



EFFECTO DE DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO EN LA MICROPROPAGACIÓN DE *Agave karwinskii* Y *A. marmorata*

EFFECT OF DIFFERENT CULTURE MEDIA IN THE MICROPROPAGATION OF *Agave karwinskii* AND *A. marmorata*

Fanny E. Nolasco-Jáuregui¹, Eugenio Pérez-Molphe-Balch¹, Araceli Rodríguez-Sahagún² y Lucía I. Chávez-Ortiz^{1*}

¹Universidad Autónoma de Aguascalientes, Unidad de Biotecnología Vegetal. Aguascalientes, Aguascalientes, México. ²Universidad de Guadalajara, Centro de Investigación en Biología Molecular Vegetal, Centro Universitario de la Ciénega. Ocotlán, Jalisco, México.

*Autor de correspondencia (isabel.chavezo@edu.uaa.mx)

RESUMEN

Agave karwinskii y *A. marmorata* son dos especies endémicas de Puebla y Oaxaca, México, utilizadas principalmente para la elaboración de mezcal artesanal, por lo que están sujetas a una creciente explotación que compromete la conservación de sus poblaciones naturales. La propagación *in vitro* ha demostrado ser una herramienta eficiente para la multiplicación de material vegetal para permitir la explotación racional de estas especies. A la fecha, todas las investigaciones realizadas en la propagación *in vitro* de agaves han empleado el medio de cultivo Murashige y Skoog (MS); no obstante, es de interés explorar si el uso de otros medios de cultivo puede incrementar la eficiencia de estos sistemas. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de cuatro medios basales, MS, Linsmaier y Skoog (LS), Gamborg (B5) y Driver y Kunikuki (DKW) en la generación de brotes, enraizamiento y supervivencia *ex vitro* de *A. karwinskii* y *A. marmorata*. Los promedios más altos de brotes por explante se obtuvieron en los medios MS y LS (4.46 y 4.03, respectivamente, en *A. karwinskii*; y 12.1 y 7.21 brotes en *A. marmorata*). Para *A. marmorata*, la mayor longitud promedio de las raíces se obtuvo en medio LS (6.4 cm), y para *A. karwinskii* en DKW (11 cm). Para *A. karwinskii* la mayor tasa de supervivencia en suelo se presentó en plántulas generadas en MS (100 %), seguida del medio LS (87.50 %). En *A. marmorata*, el mayor porcentaje de supervivencia se registró en el medio LS, alcanzando 93.52 %, además de ser el único medio donde no se presentó hiperhidratación. Se concluye que para la micropropagación de *A. marmorata* es mejor utilizar medios de cultivo MS para la multiplicación y el medio LS para enraizamiento, mientras que para *A. karwinskii* el medio MS fue la mejor opción en todas las etapas.

Palabras clave: Agaves mezcaleros, cultivo *in vitro*, Driver y Kunikuki, Gamborg, Linsmaier y Skoog.

SUMMARY

Agave karwinskii and *A. marmorata* are two endemic species of Puebla and Oaxaca, Mexico, used mainly for the preparation of artisanal mezcal, therefore, they are subject to increasing exploitation that compromises the preservation of their natural populations. *In vitro* propagation has proven to be an efficient tool for the multiplication of plant material allowing rational exploitation of these species. To date, all research conducted on the *in vitro* propagation of agaves has used the culture medium Murashige and Skoog (MS); however, it is interesting to explore whether the use of other culture media can increase the efficiency of these systems. The objective of this study was to evaluate

the effect of four basal media, MS, Linsmaier and Skoog (LS), Gamborg (B5), and Driver and Kunikuki (DKW) on shoot generation, rooting, and *ex vitro* survival of *A. karwinskii* and *A. marmorata*. The highest averages of shoots per explant were observed in the MS and LS media (4.46 and 4.03, respectively, in *A. karwinskii*, and 12.1 and 7.21 shoots in *A. marmorata*). For *A. marmorata*, the highest average root length was achieved in LS medium (6.4 cm) and for *A. karwinskii* in DKW (11 cm). For *A. karwinskii*, the highest survival rate in soil was observed in seedlings grown in MS (100 %), followed by LS medium (87.50 %). In *A. marmorata*, the highest survival rate was recorded in the LS medium, reaching 93.52 %, in addition to being the only medium where hyperhydration did not occur. It is concluded that for the micropropagation of *A. marmorata*, it is better to use MS culture media for multiplication and LS medium for rooting, while for *A. karwinskii* the MS medium was the best option at all stages.

Index words: Driver and Kunikuki, Gamborg, *in vitro* culture, Linsmaier and Skoog, mezcal agaves.

INTRODUCCIÓN

La gran mayoría de los agaves son especies endémicas de México; en la actualidad, su importancia económica radica en la diversidad de usos, siendo el principal la producción de bebidas alcohólicas (Alducin-Martínez et al., 2023; González, 2023). Si bien el tequila destaca como la bebida emblemática de México, el mezcal ha ganado popularidad en los últimos años, al experimentar un crecimiento notable en producción y exportación, especialmente en la última década (COMERCAM, 2025). El incremento en la demanda de mezcal ha resultado en una gran presión sobre las poblaciones naturales de las aproximadamente 50 especies que se utilizan en su elaboración, ya que en muchos casos se emplean individuos de poblaciones silvestres, lo que compromete su conservación. Aún en las especies que reciben alguna forma de manejo se está llevando a cabo una explotación intensiva que está afectando la diversidad biocultural de los propios agaves, así como a los ecosistemas naturales

de los que forman parte, debido a incendios forestales provocados, deforestación y otras prácticas orientadas al cambio de uso del suelo (Lucio, 2022; Ruiz-Mondragón et al., 2024; Vázquez-Pérez et al., 2020).

Agave karwinskii y *A. marmorata* son dos de las especies que se utilizan para elaborar mezcal artesanal, muy apreciadas por sus propiedades organolépticas, ambas endémicas de Puebla y Oaxaca, México. El estatus de conservación de *A. karwinskii* es vulnerable, aunque algunos etnotaxones reciben algún tipo de manejo, se están explotando intensivamente, por lo que sus poblaciones naturales experimentan un decremento (García-Mendoza et al., 2025; Vázquez-Pérez et al., 2020). Por su parte, *A. marmorata* tarda aproximadamente 35 años en alcanzar la madurez sexual, y su propagación clonal es esporádica, lo que aunado a su sobreexplotación ha resultado en la disminución de las poblaciones naturales, aunque su estatus de conservación aún se considera de menor preocupación (García-Mendoza et al., 2019; Ruiz-Mondragón et al., 2024).

Como herramienta para el manejo racional de los agaves destinados a la producción de mezcal se ha propuesto la micropropagación para generar un alto número de ejemplares (Pérez Molphe, 2022). Hay un creciente número de estudios que reportan el uso de reguladores de crecimiento vegetal (RCV), particularmente citocininas, para la propagación *in vitro* de diversas especies de agave (Álvarez-Aragón et al., 2020; Arzate-Fernández et al., 2020). Otro factor clave para el éxito de la micropropagación es el medio basal de cultivo, pues contiene los nutrientes que requieren los tejidos vegetales, principalmente en forma de sales minerales, además de una fuente de carbono y vitaminas. El medio usado comúnmente es el MS (Murashige y Skoog, 1962), desarrollado para tabaco. No obstante, las demandas nutricionales varían de una especie a otra, incluso dentro de un mismo género o familia, por lo que resulta plausible que algunas especies vegetales podrían beneficiarse de diferentes concentraciones o formas de administrar algunos nutrientes (Abdel-Kawy et al., 2018; Gati et al., 2021; Rudyanto et al., 2021). A pesar de esto, el uso de medios de cultivo distintos del MS ha sido poco explorado. En agaves no hay ningún estudio publicado empleando medios de cultivo distintos del MS, aunque sí hay estudios en los que se modificó la concentración de algunas de las sales inorgánicas del propio medio MS, como los de Miguel et al. (2013) y Chávez-Cruz et al. (2025); destaca el trabajo de Castro-Concha et al. (1990) en el que disminuyeron la concentración del nitrógeno orgánico (NH_4NO_3) del medio de cultivo MS.

Considerando que para algunas especies de *Agave* la cantidad de brotes por explante que se pueden obtener en un proceso de propagación *in vitro* es muy baja, cualquier incremento en la cantidad o calidad de los brotes en su desarrollo o en su supervivencia durante el proceso de aclimatización es valioso, y resulta de gran interés explorar opciones con el potencial de incrementar la cantidad, calidad o supervivencia de plántulas de *Agave* generadas *in vitro*. El objetivo de esta investigación fue evaluar si el medio basal empleado afecta la cantidad o calidad de los brotes generados en la propagación *in vitro* de *A. karwinskii* y *A. marmorata*, bajo la hipótesis de que el medio MS puede no ser el más adecuado para la propagación *in vitro*, o alguna de sus etapas, en las especies estudiadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

El material vegetal empleado fueron semillas de *A. karwinskii* Zucc. recolectadas en el área de Santiago Matatlán, Oaxaca, México (16° 51' 58" N y 96° 23' 00" O), y de *A. marmorata* Roezl procedentes del área de Zapotitlán de las Salinas, Puebla, México (18° 19' 55" N y 97° 28' 28" O).

Desinfección de semilla

Las semillas se sumergieron en una solución de plata ionizada (Microdyn, Nuevo León, México) diluida en agua destilada (7 gotas por 100 mL) durante 20 min; posteriormente, se realizaron tres lavados de 5 min cada uno con una solución de 10 mL L⁻¹ de jabón líquido antiséptico (Antibenzil, Ciudad de México, México), seguido de un enjuague con etanol 70 % por 45 s. Tras un nuevo enjuague con agua destilada, se desinfectaron en solución de hipoclorito de sodio 1.08 % (v/v) durante 20 min en un recipiente cubierto con papel aluminio.

La solución de hipoclorito de sodio se decantó en campana de flujo laminar, y las semillas se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril; éstas se colocaron en frascos de vidrio con medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) a pH de 5.7, suplementado con 3 % (p/v) de sacarosa y 9 g L⁻¹ de agar (Sigma-Aldrich, España). Los frascos con el medio de cultivo se esterilizaron en autoclave (Geo-Lab, CV-250, México) a 120 °C, 15 min, 1.2 kg cm⁻². Se colocaron de cinco a siete semillas por frasco, los cuales se sellaron con plástico autoadherible y se incubaron a 25 ± 2 °C durante 3-4 meses con fotoperiodo de 16 h luz/8 h de oscuridad.

Medios de cultivo

Tanto para la etapa de multiplicación como de enraizamiento se usaron cuatro medios de cultivo: MS (Murashige y Skoog, 1962), LS (Linsmaier y Skoog, 1965), B5 (Gamborg *et al.*, 1976) y DKW (Driver y Kunikuni, 1984; McGranahan *et al.*, 1987). El medio MS se preparó empleando los compuestos indicados por Murashige y Skoog (1962), y se utilizaron los medios LS (L689), B5 (G398) y DKW (D2470) de PhyTotech Labs (Overland Park, Kansas, EUA).

Cada medio de cultivo fue suplementado con 30 g L⁻¹ de sacarosa, 9 g L⁻¹ de agar (SigmaAldrich, España) y 2 g L⁻¹ de benciladenina (PhytoTech Labs, Overland Park, Kansas, EUA); se omitió esta última para los medios destinados a la etapa de enraizamiento. El pH se ajustó a 5.7 usando NaOH o HCl 1 M y se esterizaron en autoclave (Geo-Lab, CV-250, México) a 120 °C por 15 min, 1.2 kg cm⁻². Para cada tratamiento se distribuyeron 50 mL de cada medio de cultivo en 20 frascos de vidrio transparente de 250 mL con tapa de plástico transparente, permaneciendo en condiciones controladas (25 ± 2 °C, fotoperiodo 16h luz/8h oscuridad).

Multiplicación

Para cada especie y tratamiento se seleccionaron aleatoriamente 40 plántulas. En campana de flujo laminar se eliminaron las porciones distales de las hojas y la raíz para obtener explantes basales; se colocaron dos explantes por frasco, introduciendo la base de los mismos en el medio con el fin de mantenerlos en posición vertical. Transcurrido el periodo de cultivo, los brotes obtenidos de cada explante fueron separados, contados y medidos en su longitud.

Enraizamiento y supervivencia

Los brotes generados en la multiplicación se separaron e inocularon de la forma antes descrita en el medio para enraizamiento. Después de tres meses de incubación en las condiciones antes señaladas, se retiraron del medio y se lavaron con agua de grifo para eliminar residuos de agar. Se midió la longitud de la parte aérea y de la raíz de cada planta.

Los brotes obtenidos de cada especie se mantuvieron cinco días en recipientes tapados a temperatura ambiente, con periodos de 16 h de luz y 8 h de oscuridad; posteriormente, se trasladaron a invernadero donde se colocaron en macetas con una mezcla de sustrato compuesta por tierra para maceta (ProMix, Canadá) y perlita 1:1 (v/v), manteniendo el sustrato húmedo de manera constante.

Diseño experimental y análisis estadístico

En la etapa de multiplicación se utilizaron 40 explantes para cada tratamiento (medio de cultivo) en un diseño completamente al azar. Se analizó el número de brotes obtenidos por explante y la longitud de estos, mientras que en el enraizamiento se utilizaron todos los brotes generados, por lo que el número de repeticiones varió en función de la cantidad de brotes generados en cada tratamiento, y las variables evaluadas fueron la longitud de la parte aérea y la longitud de la raíz de cada plántula, esto para cada medio de cultivo. Los experimentos se desarrollaron y los datos se analizaron de manera independiente en cada una de las especies. Para cada variable se realizó una comparación de medianas de Kruskal-Wallis para muestras no paramétricas, junto con la prueba de comparación múltiple de Dunn, utilizando un nivel de significancia de $P \leq 0.05$ en ambos. En cuanto a las plantas transferidas a sustrato, después de 60 d se determinó el porcentaje de supervivencia para cada tratamiento y medio de cultivo en ambas especies. El análisis estadístico se realizó con el software GraphPad Prism 8.0.

RESULTADOS

Multiplicación

Germinó el 99.64 % de las semillas de *A. karwinskii* y el 98.63 % de *A. marmorata*. Se seleccionaron 160 plántulas de cada especie para obtener los explantes utilizados en la etapa de multiplicación.

El crecimiento de brotes comenzó a observarse aproximadamente a los 20 d y los resultados finales se registraron a los 90 d de incubación (Figura 1). En cuanto al número de brotes, se observó un comportamiento similar en ambas especies (Figura 2), ya que en los medios de cultivo MS y LS el promedio de brotes por explante fue significativamente mayor que en B5; en DKW también se generó una menor cantidad de brotes, pero la diferencia no fue estadísticamente significativa con respecto a MS y LS.

En relación con la longitud de los brotes, en el medio LS se presentó la mayor longitud promedio para *A. karwinskii*, mientras que *A. marmorata* mostró la mayor longitud promedio de los brotes en el medio DKW (Figura 1). Además de la presencia de brotes normales, se observaron otras respuestas como hiperhidricidad, masas de brotes, formación de tejido calloso, oxidación y necrosis. Aunque se presentó hiperhidratación en todos los medios probados, tanto en los explantes originales como en los brotes generados (Figura 3B), esta ocurrió solo en un pequeño porcentaje de ellos (Cuadro 1). Se consideró como brote normal todo aquel brote nuevo cuyo tejido no se observó

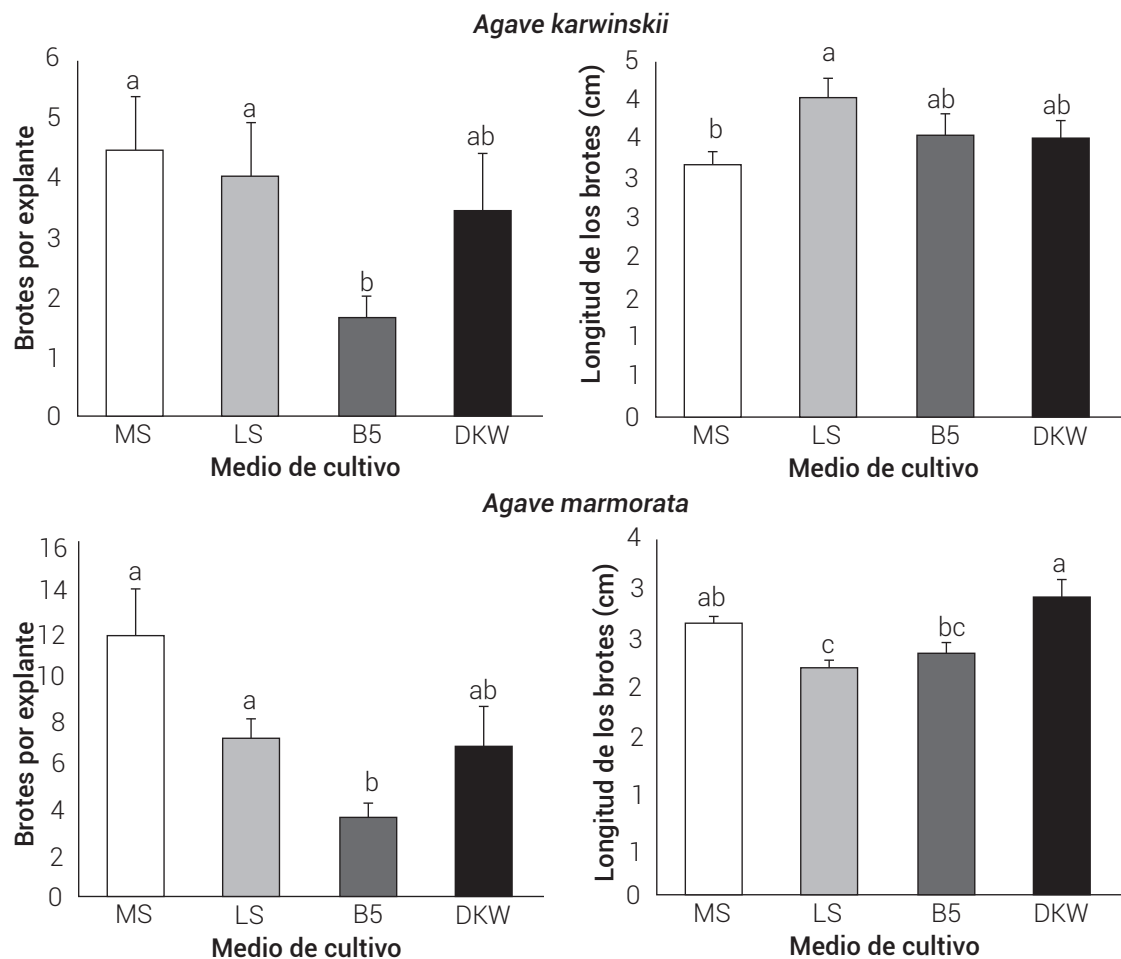


Figura 1. Promedio de brotes por explante (izquierda) y longitud promedio de los brotes (derecha) en diferentes medios de cultivo de *A. karwinskii* y *A. marmorata*. Las barras representan el error estándar y letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Dunn ($P < 0.05$); $n = 40$ para todos los tratamientos.

hiperhidratado, deforme, dañado, necrosado u oxidado (Figura 3A). Los brotes que presentaron las condiciones mencionadas fueron descartados para las siguientes etapas de la investigación.

Por otro lado, se obtuvieron masas de brotes en ambas especies, también llamados conglomerado de brotes (Chávez-Ortiz *et al.*, 2021), se trata de cúmulos de brotes que aún no es posible distinguir individualmente, y en consecuencia, no se pueden medir ni separar, puede tratarse de brotes normales y viables (Figura 3C) en periodo de desarrollo, o bien, pueden ser primordios de brotes hiperhidratados (Figura 3B). En esta investigación se presentaron masas de brotes en los cuatro medios de cultivo, aunque solamente se cuantificaron las masas de brotes sanas; es decir, las que no tuvieron hiperhidratación.

En el caso de *A. karwinskii*, no se observó formación de tejido calloso ni necrosis en ningún medio de cultivo, y algunos brotes normales mostraron pequeñas raíces, con excepción del medio MS. Por su parte, en *A. marmorata* se presentó formación de tejido calloso en aproximadamente 2 % de los explantes en todos los medios; además, se observaron algunos explantes necrosados en los medios de cultivo LS y B5 (Cuadro 1).

Aunque la formación de tejido calloso no constituye necesariamente una respuesta negativa *per se*, ya que este tejido puede ser útil para otros procesos biotecnológicos, en el contexto de esta investigación se consideró como una respuesta no favorable. En contraste, la presencia de hiperhidratación o necrosis si representa un problema para la propagación.

Además de las respuestas mencionadas, algunos explantes tuvieron presencia de raíz desde la



Figura 2. Brotes generados después de 90 días en *A. karwinskii* (A-D) y *A. marmorata* (E-H) en los medios de cultivo MS (A y E), LS (B y F), B5 (C y G) y DKW (D y H). Cada cuadro equivale a 1 cm².

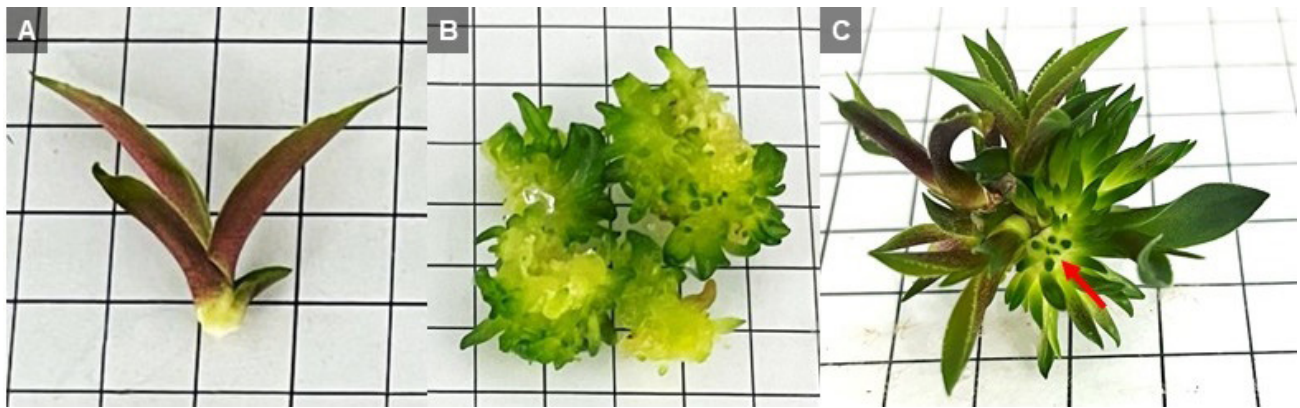


Figura 3. Respuestas observadas: A) brote normal de *A. marmorata* en medio B5, B) masa de brotes hiperhidratados de *A. marmorata* en medio de cultivo LS, C) masa de brotes (indicado con una flecha roja) de *A. marmorata* en medio MS. Cada cuadro equivale a 1 cm².

etapa de multiplicación, siendo en su mayoría de aproximadamente 2 cm de longitud. El desarrollo de raíz ocurrió en brotes normales e incluso en tejido calloso (Cuadro 1).

Enraizamiento y supervivencia.

Menos del 10 % de los brotes desarrollaron raíces en la etapa de multiplicación. Todos los brotes fueron separados y colocados en el mismo medio de cultivo en el que se generaron (MS, LS, B5 o DKW), ahora sin benciladenina, para inducir enraizamiento. En *A. karwinskii* se observó que

la longitud promedio de la parte aérea de las plantas al final de su periodo de incubación en medio para enraizamiento fue de 5.2 cm en el medio DKW (Figura 4), menos de la mitad del tamaño alcanzado en medio MS (13 cm); la diferencia fue estadísticamente significativa entre ambos medios; en cambio, no hubo diferencia entre el medio de cultivo MS y los medios de cultivo LS y B5. Respecto al desarrollo radicular, los brotes en los medios B5 y DKW presentaron raíces con una longitud significativamente superior en comparación con los otros dos ($P \leq 0.05$).

En *A. marmorata* se registraron diferencias significativas

Cuadro 1. Respuestas observadas después de 90 d en cada medio de cultivo por especie. Se muestra el porcentaje de explantes en los que se presentó cada respuesta. En un mismo explante pudieron observarse una, dos o más respuestas distintas.

	<i>A. karwinskii</i>				<i>A. marmorata</i>			
	MS	LS	B5	DKW	MS	LS	B5	DKW
Brotes normales	96.72	97.51	92.42	97.70	97.31	94.39	89.31	94.26
Masas de brotes	0.55	0.62	0.00	0.00	1.24	3.63	3.77	1.23
Tejido calloso	0.00	0.00	0.00	0.00	1.30	1.65	0.63	1.23
Hiperhidratación	1.09	1.24	3.03	2.30	0.41	0.00	4.40	3.28
Oxidación	1.64	0.62	4.54	0.00	0.00	0.00	0.63	0.00
Necrosis	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.33	1.26	0.00
Raíz	0.00	3.28	9.09	2.30	5.16	8.91	5.03	0.00

Medios de cultivo MS: Murashige y Skoog, LS: Linsmaier y Skoog, B5: Gamborg, DKW: Driver y Kunikuki.

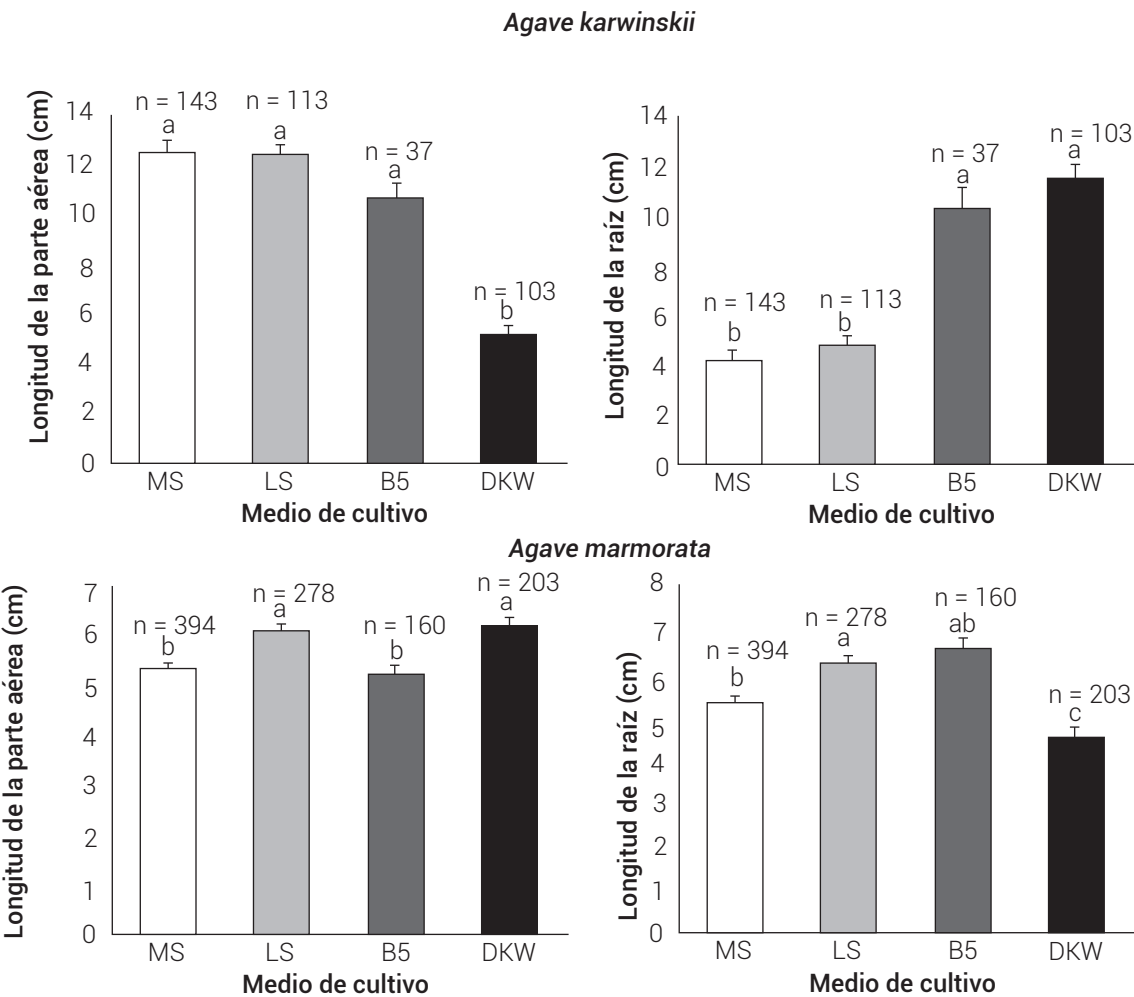


Figura 4. Longitud de la parte aérea (izquierda) y de la raíz (derecha) de los brotes enraizados *in vitro* de *A. karwinskii* y *A. marmorata*. Se muestran la media, el error estándar y el número de unidades experimentales (n) para cada tratamiento. Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Dunn ($P < 0.05$).

($P \leq 0.05$) en la longitud promedio de la parte aérea entre los medios LS y DKW frente a MS y B5; en este caso, las plantas cultivadas en medio LS presentaron el mayor crecimiento, tanto en la longitud de la parte aérea como en el desarrollo de raíces (Figura 4).

Los brotes de *A. marmorata* generados y enraizados en medio de cultivo LS presentaron el mayor porcentaje de supervivencia (Cuadro 2), lo que se puede atribuir al hecho de que en este medio fue donde se desarrolló mejor el sistema radicular desde la etapa de multiplicación (Cuadro 1). En *A. karwinskii* los brotes obtenidos en el medio de cultivo MS tuvieron un mejor desempeño *ex vitro*, pues el 100 % de las plantas sobrevivieron a los 60 días en invernadero.

Se observaron diferencias morfológicas evidentes entre las dos especies a lo largo de todas las etapas

del proceso de micropropagación. En fase *ex vitro*, las plántulas adaptadas presentaron hojas neomorfogénicas, diversificación radicular (raíces primarias y secundarias), y dimorfismo foliar evidente entre las hojas desarrolladas *in vitro* (láminas delgadas) versus aquellas formadas post-aclimatación. Estas variaciones interespecíficas reflejan distintos patrones de plasticidad fenotípica durante la transición a condiciones no controladas (Figura 5).

DISCUSIÓN

La gran mayoría de las investigaciones sobre el cultivo y propagación *in vitro* de diferentes especies de agave se han conducido empleando el medio MS, que, si bien funciona adecuadamente para la mayoría de las especies vegetales, no necesariamente es el óptimo para todas ellas; de hecho, se ha reportado que para algunas especies y para determinados protocolos, el uso de medios de

Cuadro 2. Porcentajes de supervivencia en cada medio de cultivo por tratamiento por especie después de 60 días en macetas con mezcla de peat moss y perlita (1:1).

Especie	Medio de cultivo			
	MS	LS	B5	DKW
<i>A. karwinskii</i>	100.0	81.3	80.6	70.8
<i>A. marmorata</i>	55.5	94.2	67.1	64.5

Medios de cultivo MS: Murashige y Skoog, LS: Linsmaier y Skoog, B5: Gamborg, DKW: Driver y Kunikuki.



Figura 5. Plantas de *A. karwinskii* (A-D) y *A. marmorata* (E-H) después de nueve meses de desarrollo *ex vitro*, micropropagadas en medio de cultivo MS (A y E), LS (B y F), B5 (C y G) y DKW (D y H). Cada línea equivale a 1 cm.

cultivo distintos del MS ha dado mejores resultados (Meira *et al.*, 2024). Explorar el uso de otros medios de cultivo tiene sentido, especialmente en especies como los agaves, que tienen requerimientos nutricionales muy distintos a los del tabaco, especie para la que se desarrolló el medio MS. Identificar un medio más adecuado para una especie vegetal podría acortar tiempos de producción o mejorar la calidad de las plántulas, lo que redundaría en mayor eficiencia en los procesos de propagación *in vitro* y, en consecuencia, se podrían disminuir los costos de producción.

El medio de cultivo Gamborg, también conocido como B5, tiene diferencias importantes en relación con el medio MS, entre ellas, se suprime la adición de amonio (NH_4), lo que altera la relación NO_3/NH_4 , además de contener el doble de vitaminas como ácido nicotínico, piridoxina y tiamina (Gamborg *et al.*, 1976; Murashige y Skoog, 1962). Para la obtención de nuevos brotes, el nitrógeno juega un papel principal (Meira *et al.*, 2024), y la relación NO_3/NH_4 es un factor fundamental en el proceso de diferenciación de los brotes, como lo señalaron Castro-Concha *et al.* (1990). El medio de cultivo Gamborg (B5) contiene una cantidad total de nitrógeno menor que la de los medios MS, LS y DKW, y es administrado exclusivamente en forma de nitratos, lo que explica que en este medio se obtuvieron los menores promedios de brotes por explante en ambas especies (Figura 1). Por otra parte, se observó mayor longitud promedio, tanto de la planta como de la raíz en *A. karwinskii* y de la raíz en *A. marmorata* (Figura 4). Según Rudyanto *et al.* (2021) y Gusmiaty *et al.* (2023), el nitrógeno puede promover el crecimiento vegetal, tanto en hoja como en tallo; además, la tiamina afecta el crecimiento radicular, ya que las vitaminas actúan como coenzimas, lo cual puede acelerar el crecimiento y elongación de las células meristemáticas, y así acelerar el desarrollo vegetal, especialmente el crecimiento de las raíces, lo que se ha observado en *Moringa oleifera* y en *Paraserianthes falcataria* (L.) Nielsen, respectivamente, y que coincide con lo observado en *A. karwinskii* y *A. marmorata* (Figura 4).

Por otro lado, el medio de cultivo DKW se creó para el desarrollo de especies leñosas, particularmente el nogal. En comparación con el medio MS, contiene mayores concentraciones de calcio (Ca), potasio (K), magnesio (Mg) y fósforo (P); en cuanto a las vitaminas, la concentración de ácido nicotínico y tiamina es mayor, pero carece de piridoxina; el nitrógeno se administra principalmente en forma de nitrato (Driver y Kunikuki, 1984; McGranahan *et al.*, 1987; Murashige y Skoog, 1962; Rudyanto *et al.*, 2021). Con DKW se obtuvieron mejores resultados que con medio MS en la multiplicación de *Stevia rebaudiana* Bertoni (Gati *et al.*, 2021) y *Moringa oleifera* Linn (Rudyanto *et al.*, 2021); en cambio, en el presente estudio no se encontraron

diferencias estadísticamente significativas en la cantidad de brotes de *A. karwinskii* y *A. marmorata* obtenidos en DKW en comparación con el medio MS, que resultó óptimo para ambas especies. En la etapa de enraizamiento, la longitud promedio de la raíz en *A. karwinskii* fue mayor al emplear DKW, lo que se puede atribuir a la mayor concentración de fósforo (P), el cual se ha asociado con un mejor desarrollo y crecimiento durante la etapa de enraizamiento (Cid, 2018; Gati *et al.*, 2021; Uribe *et al.*, 2008). En *A. marmorata* se observó mayor desarrollo foliar, lo que también fue reportado en estudios en estevia (Gati *et al.*, 2021), cacao (*Theobroma cacao*) (Ajijah, 2016) y moringa (Rudyanto *et al.*, 2021), atribuido a las concentraciones superiores de nitrógeno (N) y potasio (K) en el medio de cultivo DKW, pues ambos nutrientes favorecen la formación de nuevo tejido, la respiración, transpiración y otros procesos metabólicos.

El medio LS se caracteriza por la ausencia de glicina, ácido nicotínico y piridoxina (Linsmaier y Skoog, 1965; Murashige y Skoog, 1962). En *A. karwinskii* no hubo diferencias estadísticamente significativas en el promedio de brotes por explante entre los medios MS, LS y DKW, aunque el valor más alto se presentó en medio MS con 4.46; sin embargo, la longitud de los brotes generados en medio LS fue significativamente mayor. En *A. marmorata* en el medio MS se generó un promedio de 12.1 brotes por explante, aunque estadísticamente no hubo una diferencia con la cantidad de brotes generados en los medios LS y DKW, pero la longitud promedio de los brotes generados en LS fue significativamente menor. En la etapa de enraizamiento en *A. marmorata*, los mejores resultados se presentaron en el medio de cultivo LS, pues se observó mayor crecimiento de la parte aérea (longitud promedio de 6.2 cm) y de la raíz (longitud promedio de 6.4 cm), así como un mayor porcentaje de supervivencia (Cuadro 2).

En otras especies se ha reportado que en la etapa de multiplicación la adición de las vitaminas al medio de cultivo tiene una relación directa con el número y longitud de los brotes, así como con el número y desarrollo de hojas (Abdallah *et al.*, 2019) debido a su función como cofactores de enzimas en diferentes rutas metabólicas, y también a que la glicina es una fuente de aminoácidos (Meira *et al.*, 2024). En *A. karwinskii* y *A. marmorata* en medio LS, con menor concentración de vitaminas, fue mejor la respuesta en la etapa del enraizamiento, lo que podría deberse a que el verse obligadas a sintetizar sus propias vitaminas constituyó una especie de pre-endurecimiento para las plántulas.

Considerando el análisis de todas las variables evaluadas, el medio MS resultó más adecuado que los medios LS, B5 y DKW para todas las etapas de la micropropagación en *A. karwinskii*; en cambio, en *A. marmorata* se observaron

mejores resultados al utilizar medios MS en la etapa de multiplicación, pero las plántulas se desarrollaron mejor en medio LS en la etapa de enraizamiento.

El medio MS se emplea de manera rutinaria en casi cualquier investigación sobre propagación *in vitro*, pues resulta adecuado para la mayoría de las especies vegetales, entre ellas las pertenecientes al género *Agave*; no obstante, es de interés evaluar otros medios de cultivo diferentes del MS, considerando que los requerimientos nutricionales varían entre especies, e incluso en diferentes etapas del proceso de propagación *in vitro* dentro de la misma especie.

CONCLUSIONES

El medio de cultivo MS fue óptimo para la propagación *in vitro* de *Agave karwinskii*. Para *A. marmorata* el medio de cultivo óptimo durante la etapa de multiplicación fue el MS, pero en el enraizamiento, el medio LS favoreció un mayor crecimiento de los brotes, lo que a su vez resultó en un mayor porcentaje de supervivencia durante la aclimatación. El caso de *A. marmorata* ilustra la relevancia de explorar el uso de medios de cultivo distintos del MS, con objeto de buscar condiciones que incrementen la eficiencia de la propagación *in vitro*, así como la de plantear estrategias que contemplen el uso de distintos medios en diferentes etapas del proceso.

AGRADECIMIENTOS

A la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación por la beca de posgrado 904050 otorgada a la primera autora; a la Universidad Autónoma de Aguascalientes por el apoyo financiero a través del proyecto PIBT25-2; a la Dra. María Guadalupe Mata Martínez y al Dr. Alberto Isaac Reyes Silva por el apoyo técnico brindado.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdallah S. A. S., M. A. M. Ali, M. A. M. El-Mekawy and M. M. Abd El-Hameed (2019) Some factors affecting micropropagation of *Haplophyllum tuberculatum* L. Zagazig Journal of Agricultural Research 46: 635-647, <https://doi.org/10.21608/zjar.2019.40947>
- Abdel-Kawy W., Y. M. A. Fattah and A. A. Shoman (2018) Effect of media type and BAP concentrations on micropropagation during multiplication stage on ponytail palm (*Beaucarnea recurvata* Lem.). Hortscience Journal of Suez Canal University 7:41-45, <https://doi.org/10.21608/hjsc.2018.58333>
- Ajjah N. (2016) Effect of basal medium composition and explant type on the formation of cacao somatic embryo. Journal of Industrial and Beverage Crops 3:127-134, <https://doi.org/10.21082/jtidp.v3n3.2016.p127-134>
- Alducin-Martínez C., K. Y. Ruiz M., O. Jiménez-Barrón, E. Aguirre-Planter, J. Gasca-Pineda, L. E. Eguarte and R. A. Medellín (2023) Uses, knowledge and extinction risk faced by *Agave* species in Mexico. Plants 12:124, <https://doi.org/10.3390/plants12010124>
- Álvarez-Aragón C., A. M. Arzate-Fernández, S. Y. Martínez-Martínez and I. Martínez-Velasco (2020) Regeneración de plantas de *Agave marmorata* Roezl, vía embriogénesis somática. Tropical and Subtropical Agroecosystems 23:36, <https://doi.org/10.56369/tsaes.3117>
- Arzate-Fernández A. M., I. Martínez-Velasco, C. Álvarez-Aragón, S. Y. Martínez-Martínez y T. H. Norman-Mondragón (2020) Respuesta morfológica de dos especies de *Agave* regeneradas *in vitro*. Tropical and Subtropical Agroecosystems 23:47, <https://doi.org/10.56369/tsaes.3201>
- Castro-Concha L., V. M. Loyola-Vargas, J. L. Chan and M. L. Robert (1990) Glutamate dehydrogenase activity in normal and vitrified plants of *Agave tequilana* Weber propagated *in vitro*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 22:147-151, <https://doi.org/10.1007/BF00043690>
- Chávez-Cruz I. L., J. R. Enríquez-Valle, G. Rodríguez-Ortiz and G. V. Campos-Ángeles (2025) Shoots of *Agave nussavium* García-Mend. rooted by varying inorganic salts, IBA and incubation. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 15:e3205, <https://doi.org/10.29312/remexca.v15i8.3205>
- Chávez-Ortiz L. I., J. F. Morales-Domínguez, A. Rodríguez-Sahagún and E. Pérez-Molphe-Balch (2021) *In vitro* propagation of *Agave guineensis* Gentry using semisolid medium and temporary immersion bioreactors. Phytan-International Journal of Experimental Botany 90:1003-1013, <https://doi.org/10.32604/phyton.2021.012862>
- Cid M., D. Pina, I. Capote, M. Escalona y M. Daquinta (2018) Estrategias para disminuir la necrosis apical en la multiplicación y el enraizamiento *in vitro* del pistacho. Revista Colombiana de Biotecnología 18:97-105, <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v18n2.61527>
- COMERCAM, Consejo Mexicano Regulador de la Calidad del Mezcal (2025) Informe Estadístico 2024. Consejo Mexicano Regulador de la Calidad del Mezcal, A. C. Oaxaca, Oaxaca, México. 20 p.
- Driver J. A. and A. H. Kuniyuki (1984) *In vitro* propagation of Paradox walnut rootstock. HortScience 19:507-509, <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.19.4.507>
- Gamborg O. L., T. Murashige, T. A. Thorpe and I. K. Vasil (1976) Plant tissue culture media. In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant 12:473-478, <https://doi.org/10.1007/BF02796489>
- García-Mendoza A. J., A. Casas, I. Torres-García and D. Sandoval-Gutiérrez (2019) Pitsomel. *Agave marmorata*. The IUCN Red List of Threatened Species 2019. International Union for Conservation of Nature and Natural Resources. Gland, Switzerland. <https://doi.org/10.2305/IUCN.UK.2019-3.RLTS.T115645745A116354098.en> (July 2026).
- Gati E. D., S. Amien and N. Wicaksana (2021) Growth response of five cultivars stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) using comercial fertilizers as basic media *in vitro*. IOSR Journal of Agriculture and Veterinary Science 14 Ser. II:1-7, <https://doi.org/10.9790/2380-1406020107>
- González H. H. (2023) *Sycophorus acupunctatus* Gyllenhal plaga de los magueyes en México. In: Los Agaves y sus Derivados: Tendencias Científicas, Uso Sostenible y Patrimonio. R. M. Camacho R., A. Gutiérrez M. y A. C. Gschaedler M. (eds.). Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A. C. Guadalajara, Jalisco, México. pp:111-129.
- Gusmiaty, Syamsinar, M. Restu, Iswanto, N. Aida and S. H. Larekeng (2023) Effectiveness of media B5 (Gamborg) for multiplication of sengon (*Paraserianthes falcataria* L. Nielsen) *in vitro*. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science 1253:012048, <https://doi.org/10.1088/1755-1315/1253/1/012048>
- Linsmaier E. M. and F. Skoog (1965) Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 18:100-127, <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1965.tb06874.x>
- Lucio L. C. F. (2022) Los destilados de agave en México: una exploración desde la economía ecológica radical. Revista Iberoamericana de Economía Ecológica 35:21-38.
- McGranahan G. H., J. A. Driver and W. Tulecke (1987) Tissue culture of *Juglans*. In: Cell and Tissue Culture in Forestry Sciences, Vol. 24-26. J. M. Borge and D. J. Durzan (eds.). Springer. Dordrecht, The Netherlands. pp:261-271, https://doi.org/10.1007/978-94-017-0992-7_19
- Meira F. S., M. Shao, R. P. Niedz and J. G. Thomson (2024) Evaluation of 21 different media on shoot regeneration in 11 cultivars of *Citrus*

- using juvenile tissue. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 158: 8, <https://doi.org/10.1007/s11240-024-02785-7>
- Miguel L. M. E., J. R. Enríquez-del Valle, V. A. Velasco V., Y. Villegas A., J. C. Carrillo R. y G. Rodríguez O. (2013) Composición del medio de cultivo y la incubación para enraizar brotes de *Agave*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 6:1151-1159, <https://doi.org/10.29312/remexca.v0i6.1279>
- Murashige T. and F. Skoog (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473-497, <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Pérez Molphe B. E. (2022) Cultivo de tejidos vegetales. In: Algunas Aplicaciones Biotecnológicas en Plantas y Microalgas. J. F. Morales D. (coord.). Universidad Autónoma de Aguascalientes. Aguascalientes, México. pp:21-63, <https://doi.org/10.33064/UAA/978-607-8834-70-9>
- Rudiyanto, A. Purwito, D. Efendi and T. M. Ermayanti (2021) Growth response of four accessions of *Moringa oleifera* Linn shoots culture on various basic media. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* 741:012054, <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1755-1315/741/1/012054>
- Ruiz-Mondragón K. Y., A. Klimova, A. Valiente-Banuet, R. Lira and L. E. Eguiarte (2024) Evolution history and the importance of genomic diversity facing climate change. The case of *Agave marmorata* Roezl., a microendemic agave used for mezcal production. *Plants, People, Planet* 6:1381-1397, <https://doi.org/10.1002/ppp3.10532>
- Uribe M. E., C. Delaveau, M. Garcés y R. Escobar (2008) Efecto de asepsia y fitohormonas en el establecimiento *in vitro* de *Berberidopsis corallina*, a partir de segmentos nodales. *Bosque* 29:58-64, <https://doi.org/10.4067/S0717-92002008000100007>
- Vázquez-Pérez N., J. Blancas, I. Torres-García, A. García-Mendoza, A. Casas, A. I. Moreno-Calles, ... y B. Rendón-Aguilar (2020) Conocimiento y manejo tradicional de *Agave karwinskii* en el sur de México. *Botanical Sciences* 98:328-347, <https://doi.org/10.17129/botsci.2421>