

**COMPARACIÓN DE LA GERMINACIÓN  
DE SEMILLAS Y EL DESARROLLO  
INICIAL DE PLÁNTULAS DE *Agave  
angustifolia* Haw. Y *Agave karwinskii* Zucc. EN  
CONDICIONES *in vitro* Y EN  
INVERNADERO**

**COMPARISON OF SEED GERMINATION  
AND SEEDLINGS INITIAL  
DEVELOPMENT OF *Agave angustifolia* Haw.  
AND *Agave karwinskii* Zucc. *in vitro* AND  
GREENHOUSE CONDITIONS**

**Cebrián Barba, V., E. Pérez Molphe Balch, L.I. Chávez Ortiz**

COMPARACIÓN DE LA GERMINACIÓN DE SEMILLAS Y EL DESARROLLO INICIAL DE PLÁNTULAS DE *Agave angustifolia* Haw. Y *Agave karwinskii* Zucc. EN CONDICIONES *in vitro* Y EN INVERNADERO

COMPARISON OF SEED GERMINATION AND SEEDLINGS INITIAL DEVELOPMENT OF *Agave angustifolia* Haw. Y *Agave karwinskii* Zucc. EN CONDICIONES *in vitro* Y EN INVERNADERO



## Comparación de la germinación de semillas y el desarrollo inicial de plántulas de *Agave angustifolia* Haw. y *Agave karwinskii* Zucc. en condiciones *in vitro* y en invernadero

### Comparison of seed germination and seedlings initial development of *Agave angustifolia* Haw. and *Agave karwinskii* Zucc. *in vitro* and greenhouse conditions

Victoria Cebrián Barba,  
Eugenio Pérez Molphe Balch,  
Lucía Isabel Chávez Ortiz

COMPARACIÓN DE LA  
GERMINACIÓN DE  
SEMILLAS Y EL  
DESARROLLO INICIAL DE  
PLÁNTULAS DE *Agave  
angustifolia* Haw. Y *Agave  
karwinskii* Zucc. EN  
CONDICIONES *in vitro* Y EN  
INVERNADERO

COMPARISON OF SEED  
GERMINATION AND  
SEEDLINGS INITIAL  
DEVELOPMENT OF *Agave  
angustifolia* Haw. AND *Agave  
karwinskii* Zucc. *in vitro* AND  
GREENHOUSE  
CONDITIONS

POLIBOTÁNICA

Instituto Politécnico Nacional

Núm. 59: 199-212. Enero 2025

DOI:

10.18387/polibotanica.59.12

Victoria Cebrián-Barba

Eugenio Pérez-Molphe-Balch <https://orcid.org/0000-0003-3394-2486>

Lucía Isabel Chávez-Ortiz. *Autora de correspondencia:* [isabel.chavezo@edu.uaa.mx](mailto:isabel.chavezo@edu.uaa.mx)  
<https://orcid.org/0000-0002-3811-9256>

Unidad de Biotecnología Vegetal, Universidad Autónoma de Aguascalientes,  
Av. Universidad #940. Aguascalientes, Ags., México. C.P. 20100

**RESUMEN:** Los agaves son especies clave de los ecosistemas áridos y semiáridos; además tienen una gran importancia económica debido a los productos que se pueden obtener de ellos. Destaca el mezcal, bebida alcohólica cuya producción y consumo han incrementado en los últimos años. Para su elaboración se usan diferentes especies, entre ellas *A. angustifolia* y *A. karwinskii*; frecuentemente se emplean ejemplares silvestres, resultando en sistemas de aprovechamiento no sustentables. El cultivo de tejidos vegetales (CTV) es una opción viable para generar un gran número de plantas en mucho menos tiempo que los esquemas tradicionales, pero es importante considerar las características de las plantas generadas *in vitro* para conocer los alcances del CTV. En este trabajo se analizaron las diferencias en la germinación y el desarrollo inicial entre plántulas de *A. angustifolia* y *A. karwinskii* germinadas *in vitro* y en suelo. Para ambas especies se encontró que no hay diferencia en la germinación en suelo o *in vitro*; respecto a su desarrollo inicial, las vitroplantas acumulan una mayor cantidad de biomasa que las plántulas en suelo, y sus hojas tienen mayor longitud. Sin embargo, estas hojas no son suculentas, tienen muy poca cera epicuticular y sus estomas están atrofiados. Estas alteraciones morfo-fisiológicas se deben tomar en cuenta en la etapa de aclimatación a medio externo para incrementar el índice de supervivencia de las vitroplantas; sin embargo, estas alteraciones se compensan con creces por la gran cantidad de plantas que se pueden obtener en poco tiempo.

**Palabras clave:** *Agave*, cultivo *in vitro*, estomas, germinación

**ABSTRACT:** Agaves are keystone species in arid and semi-arid ecosystems. They are of great economic importance as well due to the products that can be obtained from them. Within these products is worth highlighting mezcal, a spirit whose production and consumption has markedly increased in recent years. Mezcal can be elaborated with several different species, *A. angustifolia* and *A. karwinskii* among them; in the case of these species, wild specimens are frequently used for production, which leads to unsustainable exploitation systems. Plant tissue culture (PCT) is a viable option to generate a great number of plant specimens in a considerably shorter amount of time than with traditional means. However, it is important to understand the characteristics of *in vitro* plants to understand the reach of PTC. In this study, the differences between germination and early development of seedlings, *in vitro* and in soil, of *A. angustifolia* and *A. karwinskii* were analyzed. For both species, the results indicate no difference between soil and *in vitro* germination. In early development, *in vitro* seedlings accumulated a larger biomass than those in soil, as well as longer leaves. However, these were not succulent leaves and presented atrophied stomata as well as little epicuticular wax. These morphophysiological alterations must be accounted for in the acclimation stage to an external environment in order to increase the survival rate of *in vitro*

specimens. Notwithstanding, the large number of plants that can be produced in such short period of time make up for the presence of said alterations.

**Key words:** *Agave*, germination, *in vitro* culture, stomata.

## INTRODUCCIÓN

Los agaves son uno de los componentes más notables de la riqueza florística de México. Tienen gran importancia ecológica, gracias a su capacidad de habitar en zonas con una baja disponibilidad de agua y altas temperaturas; esto los convierte en integrantes fundamentales de muchos de los ecosistemas de las zonas áridas o semiáridas del país (García-Mendoza, 2007). Además, los agaves han sido muy importantes para la subsistencia de los grupos humanos que habitan el actual territorio de México desde los primeros grupos de cazadores y recolectores que obtenían alimentos y materiales de estas plantas; hoy en día los agaves siguen siendo fuente de innumerables productos, desde alimentos y bebidas ancestrales, hasta biocombustibles y edulcorantes (Delgado-Lemus *et al.*, 2014; García-Mendoza, 2007; Ramírez-Tobías *et al.*, 2014). Sin embargo, por su importancia económica sobresale la producción de bebidas alcohólicas destiladas a partir de algunos agaves, como el mezcal, cuyo consumo y precio se han incrementado de manera notable en los últimos años: la producción aumentó de 1.04 millones de litros en 2012 a 14.16 millones de litros en 2022 (COMERCAN, 2024), y las exportaciones de mezcal incrementaron de 8 a 53 millones de dólares entre 2013 y 2018 (INEGI, 2019). Así, el mezcal se ha convertido en una fuente de ingresos muy importante para algunas de las regiones más pobres del país (Delgado-Lemus *et al.*, 2014; García-Mendoza, 2007). Alrededor de 53 especies de *Agave* son utilizadas para la producción de mezcal (Torres *et al.*, 2015), y desafortunadamente su explotación no se ha hecho de una manera sostenible, pues muchos de los ejemplares utilizados para este fin provienen de poblaciones silvestres (Delgado-Lemus *et al.*, 2014).

La producción masiva de plantas de *Agave* a través del cultivo *in vitro* ha demostrado ser la opción más eficiente para generar en poco tiempo, y sin necesidad de grandes cantidades de material inicial, los propágulos necesarios para darle un manejo sostenible a estas especies (Bautista-Montes *et al.*, 2022). Se han reportado en la literatura diversos protocolos de multiplicación *in vitro* para varias especies de *Agave* utilizadas para la producción de mezcal, como *Agave cupreata*, *A. karwinskii*, *A. potatorum* (Domínguez-Rosales *et al.*, 2008) y *A. angustifolia* (Arzate-Fernández y Mejía-Franco, 2011). Sin embargo, una de las etapas críticas del proceso sigue siendo la adaptación al ambiente externo de las plantas generadas *in vitro*, debido a que estas exhiben una serie de alteraciones anatómicas y fisiológicas, entre ellas menor deposición de cera epicuticular, y estomas atrofiados y disfuncionales (Joshi *et al.*, 2006; Aliniaiefard *et al.*, 2020). Estos aspectos se deben considerar al aclimatar las vitroplantas al ambiente externo, pues les causan problemas para controlar la pérdida de agua (Aliniaiefard *et al.*, 2020).

*A. angustifolia*, conocido como espadín, tiene una amplia distribución en México y es la especie más utilizada para la producción de mezcal, motivo por el cual se cultiva en varias regiones del país. Por su parte, *A. karwinskii*, conocido como cuish, madre cuish o cirial, tiene una distribución mucho más restringida, limitada al Valle de Tehuacán, Puebla, y a los Valles Centrales y la Sierra Sur en Oaxaca; muchos de los ejemplares utilizados para la producción de mezcal proceden de poblaciones silvestres (Vázquez-Pérez *et al.*, 2020). Esta condición, además de su distribución natural restringida, han colocado a la especie en una situación de gran vulnerabilidad.

El objetivo de este trabajo fue analizar la germinación y el desarrollo inicial de plántulas de *Agave angustifolia* Haw. y *A. karwinskii* Zucc, bajo la hipótesis de que no habría diferencia en los parámetros asociados a la germinación en condiciones de cultivo *in vitro* y en condiciones de invernadero, pero si en el desarrollo y características de las plántulas cultivadas *in vitro* en comparación a las cultivadas en invernadero durante los primeros meses de desarrollo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Proceso de germinación de semillas de agave

Se obtuvieron semillas de *A. angustifolia* de Aguascalientes, Aguascalientes, y de *A. karwinskii* de Santiago Matatlán, Oaxaca. Para la germinación *ex vitro* se sembraron 100 semillas de cada una de las especies en charolas de plástico de 30 X 30 X 6 cm cubiertas por una bolsa de plástico transparente; el sustrato utilizado fue una mezcla a partes iguales de peat moss Vigoro® y arena. Las charolas de germinación se colocaron en un lugar bien iluminado, en el que predominó una temperatura de alrededor de 22 °C, y se regaron conforme fue necesario para mantener una humedad adecuada del sustrato.

Para la germinación *in vitro* también se utilizaron 100 semillas de cada una de las especies; se efectuaron tres lavados de 5 min cada uno en una solución de Dermoclean® 10% a la que se agregaron dos gotas de desinfectante comercial a base de plata ionizada (Microdyn®) y después se enjuagaron con agua corriente. Se desinfectaron en una solución de etanol al 70% en agitación continua durante 45 s, se enjuagaron con agua corriente, para después sumergirlas en una solución de hipoclorito de sodio al 15% durante 20 min con agitación constante. En campana de flujo laminar, las semillas se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril y se distribuyeron cinco semillas en cada recipiente de cultivo de vidrio; estos contenían medio Murashige & Skoog (1962) adicionado con vitaminas, 3% de sacarosa y 8 gl<sup>-1</sup> de agar como gelificante; no se utilizaron reguladores de crecimiento. El pH del medio de cultivo se ajustó a 5.7 y se esterilizó en autoclave a 121 °C por 15 min. Los cultivos se mantuvieron a 21-22 °C con un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h oscuridad. A partir de la emergencia de las plántulas, estas se subcultivaron cada 60 días en el medio antes descrito, y con las mismas condiciones de temperatura y fotoperiodo ya señaladas.

### Análisis de la germinación y emergencia de las plántulas

Se registró diariamente la germinación de las semillas tanto *in vitro* como *ex vitro* durante 30 días. Además de registrar la germinación total se calcularon la velocidad de germinación (VG), la energía de germinación del día pico (día en el que se presentó la mayor cantidad de eventos de germinación, EG) y el tiempo medio de germinación (TMG) utilizando las siguientes ecuaciones (Fredrick *et al.*, 2015):

$$VG = \sum \frac{ni}{ti}$$

$$TMG = \frac{\sum(ni * ti)}{\sum ni}$$

Donde *ti* es el tiempo de germinación (días a partir de la siembra) y *ni* el número de semillas germinadas cada día.

$$EG = \frac{\text{Semillas germinadas el día pico}}{\text{Total de semillas germinadas después de 27 días}} * 100$$

Para la visualización de los datos se generaron curvas de Kaplan-Meier, y se evaluaron mediante las pruebas de Mantel-Cox y Mantel-Haenszel para determinar si las diferencias en la germinación de las semillas en ambas condiciones fueron significativas (Romano & Stevanato, 2020) empleando el software GraphPad Prism 10®.

### Análisis del crecimiento y desarrollo de las plántulas

A partir del día 60 después de sembrar las semillas se realizaron mediciones mensuales para ambas especies. En cada medición se tomaron al azar plantas germinadas *in vitro* y *ex vitro*, de las que se registraron número de hojas, área foliar, longitud de la primer hoja, peso fresco y peso seco. Dos meses después se comenzó a medir el espesor de la primer hoja utilizando un vernier. El área foliar se calculó mediante el análisis de fotografías con el software Image J®. Todos los datos se analizaron con el software GraphPad Prism 10®. Para cada uno de los parámetros se realizó una regresión lineal simple de los promedios de las mediciones obtenidas cada mes;

también se efectuó una ANOVA de una vía y se empleó la prueba de Bonferroni con un valor de significancia de 0.05.

### Índice estomático y caracterización morfológica de los estomas

Para calcular el índice estomático se empleó la técnica de impresión epidérmica con barniz de uñas transparente; se aplicó una capa delgada de barniz tanto en el haz como en el envés de la hoja, se dejó secar y posteriormente se retiró con cuidado y se colocó sobre un portaobjetos, sin colocar cubreobjetos para no dañar la impresión. Las impresiones en barniz se observaron al microscopio óptico compuesto LEICA DME con el objetivo 40X y se contabilizaron estomas y células epidérmicas para calcular el índice estomático según la fórmula reportada por Cruz García *et al.* (2017):

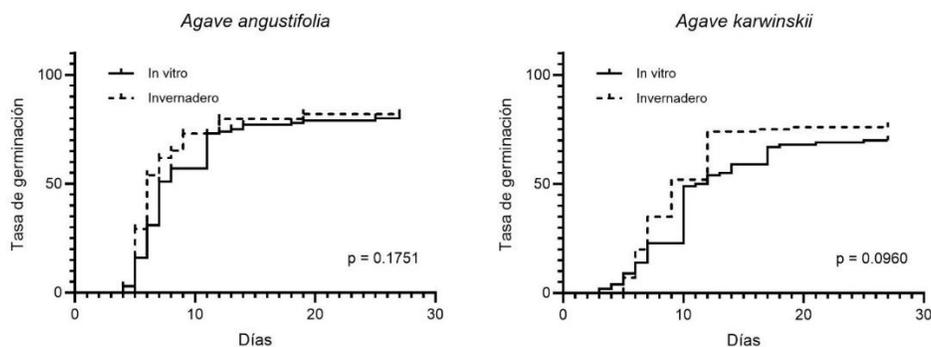
$$IE = \frac{E}{E+CE} \times 100$$

En la que E es el número de estomas por campo de observación y CE es el número de células epidérmicas por campo de observación.

Para observar a detalle la morfología de la epidermis y del complejo estomático se realizaron cortes de 2 cm<sup>2</sup>, tanto de haz como de envés de hojas de plantas de 320 días germinadas *in vitro* y *ex vitro* de ambas especies; todas las muestras se tomaron durante el día. Los cortes se colocaron en microtubos y se les agregó glutaraldehído al 1% como fijador; se realizaron varios lavados con PBS 1X y posteriormente se deshidrataron con una serie graduada de etanol (60 – 96 % v/v) de 10 a 15 min cada una. Las muestras se llevaron al secador de punto crítico SAMDRI-PVT-3D Touismis, y luego se colocaron sobre un cilindro con un disco de grafito de 1 X 1 cm para aplicarles una capa de oro utilizando el equipo Desk II Cold Sputter / Etch 123 Denton Vacuum, LLC. Posteriormente se observaron con el microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-5900LV.

## RESULTADOS

El inicio de la germinación ocurrió en el día 4 *in vitro*, y en el día 5 en invernadero para las semillas de *A. angustifolia*; en *A. karwinskii* la germinación inició el día 3 *in vitro* y el día 5 en invernadero, aunque la emergencia final fue ligeramente más alta en condiciones de invernadero en ambas especies. Las curvas de Kaplan-Meier (Figura 1) representan la tasa de germinación observada a lo largo de 30 días; el último evento de germinación se presentó el día 27 en *A. angustifolia* y el día 25 en *A. karwinskii*. La germinación total, la velocidad de germinación, la energía de germinación en el día pico y el tiempo medio de germinación fueron muy similares en ambas condiciones de germinación para cada una de las especies analizadas, lo cual fue confirmado mediante las pruebas de Mantel-Cox y Mantel-Haenszel (tabla 1).



**Figura 1.** Curvas de Kaplan-Meier de las tasas de germinación de semillas de *A. angustifolia* y *A. karwinskii* *in vitro* (en medio MS adicionado con vitaminas, 3% de sacarosa y 9 g L<sup>-1</sup> de agar) y en condiciones de invernadero (en sustrato peat moss y arena a partes iguales).

**Figure 1.** Kaplan-Meier curves of the germination rates of *A. angustifolia* and *A. karwinskii* seeds *in vitro* (on MS medium supplemented with vitamins, 3% sucrose, and 9 g L<sup>-1</sup> agar) and under greenhouse conditions (on a substrate of equal parts peat moss and sand).

Según la prueba de Mantel-Cox, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre ambas condiciones de germinación al analizar los datos con un valor de significancia de 0.05.

**Tabla 1.** Comparación de los parámetros asociados a la germinación de *A. angustifolia* y *A. karwinskii* *in vitro* vs. invernadero y resultados de las pruebas de Mantel-Cox y Mantel-Haenszel

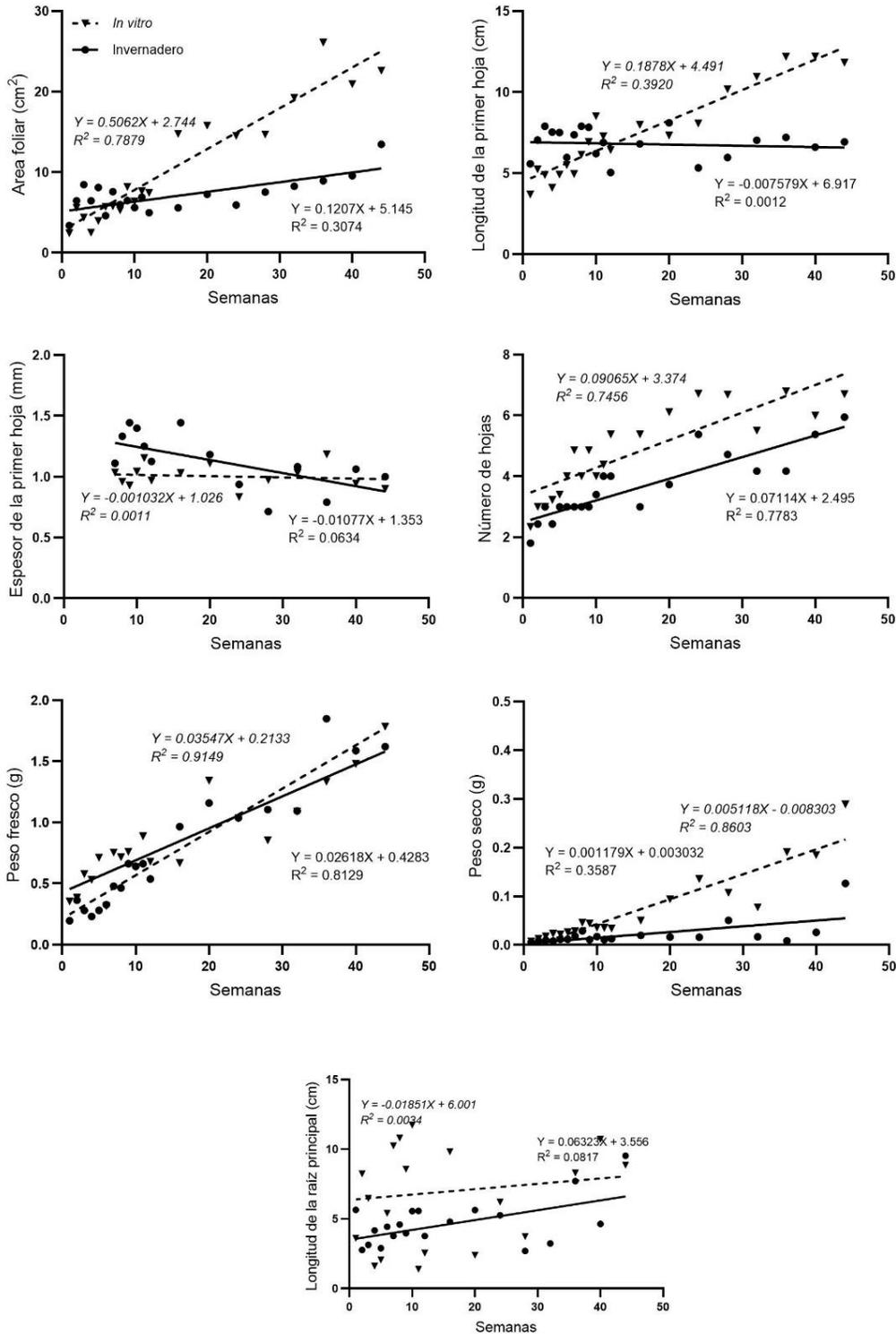
**Table 1.** Comparison of parameters associated with the germination of *A. angustifolia* and *A. karwinskii* *in vitro* vs. greenhouse conditions and the results of Mantel-Cox and Mantel-Haenszel tests.

Especie	Condiciones de germinación	G (%)	VG	EG	TMG	Test de Mantel-Cox		Hazard ratio		
						X <sup>2</sup>	gl	Valor de p	HR	CI 95 %
<i>Agave angustifolia</i>	<i>In vitro</i>	81	11.40	24.69	8.31	1.839	1	0.1751	0.7812	0.5468
	Invernadero	84	13.20	30.95	6.96					a 1.116
<i>Agave karwinskii</i>	<i>In vitro</i>	70	8.29	37.14	10.29	2.771	1	0.0960	0.7409	0.5204
	Invernadero	76	9.55	28.95	8.8					a 1.055

G: germinación total; VG: velocidad de germinación; EG: energía de germinación en el día pico; TMG: tiempo medio de germinación; gl: grados de libertad; HR: Hazard ratio; CI: intervalo de confianza. El valor de significancia usado en las pruebas fue de 0.05

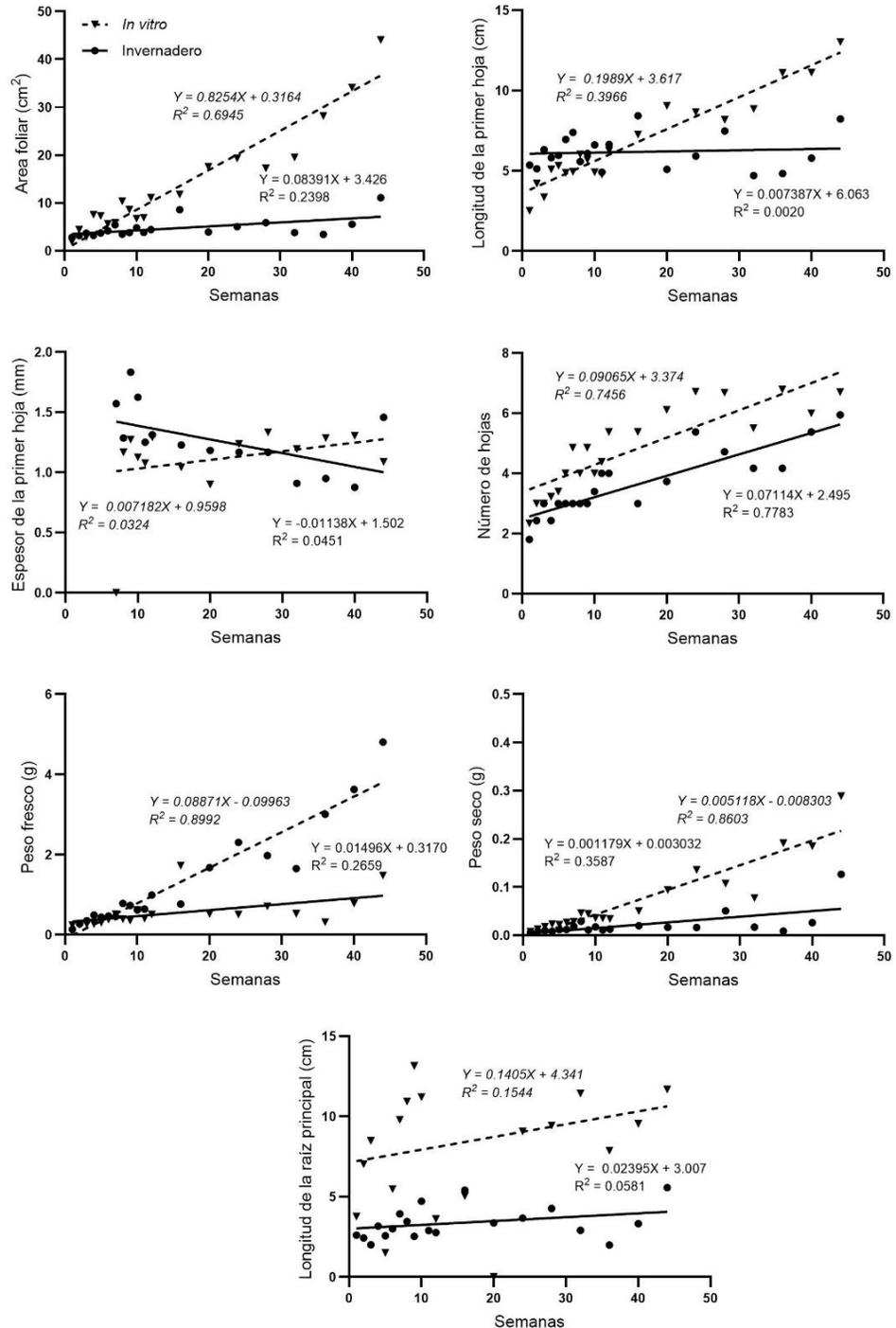
G: total germination; VG: germination rate; EG: germination energy on the peak day; TMG: mean germination time; gl: degrees of freedom; HR: Hazard ratio; CI: confidence interval. The significance level used in the tests was 0.05.

El número de hojas, área foliar, longitud de la primera hoja, espesor de la primer hoja, peso fresco y peso seco se sometieron a una ANOVA de una vía y luego se utilizó un test de Bonferroni con un valor de significancia de 0.05. En *A. angustifolia* el número de hojas y el peso seco fueron significativamente mayores en las plántulas *in vitro* en comparación a las plántulas cultivadas en invernadero; por otra parte, el peso fresco, número de hojas, área foliar, longitud de la raíz, la longitud y espesor de la primera hoja fueron un poco mayores en las plántulas *in vitro*, pero la diferencia no fue significativa (Figura 2). En el caso de *A. karwinskii* el número de hojas, área foliar, peso seco, y longitud de la raíz más larga fueron significativamente mayores en las plántulas cultivadas *in vitro* que en las plantas cultivadas en condiciones de invernadero; el peso seco, longitud y espesor de la primer hoja fueron mayores en las plántulas en invernadero, pero las diferencias no fueron significativas (Figura 3).



**Figura 2.** Parámetros para comparar desarrollo de plántulas *in vitro* y en invernadero de *A. angustifolia*.  
**Figure 2.** Parameters for comparing seedling development of *A. angustifolia* in vitro and in greenhouse conditions.

La primera medición (semana 0) se realizó 60 días después de la siembra, excepto para el espesor de la primera hoja, que se comenzó a medir en la semana 8. Se realizó una regresión lineal para todos los parámetros y se presentan la ecuación de la recta y el coeficiente de correlación (en *italicas* para datos *in vitro*). Los datos se analizaron mediante ANOVA de una vía y se realizó una prueba de Bonferroni con un nivel de significancia de 0.05 que mostró diferencias significativas solo en el peso seco y el número de hojas.



**Figura 3.** Parámetros para comparar desarrollo de plántulas *in vitro* y en invernadero de *A. karwinskii*.

**Figure 3.** Parameters for comparing seedling development of *A. karwinskii* *in vitro* and under greenhouse conditions.

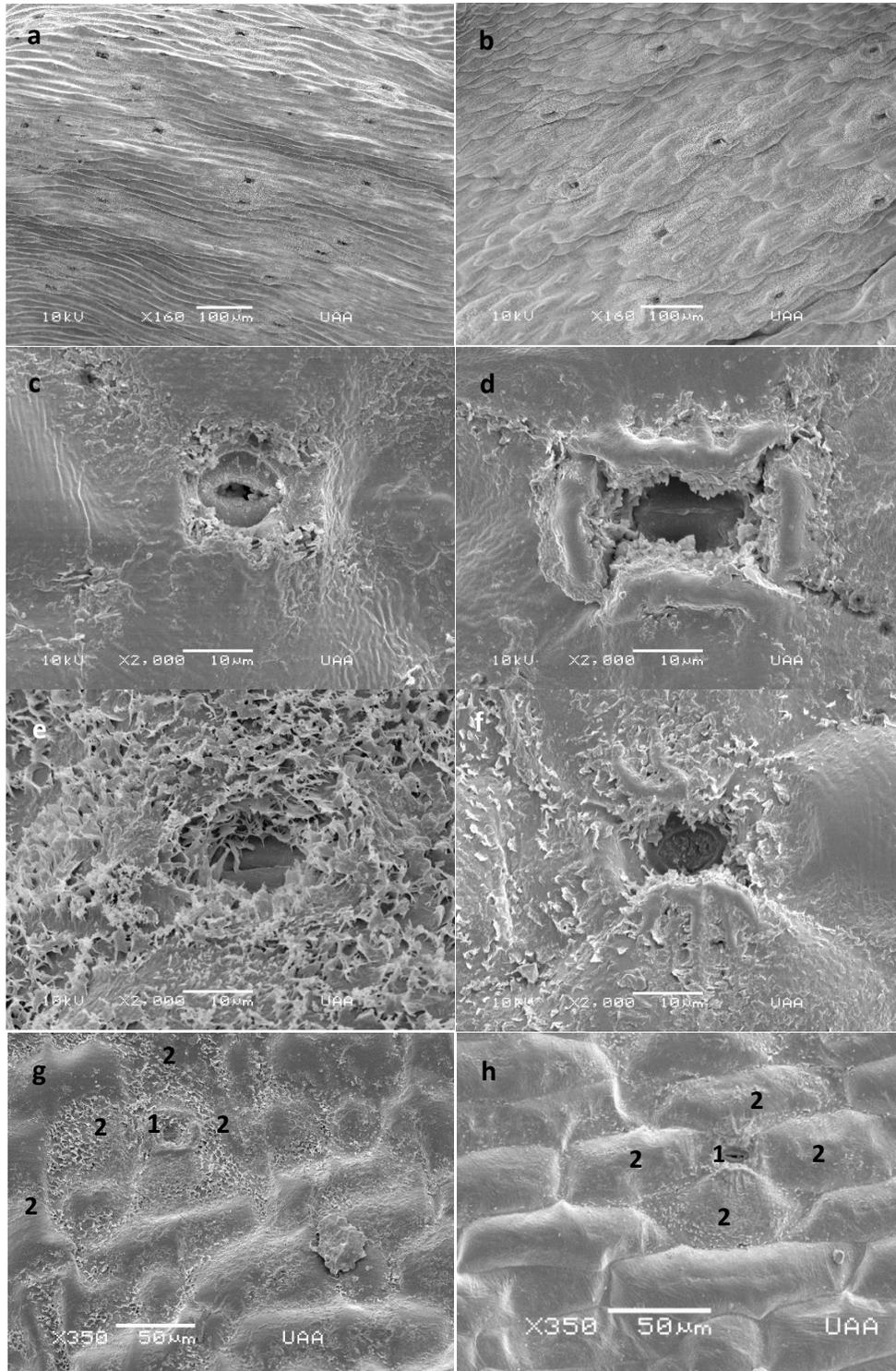
La primera medición (semana 0) se realizó 60 días después de la siembra, excepto para el espesor de la primera hoja, que se comenzó a medir en la semana 8. Se realizó una regresión lineal para todos los parámetros y se presentan la ecuación de la recta y el coeficiente de correlación (en *italicas* para datos *in vitro*). Los datos se analizaron mediante ANOVA de una vía y se realizó una prueba de Bonferroni con un nivel de significancia de 0.05 que mostró diferencias significativas solo en el peso fresco, número de hojas, área foliar y longitud de la raíz principal. En las hojas de ejemplares cultivados *ex vitro* de *A. angustifolia* y *A. karwinskii* se observó una mayor cantidad de estomas en la superficie adaxial, pero en hojas de plantas de ambas especies germinadas y cultivadas *in vitro* el índice estomático fue mayor para la superficie abaxial que para la adaxial (Tabla 2).

**Tabla 2.** Índice estomático de las superficies adaxial y abaxial de plantas de *A. angustifolia* y *A. karwinskii* germinadas *in vitro* y en invernadero.

**Table 2.** Stomatal index of the adaxial and abaxial surfaces of *A. angustifolia* and *A. karwinskii* plants germinated *in vitro* and under greenhouse conditions.

Especie	Condiciones de germinación	Índice estomático	
		Adaxial	Abaxial
<i>Agave angustifolia</i>	<i>In vitro</i>	5.27	5.77
	Invernadero	5.62	4.83
<i>Agave karwinskii</i>	<i>In vitro</i>	4.54	6.48
	Invernadero	5.70	3.93

En las fotografías tomadas con el microscopio electrónico de barrido se observaron estomas tetracíclicos típicos del género tanto en las preparaciones de *A. angustifolia* (Figura 5g) como de *A. karwinskii* (5h). También se observó una menor deposición de cera epicuticular en la epidermis de plántulas germinadas *in vitro*, más acentuada en *A. karwinskii* (Figura 5c y 5d). Las células estomáticas presentan una anatomía normal, aunque en las muestras de plántulas *in vitro* todos los estomas observados estaban abiertos durante el día; en cambio, en las plantas germinadas en condiciones de invernadero los estomas se presentaron cerrados (Figura 5), acorde a lo esperado en plantas CAM.



**Figura 5.** Arreglo y características de los estomas de *A. karwinskii* (izq.) y *A. angustifolia* (der.).  
**Figure 5.** Arrangement and characteristics of the stomata of *A. karwinskii* (left) and *A. angustifolia* (right).

Cortes observados en microscopio electrónico de barrido; en cada fotografía se indica el aumento y escala. Se observa el arreglo y disposición de los estomas (a y b); la escasa capa de cera epicuticular en plántulas germinadas *in vitro* (c y d), en comparación con la mayor deposición de

cera en plántulas germinadas en invernadero (e y f). Arreglo tetracítico del complejo estomático -1- y las células subsidiarias -2- (g y h).

## DISCUSIÓN

El cultivo de tejidos vegetales *in vitro* provee de herramientas valiosas para el manejo y aprovechamiento de los agaves, pero es importante identificar en qué momentos y para qué propósitos es conveniente emplear estas técnicas, cuáles son sus alcances y sus limitaciones. Este trabajo planteó la cuestión de si es más conveniente germinar las semillas de agaves *in vitro* o en sustrato en condiciones de invernadero. Los resultados experimentales relacionados con la germinación (germinación total, velocidad de germinación, energía de germinación y tiempo medio de germinación) fueron muy similares en ambas especies. Para realizar el análisis estadístico de la germinación se utilizó un modelo tiempo-a-evento representado mediante curvas de germinación Kaplan-Meier, y se emplearon dos métodos no-paramétricos, Mantel-Cox y Mantel Haenszel, debido a que son modelos univariados que consideran un solo factor (Romano & Stevanato, 2020), en este caso, las condiciones de germinación de las semillas. La prueba de Mantel-Cox arrojó valores para  $p$  de 0.1751 en *A. angustifolia* y 0.0960 en *A. karwinskii*, en ambos casos mayores al nivel de significancia ( $\alpha = 0.05$ ), es decir, no se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre la germinación de las semillas que se colocaron en sustrato en condiciones de invernadero y las que fueron establecidas *in vitro*. La prueba de Mantel-Haenszel también lo confirma, pues tanto en *A. angustifolia* como en *A. karwinskii* las tasas de riesgo (*hazard ratio*) tuvieron valores dentro del intervalo de confianza de 95%. Villegas-Monter & Castro Garibay (2024) tampoco encontraron diferencias en la germinación *in vitro* y en sustrato para *A. salmiana* y *A. angustifolia*, y concluyeron que no se justifica la germinación de semillas de agaves *in vitro* debido a que es más costoso y se obtiene un resultado equiparable a la germinación en sustrato. En el presente estudio se confirma que no tiene objeto germinar *in vitro* semillas de estas especies de agaves si el destino de estas plántulas es la aclimatación al medio externo.

Por otro lado, si el propósito es emplear plántulas para el establecimiento inicial de un cultivo *in vitro*, sí es conveniente germinar semillas en estas condiciones, pues la mayoría de las plantas obtenidas a partir de semillas botánicas están libres de contaminación microbiana (Cassells, 2012) y por lo tanto resultan un explante muy conveniente para establecer un cultivo axénico *in vitro*. Ahora bien, cuando el propósito de la micropropagación es generar plantas para su cultivo y explotación comercial, la estrategia usualmente consiste en elegir ejemplares con características sobresalientes, y así obtener un gran número de clones de uno o unos pocos individuos élite. Sin embargo, también se ha propuesto el uso de la micropropagación como una herramienta valiosa en la conservación de especies amenazadas o vulnerables, pues las plantas generadas a través de esta tecnología pueden mantenerse en bancos de germoplasma *in vitro* o transferirse a jardines botánicos para su conservación *ex situ* a mediano y largo plazo; y también pueden emplearse para reforestación y reintroducción de especies a sus hábitats naturales (Kulak *et al.*, 2022; Loyola-Vargas & Ochoa-Alejo, 2012). Cruz-Cruz *et al.* (2013) señalan que la germinación *in vitro* se ha venido utilizado para un número creciente de especies amenazadas. Para estos propósitos sería fundamental iniciar con el mayor número posible de genotipos para preservar la diversidad genética tanto como sea posible, y en este contexto, el uso de semilla es no solo adecuado sino deseable.

Mediante la prueba de Bonferroni se evaluaron los parámetros asociados a desarrollo de las plántulas durante 44 semanas, y se encontraron diferencias significativas en el peso fresco, número de hojas, área foliar y longitud de la raíz principal entre las plántulas de *A. karwinskii* cultivadas *in vitro* y aquellas cultivadas en invernadero; el peso seco, el espesor y la longitud de la primer hoja también fueron mayores en las plantas cultivadas *in vitro*, pero la diferencia no fue significativa. En *A. angustifolia* todos los parámetros evaluados fueron mayores transcurridas las 44 semanas, pero solo se observaron diferencias estadísticamente significativas en el peso seco y el número de hojas. En general, las plantas del género *Agave* crecen lentamente, consecuencia directa de sus adaptaciones fisiológicas para sobrevivir en condiciones desfavorables,

particularmente estrés hídrico. En cambio, el cultivo *in vitro* provee de condiciones muy favorables para el crecimiento y desarrollo de las plantas, en especial un aporte suficiente de agua y una humedad relativa del 100 % dentro de los recipientes de cultivo; esto explica que en las dos especies estudiadas las plántulas germinadas y cultivadas *in vitro* experimentaron un mayor crecimiento que aquellas germinadas en sustrato en condiciones de invernadero. Sin embargo, es notable que las diferencias en el desarrollo fueron más acusadas en *A. karwinskii*.

Los agaves son notables por exhibir una gran plasticidad fenotípica en respuesta a diversas condiciones ambientales, así que es de esperarse que presenten importantes diferencias en el ambiente *in vitro*, profundamente distinto a su hábitat natural. El índice estomático (IE) fue similar en las plántulas germinadas en condiciones *in vitro* y *ex vitro*; en ambas especies el IE de la superficie abaxial fue ligeramente mayor en las plántulas *in vitro*, mientras que el IE de la superficie adaxial fue un poco mayor en las plántulas *ex vitro*. En todos los casos el IE presentó un rango entre 3.93 – 6.48, similar a lo reportado en *A. tequilana*, de 5.72 - 6.68 (Hernández-Valencia *et al.*, 2003), aunque menor que en otras especies de agaves, como *A. salmiana*, de 10.61 - 14.15 (Pérez España *et al.*, 2022), y mucho menor que lo reportado para otras monocotiledóneas, como *Dasyllirion cedrosanum* Trel. con un rango de 17.1 - 23.3 (Francisco-Francisco *et al.*, 2016). Las hojas de plántulas de invernadero tanto *A. angustifolia* como en *A. karwinskii* presentaron más estomas en la superficie adaxial que en la abaxial, lo cual ha sido previamente reportado para el género *Agave* (Nobel, 1988); pero en las hojas tanto de *A. angustifolia* como de *A. karwinskii* de plantas cultivadas *in vitro* el índice estomático fue mayor para la superficie abaxial que para la adaxial (tabla 2); este fenómeno también se ha observado en vitroplantas de otras especies, como *Wrightia tomentosa* (Joshi *et al.*, 2006).

*A. angustifolia* y *A. karwinskii*, tanto *in vitro* como en invernadero, presentaron estomas tetracíclicos; sin embargo, las plántulas de invernadero presentaron estomas hundidos, característica adaptativa de agaves y otras plantas para disminuir la pérdida de agua a través de la superficie foliar (Chávez-Güitrón *et al.*, 2019; Gray *et al.*, 2020); además, durante el día todos se presentaron cerrados. En cambio, los estomas de las plántulas cultivadas *in vitro* no se mostraron hundidos, y abiertos en las muestras se tomaron durante el día, lo que sugiere atrofia del mecanismo de cierre de estomas, fenómeno que ya se ha reportado para tejidos vegetales cultivados *in vitro* (Polivanova & Bedarev, 2022). Además, la deposición de cera fue mayor en las plántulas cultivadas *ex vitro* de ambas especies.

En suma, el cultivo *in vitro* ofrece a los tejidos vegetales condiciones óptimas en cuanto a disponibilidad de nutrientes, temperatura, fotoperiodo y, de manera muy relevante para el género *Agave*, disponibilidad de agua y muy alta humedad relativa dentro del recipiente de cultivo. Estas mismas condiciones son responsables de una serie de alteraciones morfológicas frecuentes en todas las especies vegetales cultivadas *in vitro*, pero que resultan particularmente notables en los agaves; además, la ausencia de factores de estrés a los que normalmente se enfrenta este grupo de plantas en su hábitat natural resulta en la ausencia o disminución de características adaptativas en los órganos formados *in vitro*, como la ausencia de suculencia foliar, la disminución en la deposición de grasa epicuticular, la desregulación de los estomas, por mencionar las más importantes. En conjunto, todos estos fenómenos confluyen en un mayor crecimiento de las plántulas *in vitro*, en comparación a las de invernadero; sin embargo, las hojas de agave generadas *in vitro*, como órganos individuales, son incapaces de adaptarse a las condiciones *ex vitro* y terminan muriendo; la supervivencia de la planta depende de que forme hojas nuevas en condiciones *ex vitro* antes de perder las hojas generadas *in vitro* (Cruz García *et al.*, 2017).

No obstante, todas estas alteraciones morfológicas y fisiológicas de las vitroplantas de agave se compensan con creces por la alta cantidad de brotes que se pueden generar en cortos periodos de tiempo mediante distintos protocolos de micropropagación (Arzate-Fernández & Mejía-Franco, 2011; Bautista-Montes *et al.*, 2022; Domínguez-Rosales *et al.*, 2008). Estas alteraciones deben tomarse en cuenta en la etapa de adaptación a suelo, y también es deseable desarrollar metodologías que permitan que las vitroplantas tengan un desarrollo y morfologías más similares a plantas *ex vitro*, por ejemplo, empleando biorreactores de inmersión temporal o condiciones fotomixotróficas, que permitirían obtener vitroplantas capaces de adaptarse con mayor facilidad al medio externo.

## CONCLUSIONES

El cultivo de tejidos vegetales *in vitro*, particularmente la micropropagación, son herramientas muy útiles a considerar en los esquemas para el aprovechamiento económico, pero también en estrategias de conservación de especies vegetales, pues permiten la generación de plantas en un periodo muy corto de tiempo; estas tecnologías son particularmente valiosas en el caso de especies que tienen ciclos reproductivos muy largos y tasas de reproducción muy bajas, como los agaves. Para implementar exitosamente estas técnicas es importante considerar las características particulares de las vitroplantas, así como el uso a que se destinarán. En este estudio se encontró que las plántulas de *A. angustifolia* y *A. karwinskii* germinadas *in vitro* presentan mayor crecimiento que las germinadas en condiciones invernadero; pero muestran alteraciones que resultan desfavorables en condiciones *ex vitro*, como ausencia de succulencia foliar, escasa deposición de cera epicuticular, y estomas atrofiados. Es importante considerar estas características durante la etapa de aclimatación y adaptación a suelo de las vitroplantas para incrementar las probabilidades de supervivencia de ejemplares generados mediante protocolos de propagación *in vitro*.

## AGRADECIMIENTOS

Gracias a la Universidad Autónoma de Aguascalientes por el financiamiento a través del proyecto PIBT-18-2; a la Biól. Araceli Adabache Ortiz por las fotografías en el microscopio electrónico de barrido y el procesamiento previo de las muestras, y al Dr. Alberto Isaac Reyes Silva por su valioso apoyo en los experimentos en invernadero.

## LITERATURA CITADA

- Aliniaiefard, S., Asayesh, Z. M., Driver, J., & Vahdati, K. (2020). Stomatal features and desiccation responses of Persian walnut leaf as caused by *in vitro* stimuli aimed at stomatal closure. *Trees*, 34(5), 1219–1232. <https://doi.org/10.1007/s00468-020-01992-x>
- Arzate-Fernández, A., & Mejía-Franco, R. (2011). Capacidad embriogénica de callos inducidos en ejes embrionarios cigóticos de *Agave angustifolia* Hawth. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 34, 101–106.
- Bautista-Montes, E., Hernández-Soriano, L., & Simpson, J. (2022). Advances in the Micropropagation and Genetic Transformation of *Agave* Species. *Plants*, 11(13), 1757. <https://doi.org/10.3390/plants11131757>
- Cassells, A. C. (2012). Pathogen and biological contamination management in plant tissue culture: phytopathogens, *in vitro* pathogens and *in vitro* pests. In V. M. Loyola-Vargas & N. Ochoa-Alejo (Eds.), *Plant Cell Culture protocols* (3a ed., pp. 57–80). Springer.
- Consejo Mexicano Regulador de la Calidad del Mezcal (COMERCAN). (2024). *Informe Estadístico 2024*. [https://Comercam-Dom.Org.Mx/Wp-Content/Uploads/2024/04/PUBLICO\\_INFORME\\_2024.Pdf](https://Comercam-Dom.Org.Mx/Wp-Content/Uploads/2024/04/PUBLICO_INFORME_2024.Pdf).
- 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. <https://doi.org/10.29312/remexca.v8i2.58>
- Cruz-Cruz, C., González-Arno, M., & Engelmann, F. (2013). Biotechnology and Conservation of Plant Biodiversity. *Resources*, 2(2), 73–95. <https://doi.org/10.3390/resources2020073>
- Delgado-Lemus, A., Casas, A., & Téllez, O. (2014). Distribution, abundance and traditional management of *Agave potatorumin* the Tehuacán Valley, Mexico: bases for sustainable use of non-timber forest products. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 10(1), 63. <https://doi.org/10.1186/1746-4269-10-63>

**Recibido:**  
2/julio/2024

**Aceptado:**  
21/noviembre/2024

- Domínguez-Rosales, M. S., Alpuche-Solís, A. G., Vasco-Mendez, N. L., & Pérez-Molphe-Balch, E. (2008). Efecto de citocininas en la propagación *in vitro* de agaves mexicanos. *Revista Fitotecnica Mexicana*, 31(4), 317–322.
- Francisco-Francisco, N., García-Osuna, H. T., Benavides-Mendoza, A., Hernández-Juárez, A., & Ramírez-Godina, F. (2016). Morfología y anatomía foliar de *Dasyliirion cedrosanum* en diferentes etapas de Desarrollo. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 7(7), 1679–1687.
- Fredrick, C., Muthuri, C., Ngamau, K., & Sinclair, F. (2015). Provenance variation in seed morphological characteristics, germination and early seedling growth of *Faidherbia albida*. *Journal of Horticulture and Forestry*, 7(5), 127–140.
- García-Mendoza, A. J. (2007). Los agaves de México. *Ciencias*, 87, 14–23.
- Hernández-Valencia, R., López-Franco, R., & Benavides-Mendoza, A. (2003). Micromorphology of the foliar epidermis of *Agave tequilana* Weber. *Agrofaz*, 3, 387–396.
- Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI). (2019). *Conociendo la Industria del tequila y el mezcal*. [https://www.Inegi.Org.Mx/Contenido/Productos/Prod\\_serv/Contenidos/Espanol/Bvinegi/Productos/Nueva\\_estruc/702825189600.Pdf](https://www.Inegi.Org.Mx/Contenido/Productos/Prod_serv/Contenidos/Espanol/Bvinegi/Productos/Nueva_estruc/702825189600.Pdf).
- Joshi, P., Joshi, N., & Purohit, S. (2006). Stomata characteristics during micropropagation of *Wrightia tomentosa*. *Biologia Plantarum*, 50, 275–278.
- Kulak, V., Longboat, S., Brunet, N. D., Shukla, M., & Saxena, P. (2022). *In Vitro* Technology in Plant Conservation: Relevance to Biocultural Diversity. *Plants*, 11(4), 503. <https://doi.org/10.3390/plants11040503>
- Loyola-Vargas, V. M., & Ochoa-Alejo, N. (2012). An introduction to plant cell culture: the future ahead. In V. M. Loyola-Vargas & N. Ochoa-Alejo (Eds.), *Plant Cell Culture protocols* (3a ed., pp. 57–80).
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473–497.
- Nobel, P. S. (1988). *Environmental Biology of Agaves and Cacti*. Cambridge University Press.
- Pérez España, V. H., Cuervo Parra, J. A., Aparicio Burgos, J. E., Morales Ovando, M. A., & Romero Cortes, T. (2022). Importancia de la capa cuticular durante la colonización del hongo causante de la negrilla en *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck ssp. *salmiana*. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 13(70). <https://doi.org/10.29298/rmcf.v13i70.1265>
- Polivanova, O. B., & Bedarev, V. A. (2022). Hyperhydricity in Plant Tissue Culture. *Plants*, 11(23), 3313. <https://doi.org/10.3390/plants11233313>
- Ramírez-Tobías, H. M., Peña-Valdivia, C. B., Trejo, C., Aguirre-R., J. R., & Vaquera-H., H. (2014). Seed germination of *Agave* species as influenced by substrate water potential. *Biological Research*, 47(11).
- Romano, A., & Stevanato, P. (2020). Germination Data Analysis by Time-to-Event Approaches. *Plants*, 9(5), 617. <https://doi.org/10.3390/plants9050617>
- Vázquez-Pérez, N., Blancas, J., Torres-García, I., García-Mendoza, A., Casas, A., Moreno-Calles, A. I., Maldonado-Almanza, B., & Rendón-Aguilar, B. (2020). Conocimiento y manejo tradicional de *Agave karwinskii* en el sur de México. *Botanical Sciences*, 98(2), 328–347. <https://doi.org/10.17129/botsci.2421>
- Villegas-Monter, A., & Castro Garibay, S. L. (2024). Disinfestation of *Agave angustifolia* Haw. collected in the field prior to *in vitro* culture. *Agro Productividad*. <https://doi.org/10.32854/agrop.v16i12.2299>