especies, sino también su uso sostenible a largo plazo (Silva, 2011). Sin embargo, uno de los principales desafíos del mantenimiento prolongado de cultivos *in vitro* es su elevado costo, debido principalmente a la mano de obra, cambio o sustitución frecuente de medios de cultivo y al alto consumo energético necesario para la refrigeración o al uso de materiales como el nitrógeno líquido (Bello-Bello J. J.-G.-A., 2015). Por lo tanto, es crucial desarrollar estrategias de conservación *in vitro* que permitan ralentizar (retardar) el crecimiento de las plantas sin comprometer su viabilidad, posibilitando así el almacenamiento de un gran número de especímenes en espacios reducidos y listos para ser utilizados cuando se requiera (García-Águila, 2007), así como reducir el riesgo de contaminación por manipulación y disminuir los costos asociados a la preparación de medios de cultivo.

En investigaciones previas, se logró establecer un banco de germoplasma *in vitro* de varias especies de *Agave* bajo condiciones de crecimiento retardado, utilizando osmolitos como manitol y sorbitol, que reducen la absorción de agua sin afectar la viabilidad de las plantas (Pérez-Molphe, 2012). La ralentización del crecimiento celular inducida por agentes osmóticos como el manitol y el polietilenglicol (PEG) ha sido documentada en otros cultivos como papaya (Acosta-Pérez, 2005), malanga (Rayas-Cabrera, 2013) y caña de azúcar (Bello-Bello J. J.-P.-A.-V.-S., 2014), donde estos compuestos aumentan el gradiente de concentración del medio, reduciendo el potencial osmótico de la planta y dificultando la absorción de agua y nutrientes.

Por otra parte, se ha investigado el uso de inhibidores de las giberelinas, como el paclobutrazol (PBZ), en plantas como caña de azúcar, orquídeas y agaves. Estos inhibidores bloquean la enzima ent-kaureno oxidasa, responsable de la biosíntesis de giberelinas, lo que resulta en un crecimiento más lento (Spinoso-Castillo, Pérez-Sato, & Schettino-Salomón, 2022).

Por otro lado, reguladores del crecimiento vegetal (RCV) como el ácido salicílico (AS) han demostrado inducir resistencia en frutos como el mango (Quiróz-López, 2021). Sin embargo, en *Agave*, aunque bajas concentraciones de ácido salicílico pueden ser beneficiosas, por el contrario concentraciones elevadas pueden causar inhibición del crecimiento (Roque-Otero, 2023). El ácido abscísico (ABA), es una fitohormona derivada de los carotenoides, juega un papel clave en la regulación de la dormancia de las semillas, inhibición de la germinación y promoción de la senescencia. Aunque su uso en altos niveles puede afectar negativamente el desarrollo vegetal, el ABA también regula el cierre estomático, lo que ayuda a reducir la transpiración (Alcántara-Cortés, 2019). Su efecto inhibitorio en el crecimiento ha sido comprobado en cultivos como camote, yuca, caña de azúcar y papa (Espinosa-Reyes, 2002) (Barrueto, 2008) (Bello-Bello J. J.-P.-A.-V.-S., 2014) (Páez de Cásares, 2016).

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de dos osmolitos, dos reguladores y un inhibidor del crecimiento vegetal en la conservación *in vitro* de tres especies de *Agave*, con el fin de desacelerar su metabolismo y prolongar los intervalos entre transferencias para su propagación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de explantes a partir de semillas

Se utilizaron semillas de *Agave tequilana*, *A. salmiana* y *A. marmorata*, proporcionadas por el Laboratorio de Biología Molecular Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la UAEMéx. Las semillas fueron desinfectadas siguiendo el protocolo descrito por (Aguilar-Rito, 2023). Posteriormente, se establecieron en un medio MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementado con 30 g L⁻¹ de sacarosa, carbón activado (0.5 g L⁻¹) y gelificado con agar (3 g L⁻¹), ajustado a un pH de 5.7 ± 0.2. Después de 60 días de germinación, se seleccionó la zona meristemática de las plántulas, que se diseccionó en explantes de aproximadamente 2 cm de longitud, remanentes de raíz y hojas fueron eliminados.

Evaluación de tratamientos de ralentización

Los explantes (incluida la zona meristemática) fueron incubados en frascos de vidrio con 20 ml de medio MS suplementado con 30 g L⁻¹ de sacarosa y 3 g L⁻¹ de agar, en condiciones controladas de 25 ± 2 °C, con luz indirecta (33 µmol m⁻² s⁻¹) incubadas en un fotoperiodo de 18/16 h, durante 120 días. Se evaluaron los siguientes tratamientos: a) Osmolitos, Manitol a 40 y 50 g L⁻¹ (Materiales y Abastos Especializados, S.A. de C.V.) y Polietilenglicol 6000 (PEG) a 10 y 15 g L⁻¹ (Aldrich Chemistry); b) Inhibidores de crecimiento, Paclobutrazol (PBZ) a 1, 3 y 5 mg L⁻¹ (Sichuan Runer Technology Co., Ltd.) y c) Reguladores del crecimiento vegetal (RCV), Ácido salicílico (AS) a 1, 5 y 10 mg L⁻¹, y Ácido abscísico (ABA) a 1, 3 y 5 mg L⁻¹ (Sigma Life Science). Después de 120 días, se midieron las siguientes variables: longitud y cantidad de raíces y hojas, altura total y peso de las plantas. El porcentaje de supervivencia se calculó dividiendo el número de plantas que sobrevivieron entre el número total de plantas cultivadas *in vitro*.

Aclimatación en invernadero

Después de 4 meses de ralentización, y una vez medidas las variables, las plántulas obtenidas fueron transferidas a espumas fenólicas dentro de microtúneles en invernadero, con una temperatura controlada entre 28 ± 2 °C y una humedad relativa del 60 al 80%. Se analizó el porcentaje de supervivencia de las plántulas en estas condiciones (se dividió del total de las plantas obtenidas después de germinadas las semillas, entre el total de las plantas que sobrevivieron después de 30 días en aclimatación).

Análisis estadístico

Se utilizó un diseño completamente aleatorio, con 14 tratamientos, cada tratamiento consistió en un frasco con cinco explantes en su interior, se realizaron cinco repeticiones de cada tratamiento. El análisis de varianza (ANOVA) se realizó utilizando el paquete estadístico Infostat, seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Tukey con un nivel de significancia de 0.05.

RESULTADOS

Ralentización *in vitro***Tabla 1.** Efecto de osmolitos, inhibidores y reguladores del crecimiento vegetal en la ralentización *in vitro* de *A. tequilana*.**Table 1.** Effect of osmolytes, inhibitors, and plant growth regulators on the *in vitro* ralentization of *A. tequilana*.

Tratamiento	Dosis (mg L ⁻¹)	Sv (%)	Peso total de planta (g)	Altura de planta (cm)	Número de Hojas	Número de raíces	Largo de hojas (cm)	Largo de raíces (cm)
Testigo	MS	100	1.82 A	8.60 AB	3.00 ABCD	6.60 ABC	17.00 AB	10.20 AB
ABA	1	100	0.16 D	3.40 C	1.60 BCD	1.80 BC	3.70 CD	1.40 B
	3	100	0.10 D	2.40 C	1.40 CD	1.60 C	2.90 CD	0.7 B
	5	100	0.06 D	1.60 C	1.20 D	1.20 C	2.00 D	0.32 B
PBZ	1	100	0.98 B	9.80 A	2.60 ABCD	1.40 C	18.80 A	7.80 AB
	3	100	0.84 BC	2.40 C	2.80 ABCD	1.80 BC	12.60 ABCD	8.40 AB
	5	100	0.58 BCD	2.40 C	3.60 ABC	6.60 A	4.60 CD	10.80 AB
AS	1	100	1.02 B	4.80 ABC	3.80 AB	5.80 AB	14.40 ABC	13.00 A
	5	100	0.34 CD	5.00 ABC	2.80 ABCD	1.40 C	10.00 ABCD	4.40 AB
	10	100	0.28 CD	3.40 C	4.80 A	5.20 ABC	5.20 BCD	5.40 AB
PEG	10000	90	0.48 BCD	4.60 BC	1.40 CD	1.40 C	3.80 CD	1.00 B
	15000	80	0.22 D	2.80 C	1.40 CD	1.20 C	3.20 CD	1.80 B
MANITOL	40000	100	0.28 CD	3.60 CD	2.20 BCD	1.80 BC	4.20 CD	3.60 AB
	50000	100	0.05 D	4.60 BC	1.80 BCD	1.20 C	8.40 ABCD	4.40 AB

MS: Medio MS, Sv: Supervivencia. Los valores representan la media aritmética después de 120 días de tratamiento. Medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($p > 0.05$).
 MS: Medium MS. Sv: Survival. The values represent the arithmetic mean after 120 days of treatment. Means with the same letter are not significantly different ($p > 0.05$).

Los resultados de la ralentización *in vitro* de las tres especies de *Agave* se obtuvieron después de 120 días de cultivo (Tabla 1). Los mejores resultados sobre la ralentización del crecimiento durante el proceso de conservación se observaron utilizando ácido abscísico (ABA). En la Figura 1 se observa el nivel de respuesta de las plantas cultivadas en medio suplementado con ABA y los testigos cultivados en medio MS, al cabo de 120 días después de iniciado el cultivo. Se observa una marcada diferencia en el desarrollo y viabilidad de las plantas tratadas con ABA en comparación con los testigos ya que su desarrollo fue notablemente menor.

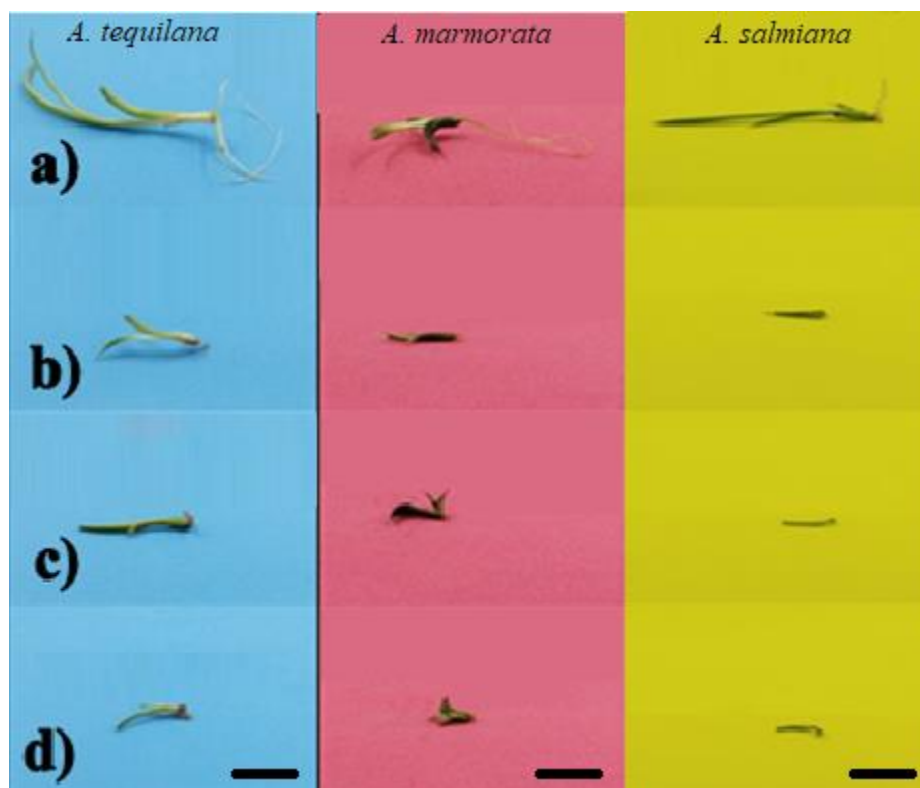


Figura 1. Nivel de desarrollo de plantas de agave cultivadas *in vitro* en medio suplementado con ABA y sin RCV a los 120 días.

Figure 1. Developmental stage of agave plants cultivated *in vitro* in medium supplemented with ABA and without PGR at 120 days.

a) Testigos, b) ABA 1 mg L⁻¹, c) ABA 3 mg L⁻¹, d) ABA 5 mg L⁻¹. Barra mide 2 cm.

a) Controls, b) ABA 1 mg L⁻¹, c) ABA 3 mg L⁻¹, d) ABA 5 mg L⁻¹. Scale bar represents 2 cm.

Efecto de los tratamientos en *Agave tequilana*

Los resultados para *Agave tequilana* mostraron una supervivencia del 100% en todos los tratamientos, excepto en los sometidos a PEG a concentraciones de 10 y 15 g L⁻¹, donde las tasas de supervivencia fueron ligeramente menores, alcanzando el 90% y 80%, respectivamente. Los tratamientos con ABA a 3 y 5 mg L⁻¹, PEG a 15 g L⁻¹ y Manitol a 50 g L⁻¹ mostraron una reducción significativa en el peso total de las plantas, con valores desde 0.06 a 0.22 g en comparación con 1.82 g del testigo (Tabla 1).

En términos de altura de la planta, los tratamientos que tuvieron mayor reducción fueron con ABA a 1, 3 y 5 mg L⁻¹, PBZ a 2 y 5 mg L⁻¹ y PEG a 15 g L⁻¹, con valores significativamente menores en comparación con el testigo, indicando un efecto inhibitorio del crecimiento vertical. El tratamiento que tuvo menor número de hojas (1.2) fue con ABA a 5 mg L⁻¹, en comparación con los testigos (3.0).

Los resultados en los que se observó el menor número de raíces (1.2) fueron ABA con 5 mg L⁻¹, PEG con 15 g L⁻¹ y Manitol a 50 g L⁻¹, así mismo el menor crecimiento de las hojas (2 cm) se encontró en el tratamiento de ABA con 5 mg L⁻¹, en cuanto al largo de las raíces se observó un crecimiento igual o menor a 1 cm para aquellos tratamientos de ABA con 3 y 5 mg L⁻¹ y de PEG con 10 g L⁻¹.

Efecto de los tratamientos en *Agave marmorata*

En *A. marmorata*, todos los tratamientos lograron un 100% de supervivencia. En cuanto al peso total de planta, los tratamientos con biomasa menor a 0.1 g fueron con ABA a 3 y 5 mg L⁻¹, con PEG a 15 g L⁻¹ y Manitol a 50 g L⁻¹ (Tabla 2).

Tabla 2. Efecto de osmolitos, inhibidores y reguladores del crecimiento vegetal en la ralentización *in vitro* de *A. marmorata*.**Table 2.** Effect of osmolytes, inhibitors, and plant growth regulators on the *in vitro* ralentization of *A. marmorata*.

Tratamiento	Dosis (mg L ⁻¹)	Sv (%)	Peso total de planta (g)	Altura de planta (cm)	Número de Hojas	Número de raíces	Largo de hojas (cm)	Largo de raíces (cm)
Testigo	MS	100	0.90 A	2.80 ABC	2.00 A	1.60 A	6.20 A	6.40 A
ABA	1	100	0.08 C	2.00 ABCD	1.00 A	0.80 A	1.10 BC	0.28 B
	3	100	0.04 C	1.20 CD	1.40 A	0.20 A	0.80 C	0.04 B
	5	100	0.04 C	1.00 D	1.20 A	0.40 A	0.60 C	0.02 B
PBZ	1	100	0.24 ABC	1.20 CD	2.40 A	0.20 A	1.40 BC	0.04 B
	3	100	0.18 C	2.00 ABCD	2.00 A	2.00 A	1.80 BC	1.10 AB
	5	100	0.40 ABC	1.50 CD	1.20 A	1.00 A	1.40 BC	1.80 AB
AS	1	100	0.24 ABC	3.20 AB	3.00 A	1.40 A	4.20 AB	3.40 AB
	5	100	0.86 AB	3.40 A	1.80 A	1.00 A	3.80 ABC	3.40 AB
	10	100	0.22 BC	1.60 BCD	1.80 A	0.80 A	2.60 BC	2.00 AB
PEG	10000	100	0.30 ABC	2.00 ABCD	2.00 A	1.60 A	2.60 BC	2.10 AB
	15000	100	0.08 C	1.80 ABCD	1.40 A	0.80 A	2.00 BC	1.20 AB
MANITOL	40000	100	0.28 ABC	1.20 CD	1.00 A	1.00 A	1.20 BC	4.30 AB
	50000	100	0.08 C	1.80 ABCD	0.40 A	0.20 A	1.00 BC	0.40 B

MS: Medio MS, Sv: Supervivencia. Los valores representan la media aritmética después de 120 días de tratamiento. Medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($p > 0.05$).

MS: Medium MS. Sv: Survival. The values represent the arithmetic mean after 120 days of treatment. Means with the same letter are not significantly different ($p > 0.05$).

Para la altura de la planta, se observó que el tratamiento con ABA a 5 mg L⁻¹ fue el que tuvo menor crecimiento (1 cm), lo que podría estar relacionado con una mayor concentración y tipo de regulador de crecimiento. No se encontraron diferencias significativas en el número de hojas y raíces en todos los tratamientos, lo que sugiere que estos parámetros no se vieron significativamente afectados por ninguno de los tratamientos aplicados. Mientras que en aquellos tratamientos que lograron una longitud en hoja menor a 1 cm fueron con ABA a 3 y 5 mg L⁻¹, y Manitol con 50 g L⁻¹, logrando con el tratamiento de 5 mg L⁻¹ ABA un crecimiento de 103 veces menor respecto al testigo. Así mismo, se observó que los tratamientos con un crecimiento de raíces menor a 0.5 cm fueron con ABA a 1, 3 y 5 mg L⁻¹, con PBZ a 1 mg L⁻¹ y con Manitol a 50 g L⁻¹. Sin embargo, se enfatiza que con 5 mg L⁻¹ de ABA rerepresentó un crecimiento 320 veces menor con respecto al testigo.

Tabla 3. Efecto de osmolitos, inhibidores y reguladores del crecimiento vegetal en la ralentización *in vitro* de *A. salmiana*.**Table 3.** Effect of osmolytes, inhibitors, and plant growth regulators on the *in vitro* ralentization of *A. salmiana*.

Tratamiento	Dosis (mg L ⁻¹)	Sv (%)	Peso total de planta (g)	Altura de planta (cm)	Número de hojas	Número de raíces	Largo de hojas (cm)	Largo de raíces (cm)
Testigo	MS	100	0.24 BC	7.40 A	2.60 AB	1.40 AB	9.60 A	3.60 A
ABA	1	100	0.03 C	1.10 E	0.20 B	0.40 AB	0.10 DE	0.20 C
	3	100	0.02 C	1.00 E	0.00 B	0.60 AB	0.00 E	0.18 C
	5	100	0.02 C	1.00 E	0.00 B	0.40 AB	0.00 E	0.10 C
PBZ	1	100	0.52 A	5.70 AB	4.80 A	1.80 AB	7.40 AB	2.70 ABC
	3	100	0.36 AB	3.60 BCD	3.40 AB	1.20 AB	5.00 ABCD	1.90 ABC
	5	100	0.10 BC	2.20 CDE	2.80 AB	2.20 A	2.20 CDE	3.44 AB
AS	1	100	0.10 BC	3.90 BC	1.80 AB	0.80 AB	5.60 ABC	0.78 ABC
	5	100	0.09 BC	2.40 CDE	3.20 AB	2.20 A	2.80 BCDE	0.58 ABC
	10	100	0.08 C	2.00 CDE	1.00 AB	0.00 B	1.00 CDE	0.00 C
PEG	10000	100	0.07 C	2.90 CDE	1.20 AB	0.80 AB	3.60 BCDE	0.32 C
	15000	90	0.06 C	1.20 E	0.40 B	0.20 B	0.40 DE	0.30 C
MANITOL	40000	100	0.02 C	1.40 DE	1.00 AB	0.40 AB	1.20 CDE	0.70 ABC
	50000	90	0.06 C	1.20 E	0.80 B	0.20 B	1.40 CDE	0.40 BC

MS: Medio MS, Sv: Supervivencia. Los valores representan la media aritmética después de 120 días de tratamiento. Medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($p > 0.05$).

MS: Medium MS. Sv: Survival. The values represent the arithmetic mean after 120 days of treatment. Means with the same letter are not significantly different ($p > 0.05$).

Efecto de los tratamientos en *Agave salmiana*

Para *A. salmiana*, la supervivencia fue del 100% en todos los tratamientos, excepto en aquellos con PEG a 15 g L⁻¹ y Manitol a 50 g L⁻¹, donde la supervivencia en ambos fue del 90%. Los tratamientos que tuvieron un peso total de la planta menor o igual a 0.1 g fueron con ABA a 1, 3 y 5 mg L⁻¹, con PBZ a 5 mg L⁻¹, con AS a 1, 5 y 10 mg L⁻¹, con PEG a 10 y 15 g L⁻¹ y con Manitol a 40 y 50 g L⁻¹, mostrando una mayor reducción de biomasa (Tabla 3).

Se observó una diferencia significativa en la altura de las plantas; siendo aquellos en los que se alcanzó un crecimiento vertical promedio menor a 1.1 cm, el cual fue equivalente a 6.4 veces respecto al testigo, en los siguientes tratamientos: con ABA a 1, 3 y 5 mg L⁻¹, con PEG a 15 g L⁻¹ y con Manitol a 40 y 50 g L⁻¹, lo que podría ser una ventaja para la conservación prolongada en condiciones *in vitro*. Con respecto al número de hojas se observó una amplia reducción en los tratamientos que tenían ABA con 1 mg L⁻¹; ya que con 3 y 5 mg L⁻¹ resultó inhibitorio. De igual manera, con PEG a 10 g L⁻¹ y Manitol a 40 g L⁻¹ se observó una hoja en promedio. Mientras que para el menor número de raíces (0.2) fueron los tratamientos que contenían PEG a 15 g L⁻¹ y Manitol a 50 g L⁻¹, ya que con AS a 10 mg L⁻¹ resultó inhibitorio. Por otra parte, la menor longitud en hojas (0.1-0.4 cm) se observó en los tratamientos con ABA a 1 mg L⁻¹ y con PEG a 15 g L⁻¹, respectivamente; ya que con ABA a 3 y 5 mg L⁻¹ resultó inhibitorio en la formación de raíces; mientras que las raíces que presentaron un crecimiento menor a 0.5 cm, es decir 7.2 veces menos con respecto al testigo, fueron aquellas provenientes de los tratamientos con ABA 1, 3 y 5 mg L⁻¹, PEG a 10 y 15 g L⁻¹ y Manitol a 50 g L⁻¹, observándose un efecto inhibitorio con AS a 10 mg L⁻¹.

Aclimatación en invernadero

Durante el periodo de aclimatación en el invernadero, se observó una supervivencia del 100% para las tres especies de *Agave*. En la Figura 2 se muestran plantas de *A. tequilana*, *A. marmorata* y *A. salmiana* después de 30 días de aclimatación, evidenciando un desarrollo saludable.



A. tequilana



A. marmorata



A. salmiana

Figura 2. Plántulas de *Agave* después de 30 días de aclimatación en invernadero.

Figure 2. *Agave* seedlings after 30 days of acclimatization in greenhouse.

DISCUSIÓN

Comparación de las tres especies de *Agave*

En este estudio, los resultados mostraron que la viabilidad de los explantes de *A. tequilana* y *A. salmiana* fueron afectados por los osmorreguladores, lo que coincide con lo reportado por (Bello-Bello J. J.-P.-A.-V.-S., 2014) quienes señalan que en la conservación *in vitro* de caña de azúcar en presencia de manitol, tuvo un impacto negativo en la supervivencia y el crecimiento de las plántulas. En particular, los tratamientos con 15, 30 y 45 g L⁻¹ de manitol alcanzaron tasas de supervivencia del 80%, 70% y 43%, respectivamente. De igual manera, (Bello-Bello J. J.-G.-A., 2015) señalaron que con 10, 20 y 30 g L⁻¹ de manitol presentaron tasas de supervivencia del 90%, 70% y 53%, respectivamente en *Vainilla planifolia*. También reportaron que los porcentajes de supervivencia con PEG fueron menores en comparación con los de manitol, alcanzando 83%, 70% y 43% para las concentraciones de 10, 20 y 30 g L⁻¹, respectivamente. En el presente trabajo, para *A. marmorata* no se vio afectado por los osmorreguladores, lo que coincide con lo reportado. (Pérez-Molphe, 2012) señalaron que los brotes de diez especies de *Agave* cultivados *in vitro* en presencia de manitol a una concentración de 50 g L⁻¹, no presentaron indicios de daño ni cambios en su morfología; únicamente se observó una reducción en su crecimiento.

Por otro lado, logramos observar que con paclobutrazol se disminuyeron ciertas variables de crecimiento como el peso y el largo total en las tres especies de *Agave*, lo cual coincide con lo reportado por (De-Sá, 2020) quienes señalaron que en *Manihot pseudo glaziovii*, con 0.1 mg L⁻¹ de PBZ tuvo un impacto notable en su conservación *in vitro*. Para *M. violacea*, la mejor dosis para su conservación fue de 0.2 mg L⁻¹ de PBZ. Mientras que para *M. flabelifolia*, las concentraciones utilizadas de PBZ no resultaron efectivas para la conservación *in vitro*. (Ramírez-Mosqueda M. L.-A.-C.-D., 2024) mostraron que después de 12 meses de conservación *in vitro* de la especie *Guarianthe skinneri* (Bateman) Dressler & W. E. Higgins, se obtuvo una reducción en la longitud de los brotes conservados con 2 mg L⁻¹ de PBZ. (Bello-Bello J. J.-P.-A.-V.-S., 2014) observaron que las plantas de caña de azúcar se conservaron *in vitro* en condiciones de crecimiento lento inducido por PBZ a concentraciones de 1, 2 y 3 mg L⁻¹, retrasándose su desarrollo sin comprometer la supervivencia. (Spinosa-Castillo, Pérez-Sato, & Schettino-Salomón, 2022) demostraron que en anturio y caña de azúcar, la concentración de 1 mg L⁻¹ de PBZ fue la más efectiva para la conservación *in vitro* sin comprometer la supervivencia, mientras que, en agave, la mejor concentración fue de 3 mg L⁻¹ de PBZ. (Bello-Bello J. J.-G.-A., 2015) utilizaron concentraciones de 1, 2 y 3 mg L⁻¹ de PBZ para la conservación *in vitro* de *V. planifolia*, logrando mantener una supervivencia del 100% de los brotes. No obstante, el uso de este compuesto provocó anomalías tanto en la región apical como en el sistema radical de las plántulas de *V. planifolia*. En nuestro experimento no se observaron anomalías en las plantas de agave cultivadas con PBZ.

Por otro lado, el ácido salicílico (AS) se presenta como uno de los tratamientos que, a bajas concentraciones, promueve el crecimiento de las plantas, incrementando el número y la longitud de hojas y raíces. Sin embargo, a dosis elevadas, se observa una disminución en el peso, la altura y la longitud de hojas y raíces, lo que concuerda con lo expuesto por (Roque-Otero, 2023) quien sostiene que el AS tuvo un comportamiento diferente para cada especie de *Agave*, reportando un incremento significativo en la longitud de la raíz, a una concentración de 1 y 3.6 µM de AS, menciona que las plantas de agave responden positivamente a este regulador aplicado en bajas dosis y si se aplica en dosis elevadas puede producir inhibición del crecimiento.

Los resultados sugieren al ABA como el factor determinante para lograr la ralentización del crecimiento *in vitro* como estrategia de conservación. Estos hallazgos están respaldados por la literatura existente sobre el efecto del ABA en la conservación *in vitro* de diversas especies vegetales. (Páez-Cásares & González-Valladares, 2001) investigaron el efecto de 1.5 mg L⁻¹ de ABA en la variedad Kennebec de papa, observando un desarrollo moderado tanto a nivel aéreo como radical, lo cual contrasta con los resultados obtenidos en las especies de *Agave* estudiadas. Asimismo, (Espinoza-Reyes, 2002) determinaron que dosis de 5.0 y 10.0 mg L⁻¹ de ABA fueron efectivas para la conservación *in vitro* del boniato, reduciendo significativamente el número de raíces, yemas y longitud del tallo, aunque manteniendo altos porcentajes de supervivencia. Por su parte, (Barrueto, 2008) confirmaron el efecto inhibitorio del ABA sobre la brotación de yemas axilares de yuca, con concentraciones de 20 y 30 µM inhibieron la brotación por 90 días; lo que

coincide con nuestros resultados, ya que en las tres especies de *Agave* se observó una inhibición de los explantes después de 120 días de cultivo *in vitro*. Por otro lado, (Bello-Bello J. J.-P.-A.-V.-S., 2014) encontraron que concentraciones elevadas de ABA redujeron los porcentajes de supervivencia en cultivos de caña de azúcar, afectando negativamente el crecimiento y la diferenciación celular. Sin embargo, en nuestro estudio, las plantas tratadas con ABA no tuvieron problemas de supervivencia, logrando un 100% tanto *in vitro* como en invernadero. (Bello-Bello J. J.-G.-A., 2015) establecieron un método de conservación *in vitro* para *V. planifolia* utilizando 3 mg L⁻¹ de ABA, logrando una alta viabilidad con subcultivos cada 180 días, y destacaron el papel del ABA como inhibidor del crecimiento y regulador de fitohormonas. En el presente experimento, se observó que concentraciones de 1, 3 y 5 mg L⁻¹ de ABA fueron las más efectivas para ralentizar el crecimiento. Además, (Ramírez-Mosqueda M. A.-C.-T.-B., 2018) demostraron que concentraciones de 0.5 mg L⁻¹ de ABA en cultivos de *Laelia anceps* redujeron la cantidad de brotes, pero mantuvieron una alta supervivencia. Estos estudios reflejan la diversidad de efectos fisiológicos del ABA, destacando su papel crucial en la regulación del crecimiento y en los programas de conservación y regeneración *in vitro*. El ABA inhibe la elongación y la división celular, y aunque afecta negativamente el crecimiento, no compromete la supervivencia de las plantas, lo que subraya su utilidad en los protocolos de conservación *in vitro*.

CONCLUSIONES

Los tratamientos con ácido abscísico (ABA) fueron particularmente efectivos en inhibir el crecimiento, a concentraciones de 1, 3 y 5 mg L⁻¹ para *A. tequilana* y *A. salmiana*, y con 5 mg L⁻¹ para *A. marmorata*. Estos tratamientos mostraron diferencias en comparación con el testigo, manteniendo una supervivencia del 100%, lo que resalta la eficacia del ABA en los protocolos de conservación *in vitro*. Por otro lado, el tratamiento con PEG a 15 g L⁻¹ en *A. salmiana* redujo el desarrollo de las plantas, pero también afectó negativamente la supervivencia. Los tratamientos con PBZ, Manitol, PEG y AS no lograron uniformidad en todas las variables, indicando que no inhibieron el crecimiento de manera efectiva. Esto refuerza la importancia del ABA como una herramienta clave en la conservación y manejo *in vitro* de especies de *Agave*, destacando su papel integral en los protocolos de conservación, a diferencia de otros tratamientos que no mostraron la misma eficacia en la inhibición del crecimiento ni en la conservación de la supervivencia. Las tres especies de *Agave* demostraron una alta capacidad de adaptación y supervivencia en condiciones de invernadero.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

LITERATURA CITADA

- Acosta-Pérez, K. G.-A. (2005). Conservación *in vitro* a corto plazo de ápices de plantas del híbrido de papaya IBP 42-99. *Biotecnología Vegetal*, Vol. 5, No. 1: 47 - 50.
- Aguilar-Rito, M. G.-F.-N.-M. (2023). Establecimiento de un protocolo eficiente de desinfección *in vitro* en semillas de siete especies de *Agave* spp. *Revista Mexicana de Fitopatología*.
- Al-Abdallat, A. M.-Q. (2017). Preservación *in vitro* de plantas transgénicas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) que sobreexpresan el factor de transcripción SIAREB1 relacionado con el estrés. *Revista internacional de ciencias moleculares*, N° 7, 1477.
- Alcántara-Cortés, J. S.-G.-C.-M. (2019). Principales reguladores hormonales y sus interacciones en el crecimiento vegetal. *Nova*, 109-129.
- Arzate-Fernández, A. M., Piña-Escutia, J. L., Norman-Mondragón, T. H., Reyes-Díaz, J. I., Guevara-Suárez, K. L., & Vázquez-García, L. M. (2016). Regeneración de agave mezcalero (*Agave angustifolia* Haw) a partir de embriones somáticos encapsulados. *Revista fitotecnica mexicana*, 39(4), 359-366.

Recibido:
10/junio/2024

Aceptado:
14/diciembre/2024

- Arzate-Fernández, A. M.-F. (2011). Capacidad embriogénica de callos inducidos en ejes embrionarios cigóticos de *Agave angustifolia* Haw. *Revista fitotecnica mexicana*, 101-106.
- Barrueto, C. P. (2008). Importancia del ácido abscísico (ABA) en la conservación *in vitro* de la yuca (*Manihot esculenta* Crantz). *Chilean Journal of Agricultural Research*, 304-308.
- Bello-Bello, J. J.-G.-A. (2015). Conservación de vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks.) bajo condiciones de lento crecimiento *in vitro*. *Revista fitotecnica mexicana*, 165-171.
- Bello-Bello, J. J.-P.-A.-V.-S. (2014). Comparación del efecto de osmorreguladores e inhibidores del crecimiento en la conservación *in vitro* de caña de azúcar. *Agrociencia*, 439-446.
- De-Sá, J. F.-S.-S.-d.-L.-C. (2020). Efectos de diferentes dosis de paclobutrazol y sacarosa en la mínima *in vitro* crecimiento de especies silvestres de manihot. *Revista Brasileira de Ciencias Agrárias*.
- Espinosa-Reyes, A. S.-H.-P.-P. (2002). Empleo de ácido abscísico, manitol y la disminución de la concentración de las sales del medio de cultivo en la conservación *in vitro* de *Ipomoea batatas*. *Biotechnologia vegetal*, 39-42.
- García-Águila, L. d. (2007). Aspectos básicos de la conservación *in vitro* de germoplasma vegetal. *Biotechnologia Vegetal*, Vol. 7, No. 2: 67 - 79.
- Martínez-Martínez, S. Y.-F.-A.-V.-M. (2021). Regeneration of agave marmorata roelz plants in temporary immersion systems, via organogenesis and somatic embryogenesis. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 24.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 473-497.
- Nava-Cruz, N. Y.-M. (2014). *Agave* biotechnology: an overview. *Critical Review in Biotechnology*, 546-559.
- Páez de Cásaes, J. &. (2016). Conservación *in vitro* de dos variedades de papa (*Solanum tuberosum* L) bajo condiciones de crecimiento mínimo. *Revista Latinoamericana De La Papa*, 121-129.
- Páez-Cásaes, J., & González-Valladares, R. (2001). Conservación *in vitro* de dos variedades de papa (*Solanum tuberosum* L) bajo condiciones de crecimiento mínimo. *Revista Latinoamericana de la Papa*, 121-129.
- Pérez-Molphe, B. E.-A.-R. (2012). Conservación *in vitro* de germoplasma de *Agave* spp. Bajo condiciones de crecimiento retardado. *Revista fitotecnica mexicana*, 35(4), 279-287.
- Quiróz-López, E. P.-M.-B.-S.-R.-L.-H. (2021). Efecto del ácido salicílico y metil jasmonato sobre *Colletotrichum* sp. en frutos de mango. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, Vol. 24, N° 2.
- Ramírez-Mosqueda, M. A.-C.-T.-B. (2018). Conservación y regeneración *in vitro* de *Laelia anceps* Lindl. *Revista Sudafricana de Botánica*, 219-223.
- Ramírez-Mosqueda, M. L.-A.-C.-D. (2024). Conservación *in vitro* de *Guarianthe skinneri*; (Bateman) Dressler & W. E. Higgins por mínimo crecimiento. *Polibotánica*, 58 (29).
- Rayas-Cabrera, A. C.-J.-P.-P.-T.-V. (2013). Efecto del manitol y el nitrato de plata en la conservación *in vitro* de la malanga (*Xanthosoma* spp.). *Revista Colombiana de Biotechnologia*, Vol XV N° 1, 167-171.
- Roque-Otero, A. M. (31 de Mayo de 2023). Efecto del ácido salicílico en el incremento de biomasa y azúcares reductores en *Agave cupreata* Trel. & Berger y *Agave salmiana* gentry. *Tesis de Maestría*. Toluca., Estado de México., México: Universidad autonoma del Estado de México.
- Silva, T. P. (2011). Conservación *in vitro* de *Piper aduncum* y *Piper hispidinervum* en condiciones de crecimiento lento. *Pesq. Agropec. Bras.*, 46, 384-389.
- Spinoso-Castillo, J. L., Pérez-Sato, J. A., & Schettino-Salomón, S. S. (2022). Un método alternativo para la conservación *in vitro* a mediano plazo de diferentes especies de plantas mediante inhibidores de giberelinas. *Biología celular y del desarrollo in vitro: plantas*, 606-614.
- Spinoso-Castillo, J. L.-S.-S. (2022). Un método alternativo para la conservación *in vitro* a mediano plazo de diferentes especies de plantas mediante inhibidores de giberelinas. *Biología celular y del desarrollo in vitro: plantas*, 606-614.