



Universidad Michoacana de San
Nicolás de Hidalgo

Instituto de Investigaciones
Químico Biológicas



**Selección de bacterias promotoras del crecimiento
vegetal en la obtención de plantas de calidad
durante la aclimatación de vitroplantas de *Agave
cupreata***

Tesis que presenta:

Eréndira Tututi Guillén

Para obtener el grado de:

Maestra en Ciencias en Biología Experimental

Director de tesis:

D. C. Josué Altamirano Hernández

Sinodales:

D. C. Alfonso Luna Cruz

D. C. Eduardo Valencia Cantero

D. C. Homero Reyes de la Cruz

D. C. Luis López Pérez

Morelia, Michoacán. Febrero del 2024

El presente proyecto se llevó a cabo en el Laboratorio de Nutrición Vegetal del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, bajo la asesoría del D. C. Josué Altamirano Hernández, con el apoyo del Consejo Nacional de Humanidades Ciencia y Tecnología (CONAHCyT) a través de la beca 797428

Con amor dedico esta tesis a mis padres Norma Alicia Guillén Vargas y Eduardo Salvador Tututi Hernández, ya que sin ellos no sería lo que soy a día de hoy, gracias por el constante apoyo, por enseñarme tan valiosas lecciones a lo largo de mi vida y ser un maravilloso ejemplo a seguir, con el corazón agradezco la paciencia y confianza que han depositado en mí, así como todo lo que han hecho por nosotros. También a mis hermanos Lalo Tututi Guillén, Norma Tututi Guillén y Herlinda Tututi Guillén, que me han ayudado a crecer como persona y siempre han estado conmigo en mis peores y mejores momentos.

AGRADECIMIENTOS.

Quiero agradecer al D. C Josué Altamirano Hernández, por toda la paciencia, enseñanza y dedicación que siempre nos brinda a sus estudiantes y a mi, por aceptarme en su equipo de trabajo y aceptar ser mi director de tesis, gracias por siempre estar al pendiente de mi progreso, por sus consejos y exigencias y por su amabilidad, paciencia y apoyo, admiro la dedicación que le da a su trabajo como profesor investigador y es un gran modelo a seguir.

A mis sinodales, el D. C. Alfonso Luna Cruz, D. C. Eduardo Valencia Cantero, D. C. Homero Reyes de la Cruz y D. C. Luis López Pérez, gracias por sus observaciones, son una valiosa aportación a este trabajo, así como a mi formación como investigadora.

A mis queridísimos chicos de servicio y prácticas profesionales Brenda, Montse, Shirley, Sebas, Alexis, Daniel y Hernán, sin la ayuda de ustedes no sé qué habría sido de este proyecto, se los agradezco de corazón y quiero que sepan que aquí tienen una amiga en la cual pueden confiar.

A mis compañeros de laboratorio y queridos amigos Dani, Bris, Katy, Blanca, Paty, Brenda, Ame, Javi, Vivi, Karen, Rosita, David, Emmanuel, Fer, Yuri, Liz y Cristi gracias por los buenos momentos que pasamos en el laboratorio, nunca faltaron las risas aún en tiempos de angustia, gracias por sus valiosos consejos y apoyo moral que me dieron en todo momento.

A Salathiel, gracias por todo lo que has hecho por mí, por escucharme, apoyarme y hacer lo posible por verme feliz, gracias por siempre estar ahí, aunque no lo creas tu presencia es un gran apoyo para no hundirme y poder seguir dando todo lo mejor de mí. Eres una parte muy importante en mi vida.

A mis amigos de toda la vida Rocio, Isabel, Yessi, Mariana, Luis, Jerson, Sol, Karen, Alberto, Alejandro y Richard por los buenos momentos que pasamos siempre, por todo su apoyo y sus consejos, sé que siempre puedo contar con ustedes y quiero que sepan que también pueden contar conmigo, los quiero mucho y espero poder verlos más a menudo.

A mi familia Tututi y familia Guillén por siempre brindarme su amor y apoyo en todo lo que necesito.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT.....	2
1. INTRODUCCIÓN	3
2. ANTECEDENTES	5
2.1 El agave	5
2.1.1 Fisonomía y fisiología del agave	5
2.1.2 Beneficios del agave	7
2.1.3 Producción de mezcal en México	9
2.2 Agave y mezcal en Michoacán.....	10
2.2.1 <i>Agave cupreata</i>	12
2.3 Formas de propagación.....	14
2.3.1 Micropropagación de especies de agave	15
2.4 Aclimatación de vitroplantas de agave	18
2.4.1 Aclimatación vegetal por la biotización con rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal	20
2.4.1.1 Mecanismos de acción de las PGPR	22
2.4.1.2 Bacterias PGPR en plantas de agave	23
2.4.1.3 Bacterias PGPR en la fase de aclimatación	26
3. JUSTIFICACIÓN	28
4. OBJETIVOS.....	29
5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	30
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
6.1 Aislamiento y caracterización de las rizobacterias	31
6.1.1 Solubilización de fosfatos y calcio	32
6.1.2 Fijación biológica de nitrógeno	32

6.1.3 Producción de auxinas	33
6.1.4 Confrontación con <i>Fusarium</i> sp.....	34
6.1.1 Producción de exopolisacáridos (EPS)	35
6.2 Diseño de bioinoculantes	35
6.3 Aclimatación de <i>Agave cupreata</i>	36
6.3.1 Inoculación individual y en consorcio en plántulas de agave	37
6.3.2 Efecto de las rizobacterias en los parámetros morfológicos	38
6.3.3 Efecto de las rizobacterias en los parámetros bioquímicos.....	40
6.3.3.1 Clorofila	40
6.3.3.2 Fenoles.....	41
6.3.3.3 Cenizas, minerales y proteínas	42
6.4 Análisis estadístico	43
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44
7.1 Caracterización de las rizobacterias como promotoras del crecimiento	45
7.1.1 Solubilización de fosfatos	45
7.1.2 Solubilización de calcio	46
7.1.3 Fijación biológica de nitrógeno	47
7.1.4 Producción de auxinas	48
7.1.5 Producción de exopolisacáridos (EPS)	49
7.1.6 Antagonismo contra <i>Fusarium</i> sp.....	50
7.2 Efecto de las rizobacterias en los parámetros morfológicos de vitroplantas de <i>Agave cupreata</i> , durante la aclimatación	53
7.2.1 Altura de las vitroplantas	57
7.2.2 Diámetro de roseta	58
7.2.3 Diámetro del tallo	59
7.2.4 Desarrollo de las hojas	61

7.2.4.1 Número de hojas	61
7.2.4.2 Densidad estomática (DE).....	62
7.2.4.3 Epidermis	65
7.2.5 Longitud de raíces	67
7.2.6 Biomasa fresca total	68
7.2.7 Biomasa seca total	70
7.3 Efecto de las rizobacterias promotoras del crecimiento en parámetros bioquímicos	71
7.3.1 Clorofila a, b, total y carotenoides	71
7.3.2 Fenoles	75
7.3.3 Cenizas	76
7.3.4 Proteínas	78
7.3.5 Minerales (nitrógeno, fósforo y calcio).....	79
7.3.5.1 Nitrógeno.....	79
7.3.5.2 Calcio	80
7.3.5.3 Fósforo	82
7.4 Efecto de las rizobacterias en la sobrevivencia de plántulas <i>Agave cupreata</i> , durante la fase de aclimatación.....	83
7.5 Análisis conjunto de las variables analizadas.....	86
8. CONCLUSIONES	89
9. PERSPECTIVAS.....	89
10. REFERENCIAS	90

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cambio de color en la reacción del reactivo Salkowski con los metabolitos producidos por las bacterias.....	33
Tabla 2. Contenido nutrimental de la solución STEINER (INVERFARMS)	36
Tabla 3. Tratamientos de bioinoculantes individuales y en consorcio	38
Tabla 4. Descripción de las bacterias aisladas.....	44
Tabla 5. Caracterización <i>in vitro</i> de las rizobacterias con efecto como promotoras del crecimiento vegetal.....	51
Tabla 6. Porcentaje del contenido de minerales (N, P y Ca) y proteína en <i>A. cupreata</i>	79

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Producción y envasado histórico de mezcal en México	10
Figura 2. Distribución de <i>A. cupreata</i>	13
Figura 3. Etapas de la micropropagación mediante organogénesis directa	16
Figura 4. Beneficios de la biotización	21
Figura 5. Relación entre las PGPR y la zona radicular de las plantas	22
Figura 6. Mecanismos de acción de las bacterias promotoras del crecimiento vegetal	23
Figura 7. Influencia de la inoculación de bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre, en el crecimiento y contenido de azúcares de plantas de <i>A. potatorum</i>	25
Figura 8. Efecto de las rizobacterias promotoras del crecimiento en parámetros morfológicos de plantas micropropagadas de <i>Pouteria gardeneriana</i>	27
Figura 9. Diseño del ensayo de antagonismo de las rizobacterias con <i>Fusarium</i> sp.	35
Figura 10. Proceso de aclimatación	37
Figura 11. Efecto de las bacterias en parámetros morfológicos de plántulas de <i>A. cupreata</i>	39
Figura 12. Curva de calibración del ácido gálico	41
Figura 13. Curva de calibración del fósforo	43
Figura 14. Capacidad de las bacterias para solubilizar fosfatos	46
Figura 15. Ensayo de solubilización de calcio	47
Figura 16. Fijación biológica de nitrógeno	48
Figura 17. Producción de auxinas	49
Figura 18. Producción de exopolisacáridos por las bacterias aisladas	50
Figura 19. Confrontación de las rizobacterias analizadas contra <i>Fusarium</i> sp.	51
Figura 20. Efecto de las inoculaciones con rizobacterias en la morfología de las plántulas	55

Figura 21. Efecto de las rizobacterias promotoras del crecimiento en la altura de <i>A. cupreata</i>	58
Figura 22. Efecto de las rizobacterias promotoras del crecimiento en el diámetro de la roseta de <i>A. cupreata</i>	59
Figura 23. Efecto de las rizobacterias promotoras del crecimiento en el diámetro del tallo de <i>A. cupreata</i>	60
Figura 24. Efecto de las rizobacterias promotoras del crecimiento en el número de hojas de <i>A. cupreata</i>	62
Figura 25. Influencia de las rizobacterias promotoras en la densidad estomática (DE) de <i>A. cupreata</i>	63
Figura 26. Efecto de las rizobacterias promotoras del crecimiento en la densidad estomática de las hojas de <i>A. cupreata</i>	64
Figura 27. Efecto de las rizobacterias promotoras del crecimiento en el grosor de la epidermis de las hojas de <i>A. cupreata</i>	66
Figura 28. Efecto de las rizobacterias promotoras en el desarrollo de la longitud de raíz de <i>A. cupreata</i>	68
Figura 29. Efecto de las rizobacterias promotoras del crecimiento en la biomasa fresca de <i>A. cupreata</i>	69
Figura 30. Efecto de las rizobacterias promotoras del crecimiento en la biomasa seca de <i>A. cupreata</i>	71
Figura 31. Efecto de las rizobacterias promotoras en el contenido de clorofila de <i>A. cupreata</i>	73
Figura 32. Efecto de las rizobacterias promotoras en el contenido de carotenoides de <i>A. cupreata</i>	74
Figura 33. Efecto de las rizobacterias promotoras en el contenido de fenoles de <i>A. cupreata</i>	76
Figura 34. Efecto de las rizobacterias promotoras en el contenido de cenizas de <i>A. cupreata</i>	77
Figura 35. Efecto de las rizobacterias promotoras en el contenido de calcio de <i>A. cupreata</i>	82
Figura 36. Efecto de las rizobacterias promotoras en el contenido de fósforo de <i>A. cupreata</i>	83

Figura 37. Porcentaje de supervivencia de plántulas aclimatadas de *A. cupreata* inoculadas con los diferentes tratamientos de rizobacterias y diferentes concentraciones de la solución nutritiva Steiner 85

Figura 38. Análisis de componentes principales integrando las variables morfológicas y bioquímicas evaluadas en los tratamientos de bacterias y fertilización aplicado a las plántulas de agave..... 87

RESUMEN

Agave cupreata es una especie de importancia económica en Michoacán por su uso en la industria mezcalera, no obstante, su sustracción desmedida, ha causado la reducción en sus poblaciones naturales, por lo que es imperativo buscar una solución sustentable en la obtención de plantas; la micropropagación es una de ellas. Sin embargo, el principal reto de esta técnica es la aclimatación, ya que se requiere aumentar la sobrevivencia y vigor de las plántulas, al pasarlas de condiciones *in vitro* a *ex vitro*. En este sentido, considerando la amplia evidencia científica sobre los beneficios de las rizobacterias promotoras del crecimiento en diversos cultivos, incrementando el vigor y rendimiento de las plantas, el objetivo de este trabajo, fue evaluar el efecto de bioinoculantes bacterianos en la aclimatación y vigor de plántulas de *A. cupreata* obtenidas mediante micropropagación (vitroplantas). Se obtuvieron 140 vitroplantas, las cuáles se trasplantaron a sustrato “*peat moss*”, donde se disminuyó el riego de manera gradual. Se caracterizó una colección de rizobacterias en base a sus propiedades *in vitro* para promover el crecimiento vegetal, como la capacidad para fijar nitrógeno, solubilizar fosfatos y calcio, producir auxinas y exopolisacáridos, y hacer frente a hongos fitopatógenos como *Fusarium* sp. Posteriormente se seleccionaron las rizobacterias sobresalientes en los ensayos y se formularon bioinoculantes individuales y en consorcio, que se implementaron a las plántulas en 14 tratamientos diferentes. Los tratamientos consistieron en dos controles de fertilizaciones (50 y 100%) e inoculaciones individuales y en consorcio con los aislados AtoM6-4, G50-78, Lad-7-1, AesM9-8, AcuM11-4, C1-13 y ACJ-14. Se evaluó su efecto en parámetros morfológicos y bioquímicos. En los ensayos se observó que las rizobacterias tuvieron un efecto positivo en el crecimiento y desarrollo de las plántulas de *A. cupreata* durante la aclimatación. En las mediciones morfológicas se observó un mayor efecto en el tratamiento Lad-7-1 en peso fresco (incrementando el 22% en relación a la fertilización reducida) y peso seco (41%); C1-13 en diámetro del tallo (53%); AcuM11-4 en longitud de raíz (293%) y densidad estomática (40% en haz y 35% en envés); y el consorcio ACJ-14 + C1-13 + G50-79 en largo de raíz (251%) y peso seco (41%). En cuanto al contenido bioquímico sobresalen ACJ-14 + C1-13 + G50-78 en fenoles (3 mgEAG/g) y fósforo (0.04 mg/g), Lad-7-1 en carotenoides (21 µg/mg) y C1-13 en calcio (36 mg/g) y cenizas (0.94%), esto en comparación con el control reducido con 5 µg/mg de carotenoides, 2 mgEAG/g de fenoles, 0.02 mg/g de fósforo, 28 mg/g de calcio y 0.81% de cenizas. Adicionalmente, es importante reportar que se registró una sobrevivencia del 60% con la fertilización reducida, 80% con la fertilización completa, además del 90% con AcuM11-4 + AesM9-8 y ACJ-14 + C1-13 + G50-78, y del 100% con ACJ-14.

Palabras clave: Plantas *in vitro*, rizobacterias, vigor, sobrevivencia, biotización.

ABSTRACT

Agave cupreata is a plant of economic importance in the Mexican state of Michoacan for its use in mezcal industry, however, their excessive subtraction has been causing a reduction in their natural populations; fact for which is important to look for a sustainable solution, in order to obtain plants, micropropagation is one of them. Nevertheless, one of the main challenges of the technique is plant acclimatization, since it is necessary to increase survival and enhancement of seedlings, at the moment of transplant them from *in vitro* to *ex vitro* conditions. Considering the great scientific evidence on benefits of growth-promoting rhizobacteria bioinoculant in crops, increasing vigor, yield and metabolites of interest in the inoculated plants, the objective of the project was to analyze the effect of bacterial bioinoculants in acclimatization and enhancement of *A. cupreata* seedlings. A total of 140 vitroplants were obtained via micropropagation, which were transplanted to peat moss substrate, where irrigation were gradually reduced. A collection of rhizobacteria was characterized based on their characteristics as plant growth promoters, such as nitrogen biological fixation, solubilize phosphates and calcium, produce auxins and exopolysaccharides, and deal with *Fusarium* sp. Then, it was selected the best in the essays to formulate individual and consortium bioinoculants, that were applied to seedlings in 14 different treatments. The treatments consist of two controls of fertilization (50 and 100%) e individual and consortium inoculations with the isolates AtoM6-4, Lad-7-1, AesM9-8, AcuM11-4, C1-13 y ACJ-14. Its effect on morphological parameters and biochemical parameters were evaluated. In essays, rhizobacteria had a positive effect on acclimatization process of *A. cupreata* seedlings. In this sense, morphology parameters showed a positive effect with Lad-7-1 in fresh weight (with an increase of 22% in relation to decreased fertilization) and dry weight (41%); C1-13 in stem diameter (53%); AcuM11-4 in root length (293%) and stomatal density (40% in front and 35% in back); and the ACJ-14 + C1-13 + G50-78 consortium in root length (251%) and dry weight (41%). Regarding the biochemical content, ACJ-14 + C1-13 + G50-78 consortium in phenols (3 mgEAG/g) and phosphorus (0.04 mg/g) and individual inoculations of Lad-7-1 in carotenoids (21 µg/mg), and C1-13 in calcium (36 mg/g) and ash (0.94%) stand out, compared to decreased control, with 5 µg/mg carotenoids, 2 mgEAG/g phenols, 0.02 mg/g of phosphorus, 28 mg/g of calcium and 0.81% of ash. Additionally, it is important to report that there was a survival rate of 90% with ACJ-14 + C1-13 + G50-78 and 100% with ACJ-14.

Keywords: *In vitro* plants, rhizobacteria, enhancement, survival, biotization.

1. INTRODUCCIÓN

Los agaves son plantas perennes que pueden desarrollarse en casi todos los tipos de asociaciones de vegetación, sin embargo, principalmente se encuentran de manera abundante en el matorral xerófilo, bosque tropical caducifolio y bosque de *Pinus-Quercus* (Gschaedler, 2017). Estas plantas presentan modificaciones morfológicas que les permite sobrevivir en ambientes desérticos, en donde la escases de agua y el clima cálido extremo se encuentran presentes. Algunas de estas modificaciones desarrolladas son hojas suculentas que les permite almacenar agua, estomas complejos como protección de la pérdida de agua, una fotosíntesis tipo CAM, entre otras adaptaciones (Espinosa, 2015).

Los agaves han tenido gran importancia económica y cultural para los pueblos indígenas y mestizos y para las poblaciones actuales. Los primeros pobladores de Mesoamérica usaban esta planta para alimentarse y fabricar cordeles de ixtle y objetos elaborados de las fibras del maguey (como sandalias). Hoy en día, se han encontrado diversos usos a estas especies como lo son la alimentación, medicina, combustible, cobijo, ornato, fibras de ixtle, abono, construcción de viviendas y en la elaboración de bebidas (García, 2007).

El mezcal y el tequila son bebidas alcohólicas que se han fabricado en México a partir de la época colonial. Estos se obtienen de los azúcares fermentados de las piñas cocidas de más de 50 especies del género *Agave*, es un proceso que se lleva a cabo en aproximadamente 26 estados de México. Para producir el mezcal, las plantas de agave deben de ser cosechadas antes de la floración, para de esa forma asegurar una alta concentración de azúcares, sin embargo, al no permitir que se lleve a cabo el evento reproductivo, se reducen drásticamente las poblaciones silvestres de agave (Pérez *et al.*, 2016).

La micropropagación es una técnica biotecnológica innovadora en la obtención masiva de material vegetal, por lo tanto, aplicar una adecuada micropropagación podría ser una solución para solventar la problemática antes mencionada (Kulus, 2014). Sin embargo, uno de los principales retos de esta técnica es la aclimatación de las plántulas, ya que, al crecer en un medio *in vitro*, no cuentan con las características estructurales necesarias para terminar su desarrollo en condiciones *ex vitro*, siendo esencial disminuir de manera gradual todas las condiciones proporcionadas de humedad, temperatura, luz y nutrientes, para promover el desarrollo adecuado de sus estructuras en las nuevas condiciones, y de esa forma, aumentar el porcentaje de sobrevivencia de las plántulas (Castillo, 2004). Por otro lado, se ha visto que la biotización de las plántulas con bacterias promotoras del crecimiento (PGPR: *Plant Growth-Promoting Rhizobacteria*, por sus siglas en inglés), es una de las metodologías llevadas a cabo para la aclimatación de plantas

obtenidas en laboratorio o vitroplantas que está cobrando auge. En este sentido, las PGPR son un conjunto de bacterias que cohabitan en la rizósfera y producen diversos beneficios en las plantas. Estas bacterias potencian el crecimiento vegetal, mejoran la absorción de nutrientes, auxilian a las plantas en la producción de fitohormonas esenciales para el desarrollo vegetal, además de proporcionar protección a los cultivos de diversos agentes patógenos, por lo cual, el estudio de estas se ha vuelto muy importante para el desarrollo de cultivos vegetales (Chávez-Díaz *et al.*, 2020). En el presente proyecto se pretende identificar y caracterizar PGPR que puedan ser aplicadas de manera específica en la aclimatación de vitroplantas de *Agave cupreata* para incrementar su vigor y sobrevivencia.

2. ANTECEDENTES

2.1 El agave

El *Agave* es un género de plantas endémicas del continente americano, perteneciente a la familia Asparagaceae y a la subfamilia Agavoideae. Esta familia de plantas consta de 25 géneros y 637 especies (García-Mendoza, 2011). El origen de la familia es relativamente reciente, de manera que, realizando análisis moleculares, Eguiarte y Souza (2007) encontraron que la familia se originó hace aproximadamente 25.8 millones de años, mientras que el género se originó hace 10.1 millones de años. Sumado al reciente origen del género, también encontraron una alta tasa de especiación de 0.32 a 0.51 especies por millón de años, proceso de radiación adaptativa que pudo haber coincidido con la aridificación de Norteamérica, hace 10 millones de años, etapa donde hubo un aumento de la temperatura y disminución de la disponibilidad de agua.

Por otro lado, en México, se encuentran alrededor del 75% de las 159 especies de *Agave* existentes en América, mientras que 129, (el 61%) de las especies totales son endémicas del país. Este género se distribuye desde el sur de Estados Unidos (Florida), hasta el norte de Sudamérica (y las islas del caribe) (García-Mendoza *et al.*, 2019). La diversidad genética del género, y el alto número de endemismos en México se debe principalmente a su adaptación fisiológica y morfológica a la alta variedad de hábitats en el país, de manera que esta diversidad se observa en la capacidad de dispersión y germinación de sus semillas, interacción con polinizadores y su tolerancia ecológica a estrés biótico y abiótico (Barrientos *et al.*, 2019).

2.1.1 Fisonomía y fisiología del agave

La diversidad genética y su capacidad de adaptación a hábitats diversos se ve reflejado, de igual manera, en sus características morfológicas y fisiológicas. Morfológicamente, estas plantas pueden llegar a medir 3 m de alto, sus hojas suculentas se encuentran dispuestas de forma arrosetada, y son lineales, espatuladas, lanceoladas, u ovadas, frecuentemente rígidas y con espinas en los bordes, además, son vegetales hermafroditas cuya inflorescencia está dispuesta en forma de espiga, sobre un pedúnculo leñoso (quiote), sus flores son principalmente amarillas o verdosas y su fruto es monocárpico, capsular, alargado y dehiscente, cada uno con numerosas semillas triangulares, aplanadas y de testa negra brillante (García-Mendoza, 2011).

Por otro lado, los agaves son plantas xerófitas, han desarrollado diversas características para poder habitar y prosperar en climas donde las condiciones climáticas son adversas (Giraldo-Cañas, 2017). Por lo que desarrollaron hojas

suculentas y tallos gruesos, órganos donde almacenan agua y nutrientes, como azúcares, con el fin de mantener una reserva para situaciones de escasez o deprivación de estos requerimientos; también presentan una cutícula gruesa, la acumulación de cera, y la presencia de estomas complejos que las protegen de la pérdida de agua (Espinosa, 2015). Además, el sistema de raíces de los agaves se dispone de manera superficial, y de esta forma facilita la absorción del agua de la lluvia, la cual no llega a infiltrarse en grandes profundidades y sólo humedecen la superficie del suelo (García, 2007).

Una de las adaptaciones al estrés por sequía desarrolladas por los agaves es la apertura de los estomas durante la noche para captar CO₂, ya que de esta forma se minimiza la pérdida de agua por transpiración, captando este compuesto gaseoso en temperaturas no mayores a los 20°C (García-Mendoza *et al.*, 2017). En otro aspecto, Tamayo-Ordóñez *et al.* (2016) mencionan la existencia de una relación entre el nivel de poliploidía de algunos agaves y la adaptación al estrés biótico y abiótico, ya que la poliploidía se relaciona con el desarrollo de algunas de las características adaptativas desarrolladas, como el tamaño y densidad estomática para hacerle frente al estrés hídrico, el largo de la espina terminal, asociada a la defensa contra herbivoría y protección contra el estrés por calor, por otro lado, también encontraron la presencia de cristales de oxalato de calcio como mecanismo de defensa contra depredadores.

Otra de las características distintivas de estas plantas para optimizar su adaptación y crecimiento en ambientes con temperaturas muy altas es el metabolismo ácido crasuláceo (CAM, por sus siglas en inglés) (Zúñiga-Estrada *et al.*, 2018), este tipo de fotosíntesis se diferencia de la C₃ y C₄ en el sentido de que por la noche se abren los estomas para asimilar el CO₂, y evitar una alta evapotranspiración con repercusión en una gran pérdida de agua, también, se relaciona con su alta capacidad para mantener grandes reservas de agua, nutrientes y azúcares (Stewart, 2015 y Davis, 2022). Este proceso se divide en dos fases que ocurren durante el día y la noche, en la fase nocturna, se toma el CO₂ de la atmósfera por el aceptor fosfoenol-piruvato (PEP) para luego fijarse en el citosol con la ayuda de la PEP carboxilasa, donde se sintetiza el ácido málico, y después ser almacenado en la vacuola central de las células fotosintéticas; durante la fase diurna, sale el malato al citosol, para ser descarboxilado y de esta forma liberar el CO₂ que será asimilado por la enzima RUBISCO en el ciclo de Calvin para la generación de carbohidratos (Andrade *et al.*, 2007).

2.1.2 Beneficios del agave

Los agaves tienen una gran importancia económica y cultural, al ser utilizados desde tiempos inmemorables como fuentes de alimento, medicina, abono, construcción de viviendas, elaboración de bebidas alcohólicas, entre otros fines (Reynoso-Santos, 2012). De acuerdo con las investigaciones arqueológicas realizadas por Colunga-García *et al.* (2017), se registró la interacción entre humanos y agaves en Mesoamérica, datando de al menos 11,000 años, sin embargo, este manejo y aprovechamiento repercutió en los procesos evolutivos de las mismas, ocasionando un proceso de domesticación, mediante cambios fenotípicos y genotípicos, producto de la reproducción diferencial de los individuos beneficiada por la selección de los humanos. El principal uso que se le daba a estos vegetales fue la alimentación a partir del tallo o piña, y el pedúnculo de los mismos, seleccionando los individuos con los tallos y pedúnculos más grandes y con mayor contenido de azúcares; También se usaban las fibras de las hojas para fabricar costales, sogas, cordeles, entre otros, siendo de preferencia las plantas con hojas más grandes y con mayor calidad y cantidad de fibras; Por otro lado, la savia era usada para elaborar bebidas fermentadas y sin fermentar, usando en este caso, las plantas con mayor contenido de azúcares y propiedades organolépticas.

Actualmente, el aprovechamiento de los agaves se ha diversificado, y se han encontrado nuevas propiedades en sus tejidos, incrementando sus potenciales usos. En relación con esto, algunas especies se han catalogado con propiedades medicinales, un ejemplo de ello es *A. sisalana*, ya que se ha encontrado flavonoides en el extracto de sus hojas con actividad inmunomoduladora, así como la saponina esteroidea hecogenina con propiedad hepatoprotectora (Tewari *et al.*, 2014). Algo semejante ocurre con la inulina y los fructooligosacáridos, nutraceuticos naturales de los agaves con actividad prebiótica, demostrando un incremento de bifidobacteria y lactobacilos en el tracto digestivo humano, además de la promoción de la producción de péptidos incretina/satiétopépticos en el intestino de ratas, con potencial efecto en el metabolismo de la glucosa, peso corporal y desarrollo de la masa de grasa (Olvera *et al.*, 2015).

El aguamiel es una bebida compuesta por la savia del agave que, como ya se mencionó con anterioridad, se ha usado desde la época mesoamericana, sin embargo, en la actualidad se ha analizado su composición química, descubriendo así que es una fuente importante de vitaminas y minerales como la riboflavina, niacina, piridoxina, vitamina C y el selenio, cubriendo al menos el 20% de la recomendación de ingesta diaria para la población mexicana (Huezcas-Garrido, 2022). El jarabe de agave, siendo un subproducto del aguamiel, es una fuente natural importante de carbohidratos como la fructosa, glucosa y sacarosa, por lo que ha sido demandado como sustituto de azúcar, al tener un bajo índice glucémico,

con capacidad antioxidante y propiedades antibacteriales, un ejemplo de ello es el jarabe de *A. tequilana* y *A. salmiana*, cuyo contenido fisicoquímico (sólidos solubles totales, humedad, pH y color) es incluso similar al de la miel y el jarabe de caña de azúcar y maíz (Mellado-Mojica y López, 2015).

La formulación de compost de bagazo de agave también tiene la posibilidad de sustituir materiales comerciales de alto precio aplicándose en un 30% en combinación de biosólidos de vinaza formulado con polvo de coco, ya que la aplicación de este tiene propiedades fisicoquímicas (materia orgánica, pH, capacidad de intercambio catiónico, conductividad eléctrica, relación carbono nitrógeno, entre otros) adecuados para el buen desarrollo de las plantas, así como un adecuado contenido de nutrientes (carbono, nitrógeno, fósforo, potasio, calcio y magnesio), lo cual puede traer beneficios en el eficiente crecimiento de las plantas a las cuales se les aplica esta composta, así como una reducción de la contaminación ambiental, al disminuir el uso de fertilizantes químicos que afectan negativamente la salud ambiental (Crespo *et al.*, 2018).

Debido al alto contenido de carbohidratos solubles del agave, estas plantas tienen la capacidad de convertirse en materia prima para producir biocombustible a través de su hidrolización mediante el uso de levaduras como *Saccharomyces cerevisiae*, de plantas completas como *A. americana*, *A. americana* var. *marginata*, *A. americana* var. *gainesville*, *A. salmiana*, y *A. tequilana* para obtener etanol, y la posterior fermentación con *Clostridium beijerinckii* para conseguir n-butanol, acetona y ácido butírico (Mielenz *et al.*, 2015). Empero, el bagazo de *A. tequilana*, al ser el principal residuo de las empresas tequileras, también se puede utilizar para su transformación en biocombustibles como el biogás y bioetanol, al realizarse un pretratamiento con explosión de vapor para romper las fibras lignocelulósicas, seguido de una hidrólisis enzimática (Estrada-Maya y Bernd, 2021).

En la actualidad, se ha encontrado una gran variedad de usos a las fibras de agave, como alimento para ganado o su uso en la fabricación de productos como textiles, mallas, cercas o incluso en la construcción. Las especies que se han descrito con el más eficiente contenido de fibras son *A. sisalana* y *A. fourcroydes*, las cuales, además, tienen gran aplicación en la construcción (Alducin-Martínez *et al.*, 2023). En algunos estudios, se ha documentado la incorporación de las fibras de agave en la ingeniería, tal es el caso de las fibras de *A. angustifolia*, con otros materiales de construcción, por ejemplo, el adobe, para reforzar algunas características físicas como su fuerza compresiva y flexible (Caballero-Caballero *et al.*, 2017).

2.1.3 Producción de mezcal en México

La savia de los agaves era utilizada en la época mesoamericana para elaborar bebidas sin fermentar (aguamiel) y bebidas fermentadas (pulque). El pulque era una bebida alcohólica muy popular entre los círculos sociales en aquella época, sin embargo, su fabricación disminuyó después de la revolución mexicana, al ser sometidas las haciendas pulqueras al reparto agrario. El mezcal, descendiente del pulque, comenzó a establecerse después de la llegada de los españoles al país, de manera que se utilizaban las piñas cocidas, anteriormente eran usadas como alimento, para posteriormente someterlas a, una técnica novedosa en la época, de destilación (Colunga-García *et al.*, 2017).

La palabra mezcal viene de náhuatl “mexcalli”, cuyo nombre significa “agave horneado”, se trata de una bebida alcohólica destilada, obtenida a partir de la fermentación de los azúcares de las piñas cocidas de diferentes especies de agave (Pérez *et al.*, 2016).

La elaboración de mezcal se encuentra regida por la declaratoria de protección a la Denominación de Origen Mezcal, que establece la exclusividad de la elaboración del producto en su región de origen. Esta zonificación de la bebida está determinada por un referente histórico, en el cual se demuestra la influencia de este en la cultura local. La declaratoria dio inicio en noviembre de 1994, considerándose inicialmente los estados de Guerrero, Oaxaca, San Luis Potosí y Zacatecas, sin embargo, posteriormente se incluyeron otros estados; Michoacán se incorporó en noviembre del 2012 (Kirchmayr *et al.*, 2014).

De acuerdo con la COMERCAM (2023), la producción y envasado nacional del mezcal ha ido en aumento en los últimos años, de manera que, en un lapso de dos años, de 2020 a 2022, la producción de la bebida aumentó alrededor de un 77%, elaborándose en este último año 14,165,505 litros del producto, de los cuáles, el 60% se destinó a exportación, mientras que el 40% fue de comercio nacional (Figura 1). El principal estado productor de mezcal es Oaxaca, incidiendo en el 2022, en un 91.31% de la producción nacional, seguido de este, podemos encontrar a Puebla (3.44%) y Durango (1.41%), encontrándose a Michoacán en el sexto lugar, con una producción del 0.91%.



Figura 1. Producción y envasado histórico de mezcal en México. Tomado de COMERCAM (2023)

En México, se aprovechan 330,000 hectáreas destinadas a cultivo de agave, propiedad de 9,000 productores. De acuerdo con SIAP (2022), en el 2022 se produjeron alrededor de 400,807.75 toneladas de plantas de agave mezcalero, superando la producción proyectada para el 2030, siendo esta de 224,000 toneladas (Pérez, 2016; SAGARPA, 2017). Sin embargo, con la creciente demanda en la producción de la bebida, se espera un aumento, en los siguientes años, de la zona cultivable utilizada para la siembra de agave, a la par de la producción de la planta, surgiendo la incógnita de si seremos capaces de cumplir con la demanda. Aunado a esto, en la actualidad se han registrado 64 especies utilizadas en la producción de mezcal, de las cuáles, 57 son silvestres, siendo valoradas por la complejidad presente en sus cualidades organolépticas, sin embargo, no existe una regulación adecuada en su extracción para su uso, por lo que son estas especies, las que se encuentran en mayor riesgo (López, 2022).

2.2 Agave y mezcal en Michoacán

Desde la época mesoamericana, Michoacán ha sido una región donde se produce pulque y mezcal, el pulque siendo el producto de la savia fermentada, y el mezcal refiriéndose a la destilación de los mostos fermentados, obtenidos a partir de las piñas o tallos cocidos de agave. El pulque era la bebida predominante a la llegada de los españoles, sin embargo, también se elaboraba mezcal (Colunga-García, *et al.*, 2017). El Estado fue, por muchos años, indiferente a la plantación de agave y producción intensiva de bebidas alcohólicas como el tequila o el mezcal, sin embargo, entre los años 2000-2003 se presentó un acontecimiento de escasez de agave tequilero en Jalisco debido a situaciones como el comportamiento cíclico de la planta, con etapas de alto y bajo volúmenes de consumo, además de que en este periodo se presentó una alta mortalidad por una masiva infección de *Fusarium*,

provocada por el uso intensivo de plantas clonales susceptibles a la infección, por lo cual hubo una desaceleración de producción y consumo de agave en ese estado, lo que propició altas expectativas de colocar el agave michoacano en el mercado nacional (Téllez, 2009).

Michoacán fue la última entidad federativa en recibir la denominación de origen, obteniéndola a principios del 2012, formando parte 29 de los 119 municipios del Estado, abarcando distintas zonas biogeográficas, por lo que existe una amplia gama de destilados (Nápoles *et al.*, 2015). Como ya se mencionó con anterioridad, Michoacán es uno de los principales productores de mezcal, ocupando el sexto lugar a nivel nacional y, de acuerdo con datos del Gobierno de México (2018), el tercer lugar en la producción de plantas de agave, al producir alrededor de 130,000 litros de mezcal al año, o el 0.91% de la producción total y una producción de 131,431.66 toneladas de agave en el año 2022 (Gallardo, 2020; SIAP, 2022 y COMERCAM, 2023).

En Michoacán se han localizado un total de 10 especies de agaves, de los cuales, al menos tres de ellos se usan para la elaboración de mezcal: *A. angustifolia*, *A. cupreata*, *A. inaequidens* subsp. *inaequidens*, y dos especies más se han cultivado en la región con este mismo propósito: *A. americana* var. *subtilis* y *A. tequilana* (Torres y Delgado, 2019). En este sentido, *A. angustifolia* (espadín) es la especie más utilizada para fabricar mezcal, debido al alto contenido de azúcares en sus piñas, aunado a su crecimiento prospero de manera natural, ocasionado por su éxito reproductivo (principalmente asexual), es una especie sujeta a cultivo y explotación industrial para elaborar las bebidas (Cházaro *et al.*, 2020). Por otro lado, *A. inaequidens* subsp. *inaequidens* (maguey alto o bruto) tiene una multitud de usos en el Estado, desde bebidas alcohólicas como el mezcal y el pulque, alimento y medicina, hasta forraje, cercas y obtención de fibras, sin embargo es una especie sometida a la creciente demanda de la producción de mezcal en el estado, la cual se ha visto afectada al no haber un manejo adecuado de sus poblaciones, y al reproducirse principalmente por semilla, aun cuando, en menor tasa, produce bulbillos en su inflorescencia. El tipo de manejo que se le ha dado en el Estado consiste en la cosecha de la planta, sin dejar maguey maduro en pie capaz de reproducirse sexualmente, en otros casos se protegen las poblaciones silvestres o se realizan plantaciones, pero con el uso de fertilizantes, herbicidas o fungicidas químicos que afectan al suelo y posteriormente incluso al crecimiento del maguey (Torres, 2015)

2.2.1 *Agave cupreata*

Adicional a las especies mencionadas anteriormente, *A. cupreata*, o por su nombre común papalometl (maguey mariposa) es otra planta de maguey de gran importancia económica en el estado de Michoacán, por ser una de las principales plantas utilizada como materia prima para la producción de mezcal en el Estado. El cultivo comercial de *A. cupreata* en Michoacán comenzó hace aproximadamente 20 años en los municipios de Madero, Charo, Tzitzio y Morelia, como una reacción a la presión ocasionada en la obtención de material para elaborar mezcal, y la disminución de las poblaciones naturales, sin embargo, recientemente se han iniciado plantaciones experimentales de semillas en el municipio de Madero con el objetivo de establecer monocultivos, mientras que en Tzitzio y Charo, se han aplicado prácticas agroforestales con la intención de reforestar en plantaciones, en sitios donde se pueden encontrar poblaciones relictas de la especie (Torres-García *et al.*, 2019).

El *A. cupreata*, es una especie perteneciente al subgénero *Euagave* dentro del grupo *Crenatae*, endémica de la zona suroccidente del país, localizándose en la Cuenca del Río Balsas, principalmente en los estados de Michoacán y Guerrero, sin embargo, también se han encontrado poblaciones en Puebla y Oaxaca (Figura 2). Se distingue de las demás especies por presentar características espinas grandes y curvas de color cobre y hojas anchas que presentan marcadas impresiones de las espinas en los bordes, estas son dentadas y de color verde claro (Avendaño-Arrazate, 2015). Esta especie se encuentra más cercanamente emparentada con *A. potatorum* por sus procesos de diferenciación, ya que habitan en zonas ecológicamente similares y son especies que comparten genes, además de depender de la formación de semillas para reproducirse, al producir hijuelos ni bulbillos (Larson y Ruíz, 2016).



Figura 2. Distribución de *A. cupreata*. Distribución potencial (zona verde), distribución conocida (puntos amarillos). Tomado de Ocaña-Nava *et al.* (2007)

Esta planta se ha visto amenazada en la actualidad debido a diversos factores como lo son la disminución de las poblaciones de polinizadores, ocasionado por el uso excesivo de plaguicidas en los cultivos, la deforestación, fragmentación del hábitat y la competencia con especies introducidas, aunado a esto, las comunidades silvestres se han visto sobreexplotadas para la elaboración del mezcal, los pobladores colectan el tallo de las plantas silvestres maduras antes de que se desarrollen las estructuras florales, diezmando así estas comunidades y disminuyendo la producción de semillas (Arreola y Mendoza, 2018; Martínez-Castro, 2015). Relacionado con esto, Illsley (2008) realizó un estudio demográfico en la región centro-montaña de Guerrero con el propósito de conocer la influencia de la extracción del agave en las poblaciones naturales y reportó que, en términos generales, las comunidades de la región están decreciendo, con una tasa de disminución anual de 2 a 5 %. La extracción descontrolada de esta y otras especies no sólo afecta a las poblaciones silvestres, además puede ocasionar consecuencias graves a las comunidades circundantes, ya que se erosiona y debilita el suelo de las colinas donde habitan (Téllez *et al.*, 2023).

De manera adicional a lo mencionado anteriormente, Martínez-Palacios *et al.* (2011), reportaron que la especie se ha visto mayormente sobreexplotada en Michoacán en comparación a Guerrero, en este último, algunas comunidades se han organizado para no colectar más del 80% de los individuos en etapa reproductiva, hecho que no ocurre en Michoacán, por otro lado, estos autores estudiaron la diversidad

genética de la especie, y mencionan que, a pesar de la fuerte explotación, existe una alta heterocigosidad entre las poblaciones, lo cual puede estar sujeta a su exclusiva reproducción sexual, lo cual puede ser una ventaja al momento de conservar la diversidad génica de la especie, sin embargo, recomiendan proteger a las comunidades silvestres y establecer plantaciones con el objetivo de mantener la especie. De igual manera, Aguirre-Dugua y Eguiarte (2013) mencionan que la extracción de individuos reproductivos de las poblaciones naturales, tanto de *A. cupreata* como de *A. potatorum*, para la producción de mezcal, no ha erosionado la diversidad genética de sus poblaciones, sin embargo, si hay un problema demográfico relacionado con la disminución de sus individuos, siendo necesario llevar a cabo procesos de regeneración de las comunidades, los cuales, pueden basarse en la promoción de semillas y la reforestación. La promoción de semillas va encaminada a permitir la floración de 4 a 12 individuos por hectárea, para posteriormente relocalizar los frutos en áreas libres de maleza para que sean dispersadas por el viento de manera natural y promover la selección natural; la reforestación se refiere a la germinación y mantenimiento de las semillas en viveros hasta los dos o tres años de edad, para luego ser trasplantadas en poblaciones con baja densidad de sus individuos. Sin embargo, este último método debe de llevarse a cabo de manera que el germosplasma sea representativamente muestreado.

2.3 Formas de propagación

Los agaves son plantas que se pueden reproducir sexual y/o asexualmente. La reproducción sexual ocurre a través de la polinización asistida de las flores, por polinizadores como los murciélagos, y la subsecuente formación de las semillas; la reproducción asexual sucede mediante la formación de hijuelos estoloníferos en la base del tallo o de bulbillos en el escapo floral (García-Mendoza *et al.*, 2017). El proceso reproductivo de *A. cupreata* es semelpárico, es decir, ocurre únicamente una vez en la vida, y este evento se lleva a cabo entre los 7 y 12 años de vida, tiempo en que la planta ha alcanzado la madurez suficiente, y después muere (Martínez-Palacios, 2011; Ocaña-Nava *et al.*, 2007). Sin embargo, la densidad de individuos reproductores ha disminuido, situación ocasionada por los productores de mezcal al cortar la inflorescencia de la planta, evitando la utilización de los azúcares producidos por las plantas, para su evento reproductivo, y en su lugar, procurar su almacenamiento en el tallo para que, de esta forma, el mezcal producido sea de mayor calidad (Martínez *et al.*, 2015). Esta reproducción es importante porque, con la fecundación de los óvulos, se efectúa una recombinación de genes heredados de las plantas parentales, que aumenta la diversidad génica y mantiene la densidad poblacional (Pérez *et al.*, 2020). Aunado al descenso de la población reproductiva de la especie, García (2004) registra que, los individuos que llegan a reproducirse sexualmente, producen alrededor de 35,000 semillas, de las cuales, el

43% es viable y el resto es abortiva, este número de semillas viables se disminuye considerablemente por la presencia de depredadores presentes en condiciones de campo, sobreviviendo el 10% de las semillas viables, y de este porcentaje, la capacidad de germinación inmediata de las semillas restantes es alrededor del 90 a 95%.

2.3.1 Micropropagación de especies de Agave

La reproducción por semilla tiene desventajas al momento de decidir multiplicar de manera masiva este recurso, debido principalmente al lento crecimiento de estas plantas, la limitada reproducción sexual ocasionada por los problemas de polinización y la escasa viabilidad de las semillas producidas, sin embargo, un método innovador para la producción masiva de plantas es la micropropagación o propagación *in vitro*, que consiste en la obtención de vitroplantas mediante la reproducción asexual a través de técnicas de cultivo de los tejidos vegetales llevadas a cabo en laboratorio (Kulus, 2014), esta técnica tiene la ventaja de ser un proceso es relativamente corto, además de realizarse en un ambiente controlado, la reproducción es ilimitada y las plantas clonales contienen la misma información genética que la planta madre (Domínguez *et al.*, 2008). Sánchez *et al.* (2020) definen una vitroplanta como aquella planta que se encuentra desarrollando en un medio *in vitro*, estéril, rico en nutrientes, fitohormonas necesarias, y humedad saturada. Existen cinco etapas primordiales de la micropropagación (Figura 3) (Olmos *et al.*, 2010; Bhatia y Sharma, 2015).

1. Fase 0. Preparación del material vegetal: consiste en la selección del explante que cuente con una buena calidad. La calidad de este se encuentra influenciada por diversos factores como: el tipo de órgano utilizado como explante, la edad ontogénica y fisiología de este, la estación climática en la que se colecta el material, y el tamaño, genética y salud de la madre donante.

2. Fase 1. Establecimiento del cultivo: en esta etapa se realiza una desinfección del explante, generalmente se lleva a cabo con hipoclorito de sodio al 5%, cloruro de mercurio al 0.1% y/o alcohol al 70% para posteriormente pasarlo al medio basal MS (murashige y Skoog) suplementado con vitaminas, sacarosa y reguladores del crecimiento. En este proceso se deberá controlar la selección, aislamiento y esterilización de los explantes.

3. Fase 2. Multiplicación: en esta etapa, la multiplicación de los brotes se estimula principalmente con un medio rico en citocininas. El objetivo es mantener y aumentar la cantidad de brotes para los nuevos ciclos de multiplicación sucesivos. Existen dos vías de regeneración de los explantes: la organogénesis y la embriogénesis. En la embriogénesis somática se usa principalmente la auxina ácido 2,4-

Diclorofenoxiacético, ya que a concentraciones adecuadas, esta suprime la organogénesis y estimula la formación de callo.

4. Fase 3. Germinación del embrión somático o enraizamiento: los brotes obtenidos en la fase anterior se separan, y se propicia el desarrollo de raíces adventicias con la ayuda de un nuevo medio, esta vez implementado con auxinas (como el ácido 3-indolbutírico), en algunos casos el enraizamiento se induce en suelo estéril, en condiciones de humedad alta. En el caso de la embriogénesis somática, la germinación de los embriones se estimula en un nuevo medio basal MS, y luego se transfieren directamente al suelo, ya que las plántulas en este caso son desarrolladas con raíces.

5. Fase 4. Aclimatación: las vitroplantas, una vez desarrolladas las raíces, se trasplantan a un medio *ex vitro* compuesto de algún sustrato mezclado con suelo y se promueve, gradualmente, la correcta adaptación de las plantas a nuevas condiciones naturales con baja humedad relativa, nutrientes y luz del sol directa. Esta fase se puede llevar a cabo tanto en sustrato externo, en condiciones *ex vitro*, tanto en condiciones *in vitro*, disminuyendo la humedad y nutrientes del medio basal.

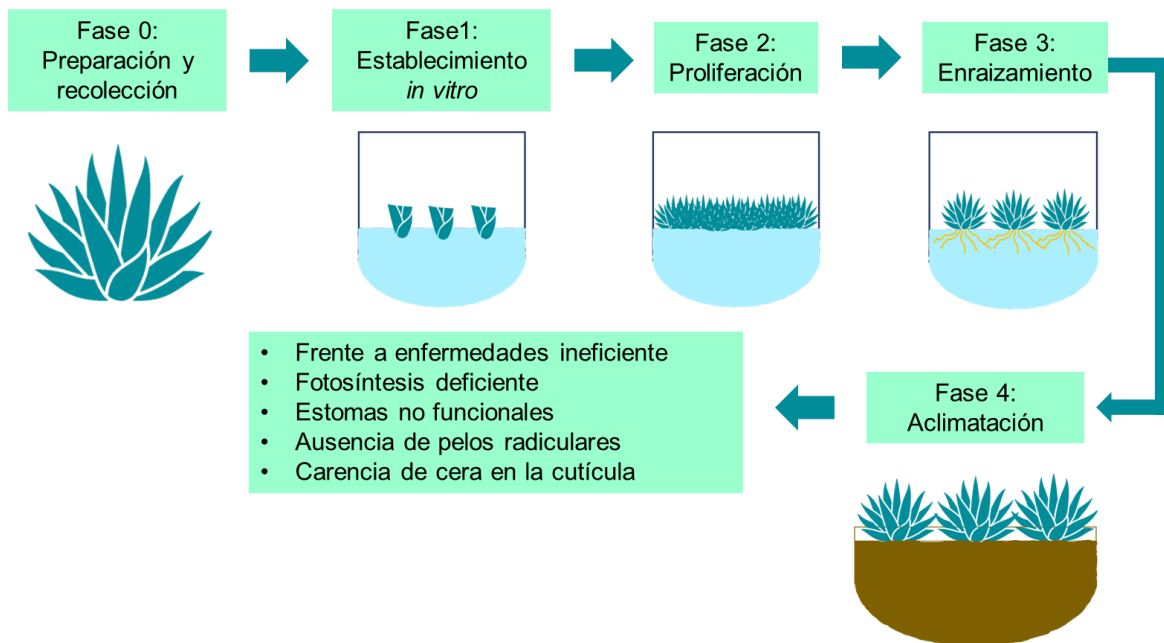


Figura 3. Etapas de la micropropagación mediante organogénesis directa. Elaboración propia

Se han llevado a cabo diversos estudios estableciendo técnicas de micropropagación en varias especies de agave. Así, por ejemplo, Domínguez *et al.* (2008) estudiaron el efecto de las citocininas en la propagación *in vitro* de diversas especies mexicanas como lo son *A. diformis*, *A. karwinskii*, *A. obscura*, *A. potatorum*

y *A. cupreata*, estableciendo el tipo de citocinina y la concentración adecuada para cada una de las especies, en el estudio, reportaron el uso de citocininas y concentraciones de 1.5 mg/L de 6-Bencilaminopurina (BA) para *A. cupreata*, con una eficiencia de propagación de 10.5 brotes por explante; 0.2 mg/L de tidiazurón (TDZ) para *A. difformis* con 8.5 brotes; 1 mg/L de BA para *A. kawinskii* con 6.1 brotes; 0.2 mg/L de TDZ para *A. obscura* con 11 brotes y 3 mg/L de cinetina (Cin) en *A. potatorum* con 6.9 brotes.

Chen *et al.* (2014) establecieron una técnica para la micropropagación de *A. americana*, usando tallos basales y tejido foliar como explantes. En el caso de tomarse el tallo como explante, determinaron que el mayor número de brotes se obtuvo con una concentración de 13.32 μ M de BA, desarrollando 18.5 brotes; mientras que para la regeneración de brotes, usando hojas como explante, se obtuvo el mayor número de brotes (23.4) con una combinación de 2.68 μ M de ácido naphthaleneacético (NAA) y 13.32 μ M de BA; por otro lado, en la fase de enraizamiento, el mayor número de raíces por plántula lo obtuvieron con 1.48 μ M de ácido indolbutírico (IBA) implementado con 1.61 μ M de NAA, produciendo un promedio de 5.2 raíces; mientras que en la fase aclimatación, usando una solución nutritiva (compuesta por N, F, K, Mg y otros nutrientes), obtuvieron una supervivencia del 87%.

Puente-Garza *et al.* (2015), implementaron una técnica de micropropagación de *A. salmiana*, con el fin comparar el volumen de antioxidantes y principios bioactivos de estas vitroplantas, con plántulas aclimatadas y plantas silvestres. En este, reportan que el mayor número de brotes se obtuvo con 0.04 mg/L de ácido 2, 4-dichlorofenoxiacético (2,4-D) y 10 mg/L de BA (14 brotes). Con respecto al contenido de antioxidantes y principios bioactivos, reportan un contenido de azúcares solubles 50% menor en vitroplantas que en plantas silvestres y aclimatadas, en otro sentido, el contenido de ácidos fenólicos fue 30% mayor en vitroplantas y plantas aclimatadas comparándolas con las silvestres, además de un contenido de saponinas al menos 25 veces mayor, y la capacidad antioxidante fue 3 veces mayor en estos mismos tratamientos, a comparación de las silvestres. Esta diferencia, se debe de acuerdo con los autores, a los requerimientos de cada una de ellas en sus diferentes estadios de desarrollo y las diferentes condiciones de cultivo.

Aureoles-Rodríguez *et al.* (2008) estudiaron la micropropagación de la especie *A. inaequidens*, especie amenazada y de interés económico en los lugares donde radica (desde Jalisco hasta Morelos, la Ciudad de México e incluido el estado de Michoacán) y determinaron que el mayor número de brotes se obtuvo con 3 mg/L de BA, produciendo 2.0 brotes por explante, siendo la concentración que produjo una mayor longitud de la plántula con 6.4 mm.

2.4 Aclimatación de vitroplantas de *Agave*

Uno de los principales retos de la micropropagación de las plantas, es la fase de aclimatación, ya que las vitroplantas se desarrollan en ambientes condicionados con alto contenido de nutrientes, humedad relativa, reguladores del crecimiento, baja irradiancia y limitado potencial osmótico e hídrico (Ziv, 1995), no encontrándose adaptadas para terminar su desarrollo en condiciones naturales, y desarrollando algunas características morfológicas anormales que interfieren en su aclimatación, algunas de ellas son: realizan fotosíntesis deficiente, han crecido en condiciones controladas, de asepsia y alta humedad relativa, sus estomas no son funcionales, carecen de pelos radicales y de cera en la cutícula. Por lo que, es esencial aclimatar a la especie vegetal a las condiciones de humedad y de luz del invernadero, debido a lo cual, estos factores se deberán ir cambiando de manera gradual (Castillo, 2014). De acuerdo con Chandra (2010), para lograr una óptima aclimatación, hay diversas medidas que se deben tomar en consideración:

- Las vitroplantas se encuentran desarrollándose en luz de baja intensidad (1,200 a 1,300 lux), por lo que al ser expuestas a la luz del sol directa puede ocasionar fotoinhibición y fotoblanqueo de la clorofila, debido a lo cual, al ser trasplantadas al exterior, es importante procurar una luz de baja intensidad, en este sentido, las plántulas deben dejarse en el invernadero, bajo luz natural difusa, durante 3 a 6 días.
- Durante la fase *in vitro*, las plántulas retardan el desarrollo de su cutícula y cera epicuticular, por consecuencia, se debe de aflojar las tapas de los recipientes con las vitroplantas o transferir las plántulas a recipientes sellados con suelo estéril, e ir retirando poco a poco el sello, para disminuir de manera gradual la humedad del suelo y se genere la cera epicuticular.
- En condiciones *in vitro*, las plántulas se encuentran creciendo en un medio con altas concentraciones de carbohidratos (alrededor de 30 g/L de sacarosa), por lo que la nutrición de los individuos es heterótrofa, dependiendo por completo de los nutrientes del medio, sin embargo, para aclimatarse necesitan cambiar su nutrición a fotoautótrofa, para promover este cambio, se debe de disminuir la cantidad de sacarosa del medio, antes de trasplantarse a suelo.

Adicional a las medidas mencionadas anteriormente, es necesario implementar al inicio de la aclimatación, un sustrato blando adecuado, para favorecer el desarrollo radicular y la retención de humedad y, de esta forma, favorezca un rápido desarrollo radicular para adquirir agua y nutrientes, además de que es necesario un buen desarrollo de los estomas para controlar la transpiración y la pérdida de agua. Durante esta fase de adaptación, se desarrolla el complejo estomático, incrementa

la cantidad de ceras cuticulares y se promueve la formación de cristales de oxalato de calcio en la zona de la epidermis de las hojas (Sánchez *et al.*, 2021). Aunado a esto, es esencial llevar a cabo una adecuada fertilización que cuente con los nutrimentos necesarios para la supervivencia de las plantas en esta fase crítica. Estos fertilizantes suelen estar suplementados con nitrógeno, fósforo, potasio, azufre, calcio y magnesio como macronutrientes y hierro, cobre, manganeso, zinc, molibdeno, cloro, boro y níquel como micronutrientes. Sin embargo, el nitrógeno es de primordial importancia, ya que, si se encuentra en cantidades insuficientes, se produce un crecimiento y desarrollo deficientes (Enríquez *et al.*, 2016).

Debido a esta vital importancia en la fase de aclimatación, se han llevado a cabo diversos estudios que se concentran en esta fase en algunas especies del género *Agave*. Bautista-Castellanos *et al.* (2020) establecieron una técnica de enraizado de brotes *in vitro* y aclimatación de plantas de *A. potatorum* Zucc, para lo cual, implementaron diferentes concentraciones de ácido indol acético y ácido indol butírico para el enraizamiento y diferentes dosis de fertilización mediante la solución nutritiva Steiner. Ellos reportaron que la concentración de 0.1 a 0.5 mg L⁻¹ de ácido indol butírico tuvo mejores resultados, al producir 33.08 raíces por planta, entre el 94 y 96% de formación de raíces en los brotes, a comparación de la auxina ácido indol-3-acético que desarrollo 3.55 raíces. Con respecto a la fertilización, establecieron la concentración adecuada de la solución nutritiva Steiner en la aclimatación de esta especie, siendo esta la dilución al 50% de la concentración completa, al desarrollar, en un lapso de 90 días, un promedio 8.9 hojas por planta, un largo máximo de 8.4 cm, un tallo de 10.27 mm de diámetro, 4.15 g de peso fresco y 0.31 g de peso seco.

Sánchez *et al.* (2020) implementaron la aclimatación de vitroplantas de *A. angustifolia* en condiciones de invernadero, y su posterior trasplante a condiciones silvestres, para ello probaron 4 líneas clonales en cuatro sustratos diferentes y posteriormente monitorearon la altura, el número de hojas y cobertura de estos agaves en una ladera con matorral subtropical. Después de 60 días, reportaron la supervivencia al 100% de las plantas en todos los tratamientos en invernadero, sin embargo, los sustratos con un mayor efecto en la aclimatación, fue el que tenía una textura franco arenoso con un contenido rico en materia orgánica, principalmente el compuesto por una mezcla de tierra para maceta, turba y mezcla testigo (compuesta de arena, tierra lama en relación 3:1:1), en una relación 1:1:1, debido a que fue en este tratamiento dónde se obtuvo un mayor porcentaje de enraizamiento, siendo un promedio del 98.8%. Además, en el trasplante a condiciones silvestres se logró entre el 84 a 98% de sobrevivencia.

Enríquez-Del Valle *et al.* (2016) evaluaron el fertirriego en vivero durante la aclimatación de plantas micropropagadas de *A. potatorum*, para ello, aplicaron

diferentes dosis de la solución nutritiva Steiner. Observaron en dosis crecientes de fertilización, el incremento en los parámetros morfológicos, siendo la fertilización óptima con la solución Steiner al 100% (Composición en mg/L: 166.0 N, 31.4 P, 277.4 K, 182.1 Ca, 49.08 Mg, 110.9 S; 1.3 Fe, 0.00065 Cu, 0.201 Mn, 0.0375 Zn, 0.077 B, 0.019 Mo), obteniendo plantas con 17 hojas, 392.35 cm² de área foliar, 2.84 cm de diámetro del tallo, 17.4 raíces primarias, 7.4 cm³ del volumen de raíz y 6.50 g de peso seco foliar. Estos resultados se registraron a los 270 días después del trasplante.

Aguilar y Rodríguez (2018) establecieron una técnica de micropropagación y aclimatación de la especie *A. marmorata*, para lo cual, utilizaron diferentes concentraciones de 6-bencilaminopurina (BA) y ácido indol-3-acético (AIA) para la formación de brotes y enraizamiento; para la fase de aclimatación, examinaron diferentes sustratos, y evaluaron el porcentaje de sobrevivencia. Encontraron que la mejor concentración para la formación de brotes es con 10 mg/L de AIA y BA en concentraciones equivalentes (41 brotes por explante), mientras que, para la formación de raíces, la mejor concentración fue únicamente con AIA a 10 mg/L, obteniendo 4.98 raíces por planta con 9.3 cm de longitud. En cuanto a la aclimatación, el mejor sustrato fue la combinación de *peat moss* con agrolita (1:1), y *peat moss* con arena de río (1:1), ya que se logró una sobrevivencia del 100%, mientras que, en los demás tratamientos, se obtuvo una sobrevivencia menor al 72.4%.

2.4.1 Aclimatación vegetal por la biotización con rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal

Una de las metodologías llevadas a cabo para la aclimatación de vitroplantas que está cobrando auge es el uso de microorganismos promotores del crecimiento en esta fase de vital importancia, sin embargo, estas bacterias pueden ser utilizadas en todas las fases de la micropropagación, esta técnica ha recibido el nombre de biotización (Figura 4). Las plantas *in vitro* tienen un deficiente desarrollo radicular, por lo que, cuando son trasplantadas a un medio *ex vitro*, son incapaces de absorber nutrientes del suelo, una de las herramientas para resolver esta problemática es la inoculación de microorganismos promotores del crecimiento vegetal, un ejemplo de ello son los hongos micorrízico-arbusculares con la capacidad de expandir la zona radicular de absorción de nutrientes, que con ayuda de sus hifas y arbusculos, son transferidos a las plántulas; en contraparte, las rizobacterias como *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Enterobacter* producen hormonas del crecimiento que promueven el desarrollo radicular y el crecimiento, además de facilitar la absorción de nutrientes como nitrógeno, fósforo, potasio y calcio (Shiwani *et al.*, 2022). Adicionalmente, estos microorganismos protegen a las vitroplantas del estrés biótico, produciendo

metabolitos con efecto de biocontrol contra hongos fitopatógenos, y contra el estrés abiótico, produciendo enzimas como la 1-aminociclopropano-1-carboxilato deaminasa (ACC), que reduce los niveles de etileno y facilita la supervivencia de las plántulas (Cantabela *et al.*, 2022).

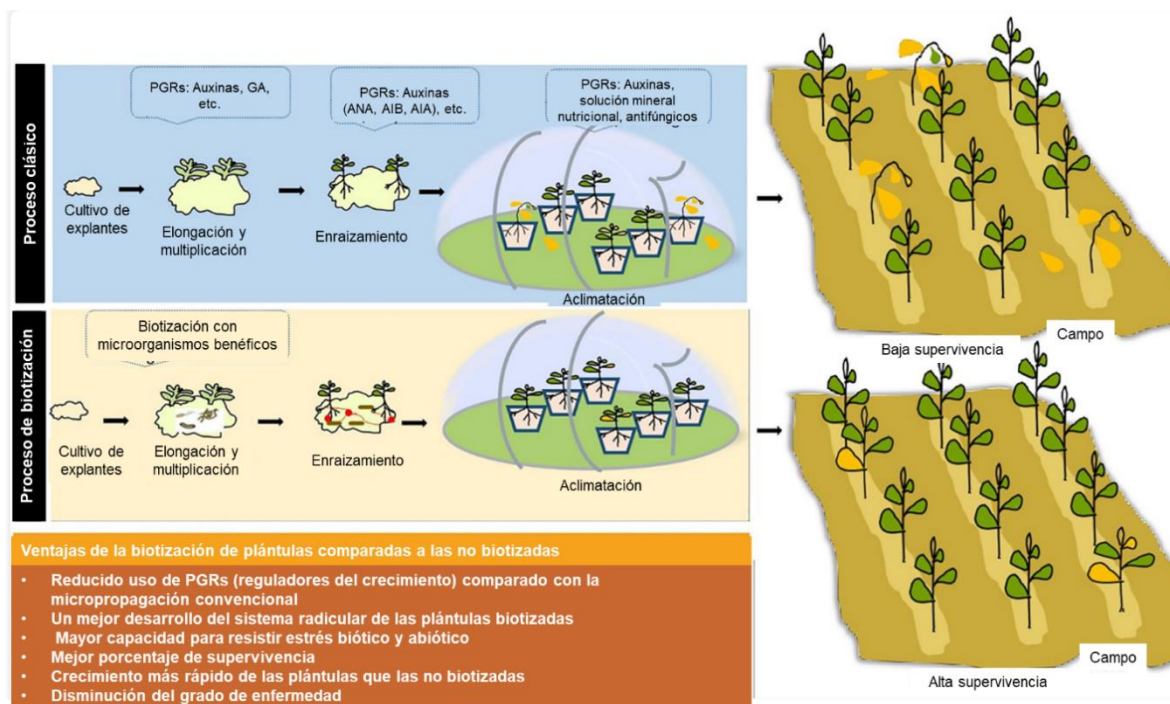


Figura 4. Beneficios de la biotización. Tomado de Soumare *et al.* (2021)

Como ya se ha dicho, las PGPRs, son bacterias que habitan en las cercanías de las raíces de las plantas, son productores de elicitors bióticos beneficiosos para el crecimiento vegetal. Los elicitors bióticos son compuestos producidos por los microorganismos vivos, que interactúan en respuesta a la fisiología y metabolismo de las plantas. Estas bacterias, influyen en el desarrollo vegetal mediante la síntesis de distintos compuestos esenciales para la planta o, directamente, protegiéndolas del ataque de organismos patógenos (Huasasquiche *et al.*, 2020). Algunos de los géneros reportados como bacterias PGPR son: *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Gluconacetobacter*, *Pseudomonas* y *Serratia* (Somers *et al.*, 2004; Caicedo-López *et al.*, 2021).

En la zona de la rizósfera, siendo esta la zona inmediata a la superficie de las raíces y tomando en consideración la epidermis rizosférica, el mucílago y los exudados radiculares que afectan esta zona, las bacterias pueden relacionarse con las raíces vegetales en dos niveles de complejidad diferentes, la colonización rizosférica y la colonización endofítica (Figura 5). Las bacterias rizosféricas colonizan ya sea la superficie de las raíces, debido a los cambios en la composición química y física

ocasionados por los exudados de las plantas, estos cambios se relacionan con la atracción de microorganismos y su capacidad para colonizar las raíces. Por otra parte, las bacterias endofíticas residen en el interior de las raíces, habitando en los espacios apoplásticos, y establecen una asociación simbiótica con su hospedero (Vessey, 2003 y McNear, 2013).

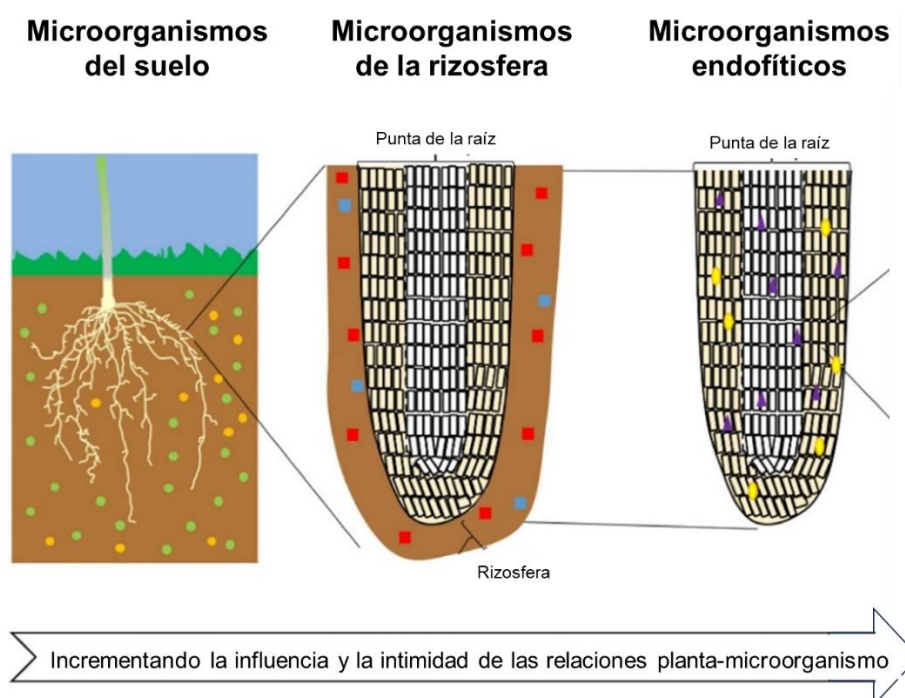


Figura 5. Relación entre las PGPR y la zona radicular de las plantas. Modificado de Backer *et al.* (2018)

2.4.1.1 Mecanismos de acción de las PGPR

Estas rizobacterias se dividen en dos categorías de acuerdo con su método de acción: mecanismos de acción directos y mecanismos de acción indirectos (Figura 6). Los mecanismos de acción directa son aquellos que se relacionan con la promoción del crecimiento, desarrollo y productividad de los cultivos, mejorando el estado nutricional de las plantas, e incrementando el volumen y funcionalidad de las raíces, desarrollo fisiológico, retención de agua y absorción de nutrientes. Su acción se basa en la fijación biológica de nitrógeno, producción de ácidos orgánicos que conducen a la solubilización de fosfato y calcio; y la, producción de metalóforos, vitaminas, fitohormonas y otros metabolitos secundarios con efecto en el crecimiento de la planta. Los mecanismos de acción indirectos, tienen que ver con la protección al estrés abiótico y biótico, al actuar en la inducción de la resistencia sistémica adquirida e inducida contra fitopatógenos, la señalización de *quorum sensing*, producción de metabolitos y detoxificación de factores de virulencia

(Chávez-Díaz *et al.*, 2020), así como producir sideróforos, quitinasa, glucanasa, antibióticos, cianuro de hidrógeno y amoníaco que actúan inhibiendo microorganismos fitopatógenos (Benjumeda, 2017).

Las fitohormonas o reguladores de crecimiento pueden ser sintetizados por las rizobacterias, regulando procesos fisiológicos de la planta como son la división celular, el crecimiento, y la diferenciación de los órganos aéreos y de las raíces. Algunas de ellas son: auxinas, giberelinas, citocininas (Porta y Jiménez-Nopala, 2019). Los sideróforos son moléculas que ayudan a la planta a obtener hierro del medio, siendo este un factor esencial en procesos como la respiración, fotosíntesis y la fijación de nitrógeno. La quitinasa y glucanasa, los antibióticos y el cianuro de hidrógeno y amoníaco son compuestos que les proporciona protección a los vegetales de los patógenos circundantes (Benjumeda, 2017).

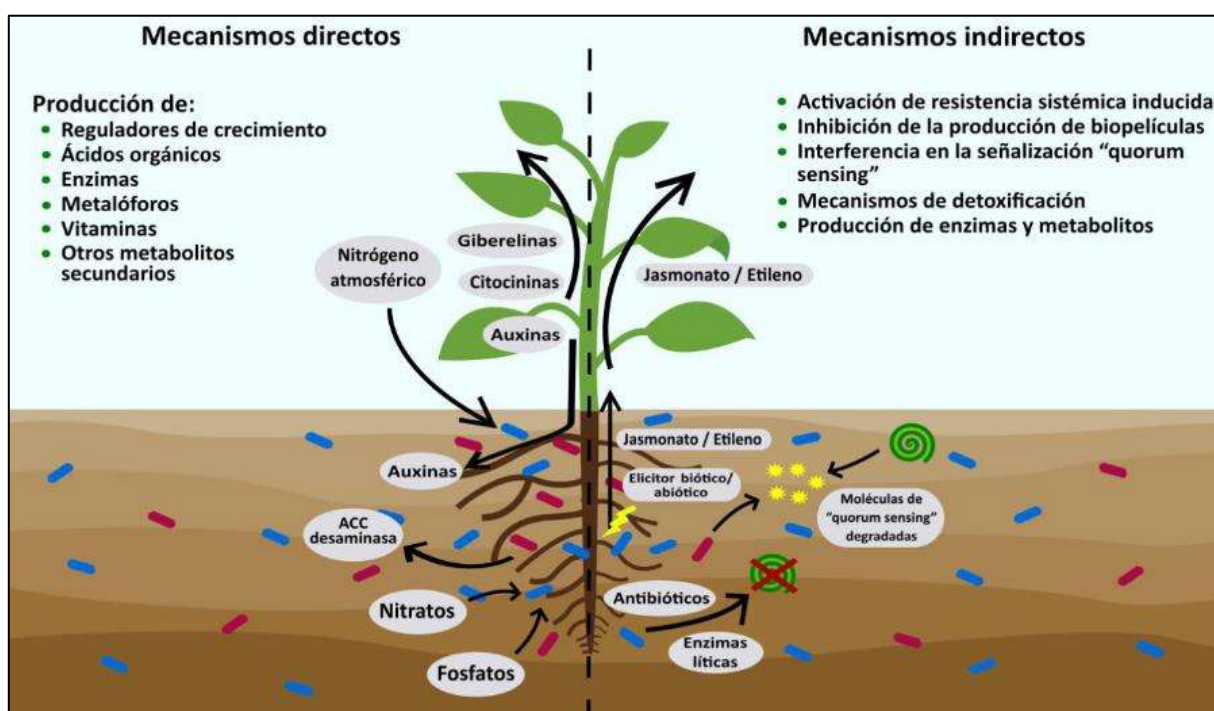


Figura 6. Mecanismos de acción de las bacterias promotoras del crecimiento vegetal. Tomado de Chávez-Díaz *et al.* (2020)

2.4.1.2 Bacterias PGPR en plantas de agave

Algunos de los estudios que se han llevado a cabo con respecto al uso de bacterias PGPR en agaves son los siguientes:

Sánchez *et al.* (2021), realizaron un estudio de la influencia de fosfobacterias (bacterias solubilizadoras de fósforo) en la promoción de la emergencia y crecimiento de agaves silvestres, en el que, descubrieron que los conjuntos de

bacterias promovieron el crecimiento en todas las especies evaluadas, sin embargo, el coinóculo compuesto por *Bacillus* sp. y *Pseudomonas* sp. incrementó el porcentaje y velocidad de emergencia de los agaves sierrudo (*A. americana* var. *americana*) (94.5 y 136.7%, respectivamente y en relación al control sin inóculo) y Tobalá (*A. potatorum*) (81.6 y 111.4%), y el coinóculo de *Enterobacter* sp. y *Pseudomonas* sp. fue el que mostró mejores resultados en los parámetros morfológicos como en el diámetro de tallo de Tobalá, Cuishe (*A. karwinskii*) y Coyote (*A. americana*) (0.45, 0.40 y 0.38 cm respectivamente), peso seco de la hoja de Sierrudo, Tobalá y Coyote (0.069, 0.032 y 0.1 g respectivamente), peso seco del tallo de Sierrudo (0.0056 g) y peso seco de la raíz del Coyote (0.019 g).

De la Torres-Ruiz *et al.* (2016), investigaron el efecto de algunas bacterias en el crecimiento y producción de fructanos en el *A. americana* y encontraron que, de las tres bacterias analizadas (*Rhizobium daejeonense*, *Acinetobacter calcoaceticus* y *Pseudomonas mosselii*) *R. daejeonense* tuvo un efecto significativamente mayor en parámetros como el peso seco de la planta, con un incremento del 218%, en relación al control sin inocular, fertilizado con KNO₃, 166.7% en el número de hojas y 86% en la longitud de la raíz; además, influyó positivamente en el contenido de azúcar de la especie estudiada, aumentando en el área foliar el contenido de inulina, sacarosa, glucosa y fructosa en un 148, 134, 127 y 553 %, respectivamente, .

Bautista-Cruz y Martínez-Gallegos (2020) analizaron la promoción del crecimiento de las bacterias fijadoras de nitrógeno en *A. potatorum* (Figura 7) y registraron que, *Burkholderia cepacia* incrementó el volumen radicular (250% con respecto al control) y el número de hojas desplegadas (42.6%), *Paenibacillus amylolyticus* la biomasa seca del tallo (317.1%); *B. cepacia*, *Flavobacterium* sp. y *P. amylolyticus* el diámetro del tallo (alrededor de 47%), diámetro de roseta (48.6%), área foliar (127.2%) y la altura de la planta (51.8%); mientras que *Flavobacterium* sp. incrementó la biomasa total (164.8%). Adicionalmente, *B. cepacia* aumentó el volumen de sólidos solubles totales del tallo un 64%, este último dato es relevante, siendo uno de los parámetros principales buscados para la fabricación de mezcal.

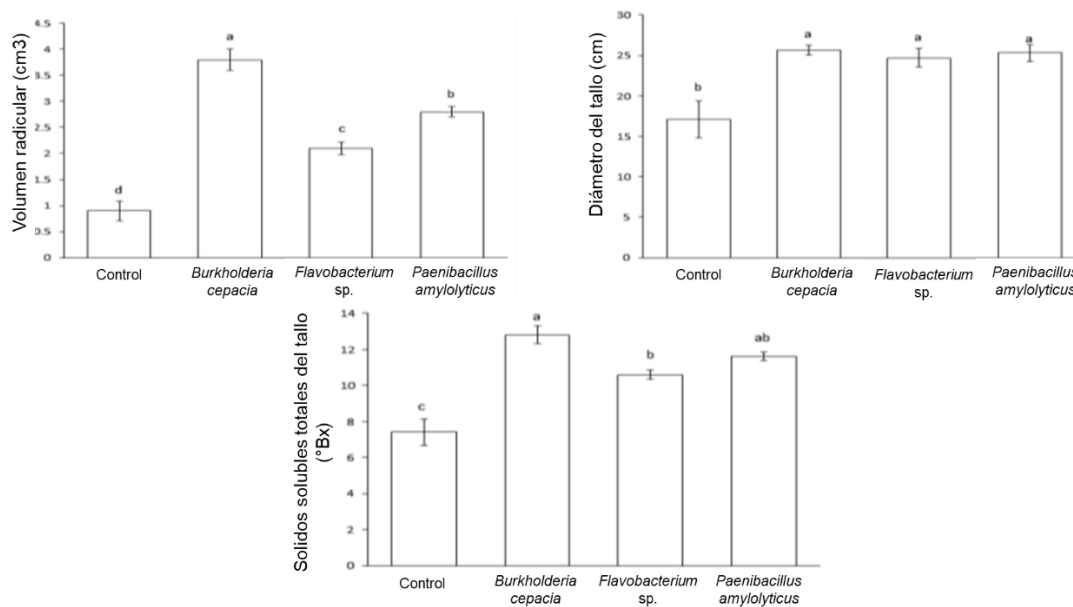


Figura 7. Influencia de la inoculación de bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre, en el crecimiento y contenido de azúcares de plantas de *A. potatorum*. Tomado de Bautista-Cruz y Martínez-Gallegos (2020)

En cuanto al *A. cupreata*, actualmente no se ha realizado algún estudio referente al uso de bacterias PGPR para la aclimatación de la especie, sin embargo, algunos de los estudios que se han hecho en relación con el uso de microorganismos promotores del crecimiento son los siguientes:

Trinidad-Cruz *et al.* (2017), examinaron la inoculación micorrícica en el biocontrol de *Fusarium oxysporum* y la promoción del crecimiento vegetal. Obtuvieron como resultado que las micorrizas aisladas de “El Huizachal” y “Agua Dulce” incrementaron significativamente la biomasa seca total de las plantas entre 148 y 239%, con relación al testigo sin micorrizas, mientras que estas mismas micorrizas aumentaron el número de hojas 53.5 y 62.8%, y el peso fresco del follaje 186 y 168% respectivamente, en relación al control no inoculado. Adicionalmente, *Acaulospora spinosa* (micorriza aislada de “Paso Ancho”) y la micorriza INIFAP® mostraron un efecto significativo en la disminución de la marchitez del agave, ocasionada por *F. oxysporum*, presentando 41% menos daño en comparación de las plantas infectadas y sin micorriza. En conclusión, las micorrizas aisladas de “El Huizachal”, “Agua Dulce” y “Paso Ancho” y la micorriza INIFAP® se pueden considerar como potenciales biofertilizantes y agentes de biocontrol de *F. oxysporum*.

Montoya-Martínez *et al.* (2019) analizaron el efecto de la inoculación de micorrizas arbusculares nativas, aisladas de la rizósfera de *A. cupreata*, e inoculadas en *A. tequilana*. Ellos reportan el mayor índice de Dickson (índice que evalúa la calidad de las plantas, basada en características morfológicas) en las plantas inoculada con

la micorriza aislada de “Barranca de las Nueces”, siendo este índice de 3.6, mientras que el índice de las plantas sin inocular fue de 1.1. Así mismo, esta misma micorriza presentó el mayor efecto en la mayoría de las variables morfológicas evaluadas, resultando en un volumen de la raíz de 21 mL, volumen foliar de 78 mL, peso fresco de 66.5 g, peso seco de 10.4 g, área foliar de 140.2 cm² y diámetro de la piña de 29.1 mm.

Romero-Arenas *et al.* (2015), evaluaron la asociación de *Trichoderma* sp. con *A. cupreata* y *Juniperus deppeana* en el municipio de San Juan Tzicatlacoyan, Puebla; determinaron que la cepa nativa de *Trichoderma* sp. presentó una mayor adherencia con mejor desarrollo en el índice de calidad de Dickson (índice de 1.34), a los 90 días de la inoculación en la rizósfera de *A. cupreata* en comparación del inoculante comercial Tricovel ®, con un índice de 1.09 y se confirmó la presencia de *Trichoderma* en el 100% de la raíz de las plantas de *J. deppeana* y *A. cupreata*.

2.4.1.3 Bacterias PGPR en la fase de aclimatación

Hasta el momento no se ha reportado ningún estudio del uso de PGPR en la aclimatación de vitroplantas de agave, sin embargo, hay algunos reportes del uso de estas rizobacterias en la fase de aclimatación de la micropropagación de diversas especies de plantas. Algunos de los que se han publicado son los siguientes:

González *et al.* (2012) evaluaron el efecto de diferentes cepas de *Azotobacter chroococum* en la aclimatación de vitroplantas de piña (*Cayena lisa*). Reportaron que las plantas inoculadas con la cepa INIFAT 5 lograron una mayor sobrevivencia en esta fase, siendo del 70%, por otro lado, también incremento la altura de las plantas, así como la longitud de la raíz, incrementándola en un 36%, los cuáles, resultaron ser significativamente mayores, a comparación de las plantas sin inocular.

Estas rizobacterias no sólo tienen efecto en el crecimiento morfológico de las plántulas aclimatadas, sino también pueden influir en el contenido bioquímico de estas. Con relación a ello, Pace *et al.* (2019), registraron el efecto del consorcio de bacterias *Azospirillum brasilense*, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Burkholderia ambifaria* y *Herbaspirillum seropedicae* en el contenido de fenoles, flavonoides y clorofila totales, en plántulas aclimatadas de *Artemisia umbelliformis* subsp. *eriantha*, incrementando un 17.5, 28.1 y 62.8%, respectivamente y con relación al control sin inóculo, sin embargo, también lograron una sobrevivencia del 81% en el tratamiento con las rizobacterias, mientras que en el control esta fue de 65%.

Silva *et al.* (2021) estudiaron la fase de aclimatación de vitroplantas de *Pouteria gardeneriana*, así como el rol del enraizamiento *in vitro* y del uso de rizobacterias promotoras del crecimiento en esta fase. Observaron que un adecuado enraizamiento en condiciones *in vitro*, se refleja en el crecimiento de los parámetros

morfológicos como el número de hojas, los segmentos nodales, el peso fresco y seco de las hojas, entre otros. En cuanto al efecto de las rizobacterias en el desarrollo y aclimatación de las plantas, reportaron que la inoculación de estas incrementó el número de hojas, el largo de las raíces y la altura de la planta, principalmente, tuvieron un efecto significativamente mayor en cuanto al largo de las raíces (Figura 8), y esto es primordial en las especies micropropagadas, al necesitar de un adecuado desarrollo de las raíces para poder absorber los nutrientes suficientes para sobrevivir en esta fase.

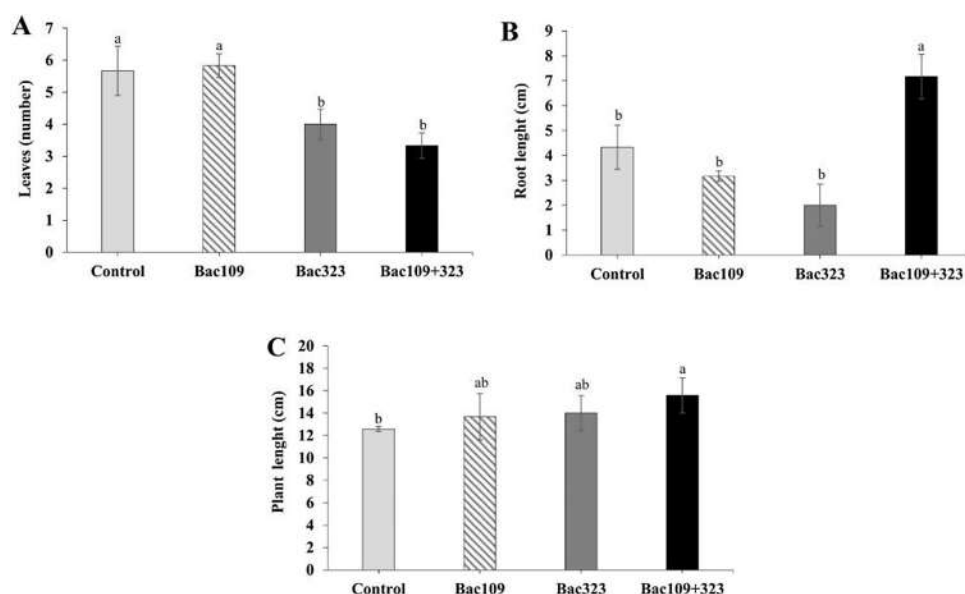


Figura 8. Efecto de las rizobacterias promotoras del crecimiento en parámetros morfológicos de plantas micropropagadas de *Pouteria gardeneriana*. Tomado de Silva *et al.* (2021).

3. JUSTIFICACIÓN

Debido a la sobreexplotación de plantas de *A. cupreata*, existe una escasez de materia prima para satisfacer la industria del mezcal, en el grupo de trabajo (laboratorio de nutrición vegetal) se ha propuesto la micropropagación de *A. cupreata* como una alternativa para la producción masiva de plantas. La fase de aclimatación representa el principal reto en el establecimiento de las plantas en un cultivo *ex vitro*. Aunado a esto, se ha demostrado que las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR), actúan como elicitores naturales en el mejoramiento del crecimiento y rendimiento de los cultivos vegetales. Dada la importancia de estas bacterias, en el presente estudio se pretende llevar a cabo la búsqueda de las bacterias PGPR que auxilien en el proceso de aclimatación y promuevan el buen desarrollo de *A. cupreata*.

4. OBJETIVOS

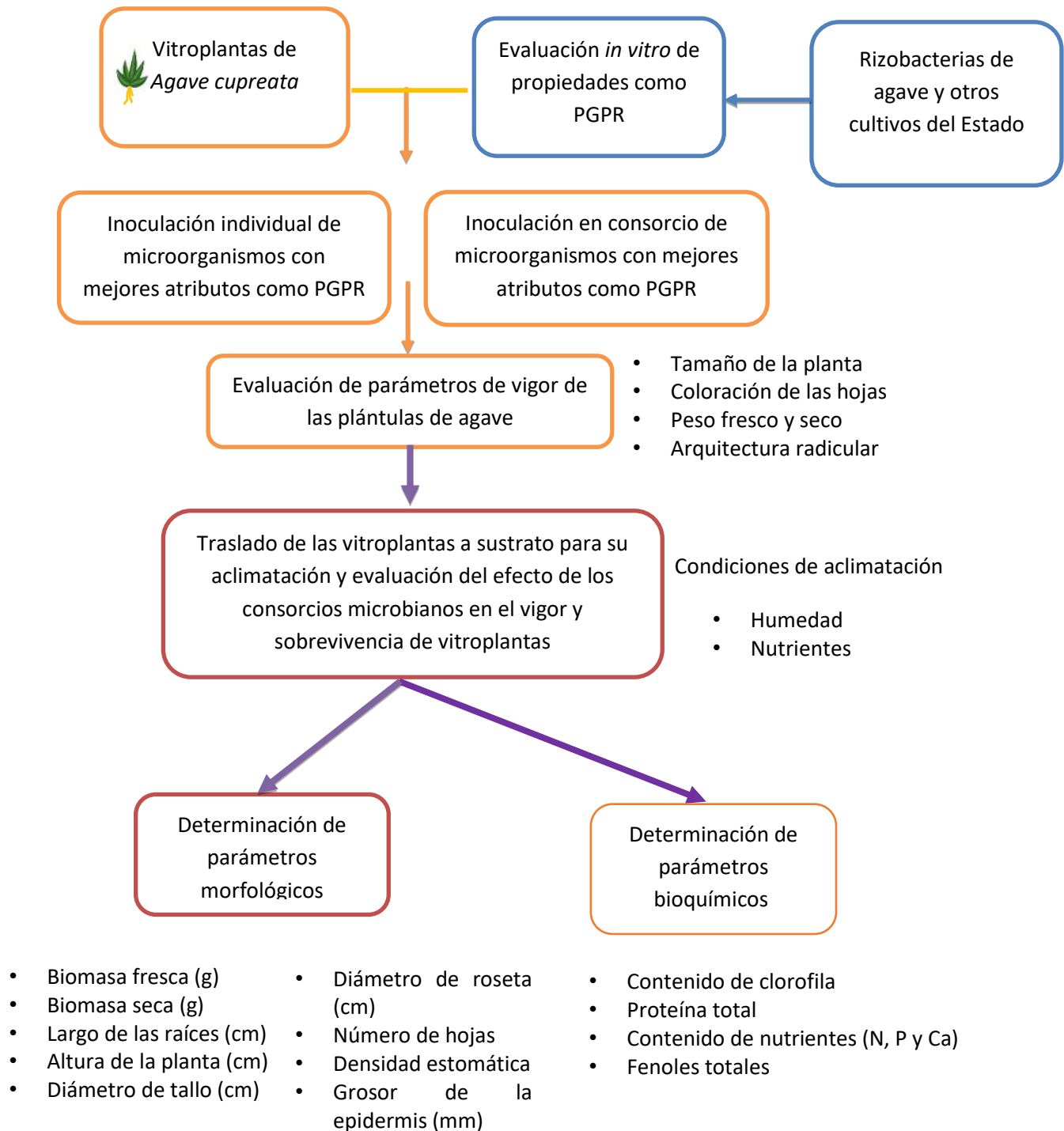
General

- Seleccionar consorcios microbianos que promuevan una adecuada aclimatación y obtención de vitroplantas de calidad de *Agave cupreata*.

Particulares

- Identificar, a partir de una colección de rizobacterias y nuevos aislados, en condiciones *in vitro*, las cepas con atributos para promover el crecimiento vegetal en agave
- Evaluar el efecto de inoculantes simples y mixtos en la aclimatación y vigor de vitroplantas de agave.

5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



6. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente proyecto es continuación de la investigación realizada por la M. C. Birmania Rodríguez Heredia, quien, como parte de su tesis de maestría en el Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH), estableció una técnica de micropropagación de *A. cupreata*, por organogénesis directa. La metodología que se implementó en este proyecto consistió en 3 fases. La primera fase se refiere al aislamiento de bacterias a partir de muestras de suelo rizosférico de diferentes especies de agave, obtenidas de la empresa “La flor del mezcal”, ubicada en Etúcuaro, Michoacán. Las bacterias se caracterizaron como promotoras del crecimiento vegetal y se realizó una selección de acuerdo a las características observadas, así mismo se incluyeron cuatro cepas promotoras del crecimiento, obtenidas del Laboratorio de Nutrición Vegetal del CIDAM-UMSNH.

La segunda fase consistió en la inoculación de vitroplantas de agave durante la fase de aclimatación, con los inoculantes bacterianos, simples y en consorcio, y la tercera fase consistió en el traslado de las vitroplantas a macetas con sustrato para su aclimatación y posteriormente la medición de los parámetros morfológicos y bioquímicos en las plántulas, con el afán de evaluar el efecto de las bacterias inoculadas en el desarrollo de las plantas.

6.1 Aislamiento y caracterización de las rizobacterias

Se realizaron muestreos de suelo rizosférico de cultivos de *A. cupreata*, *A. angustifolia*, *A. inaequidens* y *A. potatorum*. También se tomaron muestras de hojas y savia de *A. cupreata*, la savia se tomó de las heridas de las hojas con hisopos de algodón estériles que posteriormente se guardaron en bolsas plásticas con cierre hermético.

Se cortaron las hojas colectadas en fragmentos de 10 x 10 cm que se desinfectaron con etanol al 70% por 5 min, jabón al 1% por 3 min, y cloro al 20% por 2 min, seguido de esto, se hicieron cortes de 1 cm² de estas en la campana de flujo laminar, para posteriormente sembrarlas en agar nutritivo para obtener bacterias endófitas. En el caso de la savia, esta se sembró del hisopo en agar nutritivo.

Para aislar los microorganismos de la rizósfera, se tomaron 10 g de las muestras de suelo y se colocaron en 90 mL de solución buffer de fosfatos estéril, posteriormente se pusieron en agitación constante durante 30 minutos, pasado el tiempo se tomó 1 mL de esta solución y se realizaron diluciones seriadas hasta la 10⁻⁶ en 9 mL de la misma solución. A continuación, se tomaron alícuotas de 100 µl de las diluciones 10⁻⁴, 10⁻⁵ y 10⁻⁶ y se sembraron en cajas con agar nutritivo, con un asa triangular, luego se dejaron en incubación por 48 hrs, a 27 °C. Las diferentes colonias que

crecieron después de este periodo de incubación se sembraron en nuevas cajas de agar nutritivo para obtener colonias aisladas (Mau *et al.*, 2012). Una vez obtenidos los aislados puros, se hizo una descripción general de las colonias, y se realizó tinción gram de cada una de ellas. Se les asignó diferentes claves a las bacterias con el propósito de poder identificarlas con facilidad: Acu (rizosfera de *A. cupreata*), Aes (rizosfera de *A. angustifolia*) Ain (rizosfera de *A. inaequidens*), Ato (rizosfera de *A. potatorum*) AcuHo (hojas de *A. cupreata*), Aculev (savia de *A. cupreata*).

Las colonias aisladas se conservaron en stock a -20° C. Los stocks consisten en tubos de microcentrífuga con 500 µl de glicerol y 1 mL de caldo nutritivo inoculado previamente con la bacteria pura.

6.1.1 Solubilización de fosfatos y calcio

La caracterización de las bacterias por sus propiedades para solubilizar fosfatos se llevó a cabo de acuerdo con Bautista-Cruz *et al.* (2019), con el medio sólido “Investigación de Fosfato del Instituto Nacional de Botánica” o NBRIP, por sus siglas en inglés, complementado con fosfato tricálcico como fuente insoluble de fosfato (1% glucosa, 0.5% $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, 0.5% MgCl_2 , 0.025% MgSO_4 , 0.02% KCl , 0.01% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y 1.7% agar bacteriológico). En el caso de la solubilización de calcio se realizó con base en Bahadur *et al.* (2020) se usó el medio sólido “Pikovskaya” modificado, que se implementó con carbonato de calcio como fuente insoluble de calcio (1% glucosa, 0.05% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.25% CaCO_3 , 0.02% NaCl , 0.01% MgSO_4 , 0.02% KCl , 0.05% extracto de levadura, 0.01% MnSO_4 , 2% agar bacteriológico). En ambos ensayos se inocularon por punción 9 bacterias en cada una de las placas. Como control positivo se utilizó *Burkholderia* sp., ya que se ha descrito ampliamente en la literatura a las especies de este género como solubilizadoras de fosfatos y calcio, *Arthrobacter agilis* UMCV2 como control negativo, y una punción sin bacteria como blanco. El ensayo se realizó por triplicado. Las cajas se incubaron a 27° C por 15 días para la solubilización de fosfatos y por 7 días para la solubilización de calcio. La solubilización positiva de estos minerales se tomó en cuenta por la formación de un halo de aclaramiento alrededor de las colonias. Se cuantificó la solubilización de estos, tomando en consideración el diámetro de la colonia y el diámetro del halo mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Índice de Solubilización} = \frac{\text{D. de colonia} + \text{D. de halo}}{\text{D. de colonia}}$$

6.1.2 Fijación biológica de nitrógeno

La actividad de las bacterias para fijar nitrógeno se analizó de acuerdo con De la Torre-Ruíz *et al.* (2016), mediante el uso del medio semisólido libre de nitrógeno NFb implementado con azul de bromotimol como indicador de la actividad de la

fijación de nitrógeno (0.5% $C_4H_6O_5$, 0.4% KOH, 0.005% K_2HPO_4 , 0.002% NaCl, 0.001% $CaCl_2$, 0.005% $FeSO_4$, 0.2% de solución de azul de bromotimol al 0.5% en KOH a 1N, 0.2% solución de micronutrientes y 0.8% agar bacteriológico, ajustar pH a 7. Solución de micronutrientes: 0.0286% $B(OH)_3$, 0.0235% $MnSO_4$, 0.0024% $ZnSO_4$, 0.0008% $CuSO_4$ y 0.002% Na_2MoO_4). Para llevar a cabo el ensayo, se inoculó cada una de las bacterias por punción, en viales que contenían 5 mL del medio, estos se dejaron en incubación a 27° C por 15 días. La capacidad de estas bacterias para fijar nitrógeno se pudo observar mediante un cambio de color en el medio, de verde a azul. En este ensayo se usaron *Azospirillum brasilense* sp45 como control positivo, y *Escherichia coli* OP50 como control negativo.

6.1.3 Producción de auxinas

La producción de auxinas por parte de las bacterias se determinó a partir de la metodología propuesta por Gilbert *et al.* (2018), mediante la detección colorimétrica de compuestos indólicos. Esta técnica consistió en inocular las bacterias en tubos de ensayo con 3 mL de caldo soya tripticaseína por dos vías diferentes, una con los tubos suplementados de L-triptófano (0.2 mg/mL), y otra sin L-triptófano, esto debido a que las bacterias producen auxinas por dos vías diferentes, una dependiente del L-triptófano, y otra independiente de él; posteriormente los tubos se colocaron en agitación constante a 90 rpm, durante 10 días. Pasado el tiempo, se centrifugó 1 mL del inóculo a 5000 rpm durante 10 min, se tomó 50 µl del sobrenadante, y se colocó en los pozos de una microplaca de 96 pozos, y se mezcló con 100 µl del reactivo Salkowski (0.45% $FeCl_3$ en 1 litro de H_2SO_4 a 10.8 M), después se incubó en oscuridad, a temperatura ambiente por 30 min para a continuación notar un cambio en la coloración de la mezcla, la cual pasa de amarillo a rosa o rojo, en presencia de compuestos auxínicos (Tabla 1). En esta prueba se usaron a *A. brasilense* sp45 como control positivo y a *E. coli* OP50 como control negativo.

Tabla 1. Cambio de color en la reacción del reactivo Salkowski con los metabolitos producidos por las bacterias. Tomado de Gilbert *et al.* (2018)

Compuesto	Cambio de color	Longitud de onda (nm)
Triptófano	Sin cambio	-
Ácido indol-3-láctico	Sin cambio	-
Ácido indol-3-acético	Rosa	530

Indol acetamida	Rosa	530
Ácido indol-3-pirúvico	Rosa	530
Ácido indol-3-butírico	Naranja	450
Indol	Café	490
Sulfato de indoxilo	Púrpura	560

6.1.4 Confrontación con *Fusarium* sp.

Se evaluó el efecto de antagonismo de las diferentes bacterias contra el hongo fitopatógeno *Fusarium* sp, ya que este es un hongo fitopatógeno que ha causado estragos en cultivos de agave. Para llevar a cabo la prueba, se hizo un primer análisis para seleccionar aquellas bacterias que presentaban actividad de inhibición. Posteriormente se evaluaron por separado aquellas que si contaban con un efecto de antibiosis. Se sembraron 5 bacterias diferentes en líneas de 2 cm de largo, a una distancia de 1 cm de la orilla de la caja petri, y con una separación de 1 cm entre cada bacteria (Figura 9a), y se incubaron por 48 hrs a 27 °C. Una vez que crecieron las bacterias, se colocó un círculo de 0.5 cm de diámetro del fitopatógeno en la parte central de la caja Petri, y se incubó por 7 días a 27 °C. Las bacterias que se registraron con un efecto positivo de antibiosis se confrontaron por separado contra el fitopatógeno en un arreglo dual, debido a lo cual, se sembró una línea de 3 cm de la bacteria a una distancia de 1.5 cm de la orilla de la caja Petri, mientras que, del lado contrario, se colocó un círculo de 0.5 cm de diámetro del hongo (Figura 9b), y seguido de esto se colocó en incubación a 27 °C por 7 días. En ambos ensayos se consideró como control el crecimiento individual del hongo. Al finalizar el ensayo, se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) que considera el radio del crecimiento del hongo individual y el radio del hongo en arreglo dual, y se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$PICR = \frac{R1 - R2}{R1} * 100$$

Donde:

R1: radio del hongo en las cajas control

R2: radio del hongo en los ensayos de antibiosis

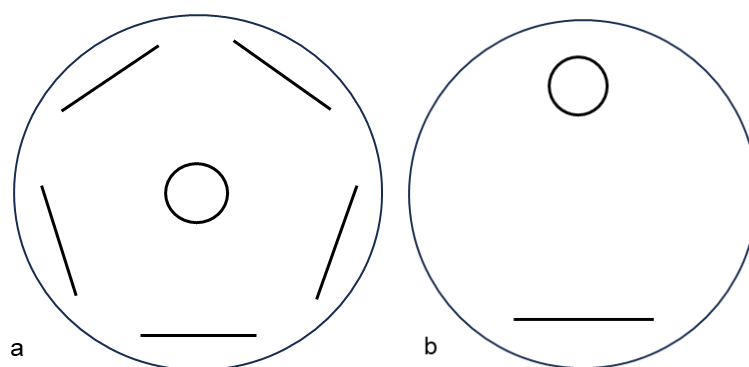


Figura 9. Diseño del ensayo de antagonismo de las rizobacterias con *Fusarium* sp. a) arreglo de barrido, b) arreglo dual.

6.1.5 Producción de exopolisacáridos (EPS)

Se evaluó la capacidad de las bacterias en la producción de exopolisacáridos por su función en el mejoramiento de las características del suelo y formación de biopelículas, en cultivos en la caja de petri con medio mineral modificado de acuerdo con Shyam *et al.* (2018) (2% extracto de levadura, 1.5% K_2HPO_4 , 0.02% $MgSO_4$, 0.0015% $MnSO_4$, 0.0015% $FeSO_4$, 0.003% $CaCl_2$, 0.0015% $NaCl$, 10% sacarosa y 1.5% de agar bacteriológico, ajustar pH a 7.5). En el ensayo, se sembraron 9 bacterias por punción, distribuidas de manera equitativa en el medio, y se incubaron por 7 días a 27 °C. Pasado este tiempo, se registraron como positivas a aquellas bacterias que mostraban colonias brillantes y de consistencia viscosa.

6.2 Diseño de bioinoculantes

Se seleccionaron las cepas de bacterias con los mejores atributos *in vitro* como promotoras del crecimiento vegetal, para el desarrollo de bioinoculantes individuales y en consorcio. Los bioinoculantes en consorcio se diseñaron de acuerdo con la complementariedad de las actividades de cada una de las bacterias. Además, se realizaron ensayos de confrontación entra las bacterias para analizar la compatibilidad de ellas en la formulación de los consorcios, por lo cual, se sembraron las bacterias en agar ST, formando líneas perpendiculares que tenían contacto entre ellas. La compatibilidad se reportó cuando no existía inhibición del crecimiento en la zona de intersección de las líneas de cada colonia. Los bioinoculantes se prepararon al inocular, con las bacterias seleccionadas, matraces con 10 mL de caldo soya tripticaseína, que se colocaron en agitación a 90 rpm, durante 24 hrs. Después de este tiempo, se midió la densidad óptica de los inoculantes en un espectrofotómetro, a una longitud de onda de 590 nm, y se diluyeron con agua estéril, hasta alcanzar una densidad óptica de 0.9, considerando que, a esta densidad óptica, los inoculantes se encuentran a una concentración

aproximada de 1×10^9 UFC, ulterior a esto, se realizaron las mezclas correspondientes en el caso de los consorcios, considerando volúmenes equivalentes de cada una de las rizobacterias.

6.3 Aclimatación de *Agave cupreata*

Las vitroplantas se obtuvieron mediante la técnica de micropropagación por organogénesis directa, a partir del proyecto realizado por la M. C. Birmania Rodríguez Heredia. Una vez que estas plántulas contaban con al menos dos raíces pasaron a formar parte de la fase de aclimatación, Para iniciar dicha fase, se realizó un pre acondicionamiento, donde se retiró las plántulas del medio semisólido, y se realizó un lavado de las raíces con agua corriente para retirar el agar excedente; después, estas se trasplantaron en recipientes de plástico con sustrato “*peat moss*”, y se colocó un sello de “*Kleen Pack*” en la boca del recipiente para mantener una alta humedad relativa, luego se colocaron en una zona de incubación, donde permanecieron durante 3 meses, con un fotoperiodo de 12 hrs de luz y 12 de oscuridad con luz LED blanca. Pasado este tiempo, se retiró el sello de “*Kleen Pack*”, y se trasladaron a una mesa de trabajo donde se les proporcionó luz natural, además se realizaron tres riegos a la semana con 10 mL de agua y fertilizaciones con la solución nutritiva Steiner, de la marca INVERFARMS (Tabla 2). En esta etapa se comenzó con las inoculaciones con las bacterias promotoras del crecimiento, estas se realizaron durante tres meses, inoculando una vez al mes (Figura 10).

Tabla 2. Contenido nutrimental de la solución STEINER (INVERFARMS).

Elemento	Fertilización 100% (ppm)	Fertilización 50% (ppm)
Macronutrientes		
Nitrógeno (N)	175	87.5
Fósforo (P)	47	23.5
Potasio (K)	313	156.5
Calcio (Ca)	181	90.5
Magnesio (Mg)	49	24.5
Azufre (S)	112	56
Micronutrientes		
Hierro (Fe-EDTA)	15	7.5
Manganeso (Mn-EDTA)	0.8	0.4
Zinc (Zn-EDTA)	0.3	0.15
Cobre (Cu-EDTA)	0.06	0.03
Boro (B)	0.4	0.2
Molibdeno (Mo)	0.06	0.03

Al finalizar el cuarto mes de tratamiento, las plántulas se trasplantaron a bolsas negras de poliestireno para vivero con una mezcla de sustrato Peat Moss y agrolita, en una proporción 1:1. En este punto se hizo una cuarta inoculación con bacteria para reforzar la carga bacteriana en el nuevo sustrato, y se modificaron los riegos a 50 mL una vez a la semana, debido a que se incrementó la cantidad de sustrato en las nuevas macetas (Figura 10).

Se aplicaron 5 mL, de una solución (2 mL del fungicida en un litro de agua) del fungicida PRIORI XTRA® (compuesto por 18.20% de azoxistrobin y 7.27% ciproconazol en peso seco) en el área superficial del sustrato para prevenir la aparición de hongos en este, y se reforzó la aplicación, ocho días después de la primera aplicación.

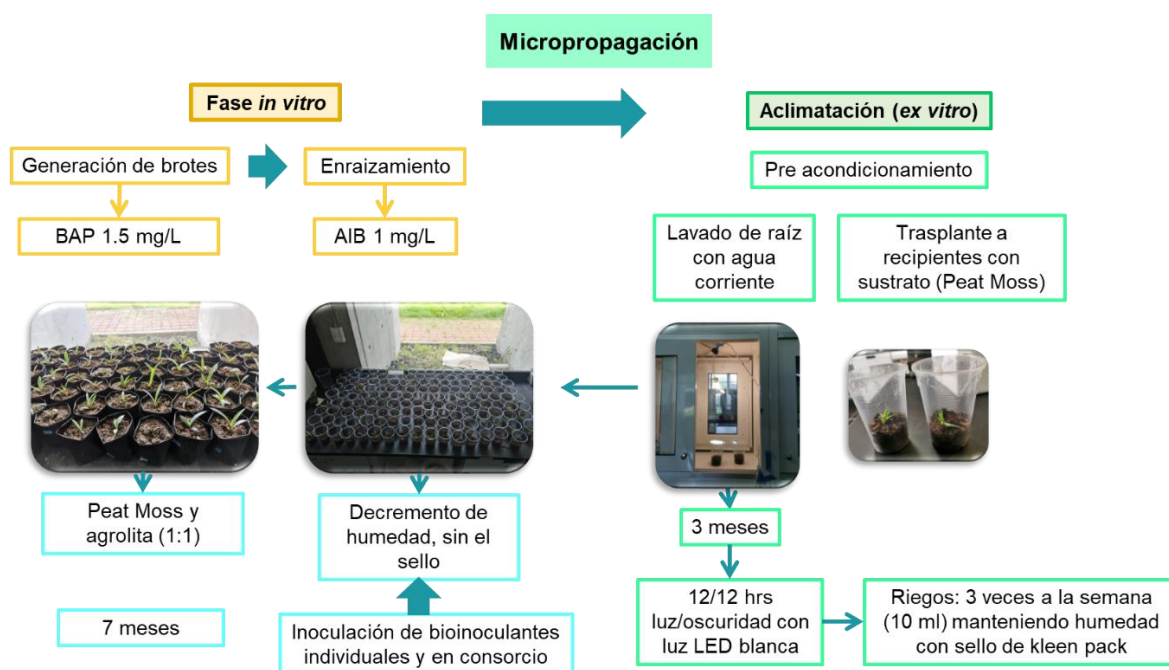


Figura 10. Proceso de aclimatación

6.3.1 Inoculación individual y en consorcio en plántulas de agave

El ensayo del efecto de las rizobacterias promotoras del crecimiento en la fase de aclimatación de las plántulas de agave consistió en 14 tratamientos con $n=10$ en cada uno de los tratamientos (Tabla 3). Se emplearon dos tratamientos control que consistían únicamente en la fertilización con la solución nutritiva STEINER al 100% como tratamiento nutricional completo para esta planta y al 50% como tratamiento reducido, aunado a esto, se adicionaron siete tratamientos con bioinoculantes

individuales, y cinco con bioinoculantes en consorcio. Cabe destacar que cada uno de los tratamientos con bacteria contaron con una fertilización reducida al 50%.

Las plántulas de los tratamientos con bacteria, se inocularon con 1 mL del bioinoculante en las inmediaciones de la zona radicular, mientras que los tratamientos control, se inocularon con 1 mL de caldo ST estéril en la misma zona, posterior a la inoculación, se regó con 10 mL de agua, para auxiliar a las bacterias a esparcirse en la zona radicular. Después de 15 días que se iniciaron las inoculaciones, se comenzó con las fertilizaciones con 5 mL de la solución nutritiva.

Tabla 3. Tratamientos de bioinoculantes individuales y en consorcio

No de tratamiento	Tratamientos
1	Sin inóculo + 100% Steiner (Fertilización completa)
2	Sin inóculo + 50% Steiner (Fertilización reducida)
3	AtoM6-4 1.0
4	650-78
5	AtoM6-4 y G50-78
6	Lad-7-1
7	Lad-7-1 y G50-78
8	AcuM11-4
9	AesM9-8
10	AcuM11-4, AesM9-8 y G50-78
11	AcuM11-4 y AesM9-8
12	C1-13
13	ACJ-14
14	ACJ-14, C1-13 y G50-78

Nota: Todos los tratamientos inoculados se complementaron con una fertilización con la solución nutritiva Steiner al 50%

6.3.2 Efecto de las rizobacterias en los parámetros morfológicos

Se realizaron tres mediciones de los parámetros morfológicos de las plántulas completas (Figura 11a). Estas mediciones, se realizaron en el inicio del periodo de inoculación bacteriana, en el momento del trasplante de las plántulas al nuevo sustrato (en el cuarto mes) y al finalizar la fase experimental con las plantas frescas (al séptimo mes). La altura de la planta (AP) se tomó desde la zona basal del tallo

de la plántula, hasta la punta de la hoja más larga. El diámetro de la roseta (DR) se midió con un vernier, tomando como base la punta de las hojas equidistantes con una mayor separación. El diámetro del tallo (DT) se midió con un vernier considerando la zona más ancha de este. El largo de la raíz (LR) se tomó desde el inicio de esta, hasta la punta de la raíz más larga. El peso fresco total se determinó con una balanza analítica. El peso seco total se estableció únicamente al finalizar la fase experimental, ya que se trata de una medición destructiva, para determinarlo, se cortó en pequeños trozos la muestra para posteriormente extraer la humedad presente en las muestras colocándolas en un horno a 80°C hasta llegar a peso constante.

Además, se cuantificó la densidad estomática y el grosor de la epidermis de las plantas (Figura 11b). Estas mediciones se llevaron a cabo al final de la fase experimental. En el caso de la epidermis, se realizaron cortes transversales a la segunda hoja más joven, y se midió el grosor con el programa ImageJ. En el caso de la densidad estomática, de acuerdo con Sosa-del Castillo *et al.* (2014), se colocó una capa de barniz transparente en la zona media de la segunda hoja más joven, tanto en el haz como en el envés de esta, y se retiró la capa con cinta adhesiva transparente. Se tomaron fotografías de la impresión del tejido en el aumento 5x del microscopio óptico, y se realizó el conteo de estomas en el programa ImageJ. La cuantificación se realizó con la siguiente fórmula:

$$\text{Densidad estomática} = \frac{\text{No estomas por campo}}{\text{Área del campo}}$$

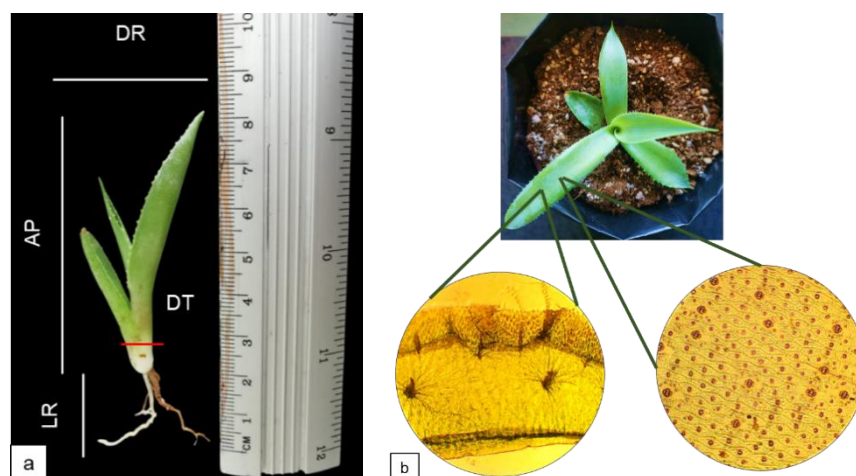


Figura 11. Efecto de las bacterias en parámetros morfológicos de plántulas de *A. cupreata*. a) Mediciones morfológicas, b) densidad estomática y grosor de la epidermis.

6.3.3 Efecto de las rizobacterias en los parámetros bioquímicos

Se midieron diversos parámetros bioquímicos con el propósito de analizar el efecto de las rizobacterias en el contenido nutrimental de las plantas, así como evaluar la calidad de estas. Por ello se realizaron ensayos para medir el contenido de clorofila, fenoles, y minerales (nitrógeno, fósforo y calcio) y otros, las proteínas y cenizas. Estos ensayos se realizaron al final de la fase experimental, considerando que se trata de experimentos destructivos, y se hicieron por triplicado. El contenido de minerales se determinó en el laboratorio de análisis de suelos, en el CIDAM, de acuerdo con las especificaciones establecidas en la norma mexicana NOM-021-RECNAT-2000, Que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos, estudios, muestreo y análisis (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, 2002); y el contenido de cenizas tomando en cuenta la norma NMX-F-607NORMEX-2020, Alimentos-Determinación de cenizas en alimentos-Método de prueba (Cancela la NMX-F-607-NORMEX-2013), (Secretaría de Economía, 2022), estos dos últimos se analizaron en el laboratorio de análisis de alimentos y bebidas no alcohólicas, en el CIDAM.

6.3.3.1 Clorofila

La clorofila se determinó por el método espectrofotométrico descrito por Sumanta *et al.* (2014), este método consiste en pesar 50 mg del tejido de las hojas, colocarlo en viales con siete mL de etanol al 96% y dejar en reposo por 24 horas, hasta extraer la clorofila en su totalidad. A continuación, se centrifugó a 2000 rpm durante 10 min y se separó el sobrenadante de los extractos. Luego se tomaron 200 µl de la muestra, y se midió la densidad óptica a 470, 649 y 652 nm, en un espectrofotómetro (Thermo Scientific Multiskan Go). El contenido de clorofila a, clorofila b y carotenoides se expresó como miligramos por gramo, y se calculó mediante las siguientes ecuaciones:

$$\text{Clorofila a (Ca)} = 13.36(A_{664}) - 5.19(A_{649})$$

$$\text{Clorofila b (Cb)} = 27.43(A_{649}) - 8.12(A_{664})$$

$$\text{Carotenoides} = \frac{(1000(A_{479}) - 2.13(Ca)) \times (97.62(Cb))}{209}$$

6.3.3.2 Fenoles

La cuantificación de fenoles se llevó a cabo basándose en la metodología de Nossa *et al.* (2016). Para preparar las muestras, se secaron las hojas en una estufa a 45°C para posteriormente molerlas con un mortero hasta pulverizarlas. Se mezclaron 0.05 g del polvo con 1.5 mL de una solución de metanol al 80% y ácido clorhídrico al 1% por 24 h, se guardó el sobrenadante y se repitió esta fase dos veces más. Se envolvieron los tubos con el sobrenadante, con aluminio, y se almacenaron en refrigeración a 3 °C. A continuación, se centrifugaron las muestras a 160 rpm durante 10 minutos, para posteriormente filtrar la muestra.

Una vez preparada la muestra, esta se analizó como se detalla a continuación. Se colocó en una microplaca de 96 pozos 50 µl del reactivo Folin-Ciocalteu, 2 µl de la muestra filtrada, 40 µl de Na₂CO₃, y 100 µl de agua de ósmosis, seguido de esto se mezcló hasta homogenizar y se dejó en reposo por 30 minutos y finalmente se leyó la absorbancia a 760 nm en un espectrofotómetro. Se preparó una curva estándar con ácido gálico (Figura 12) a diferentes concentraciones.

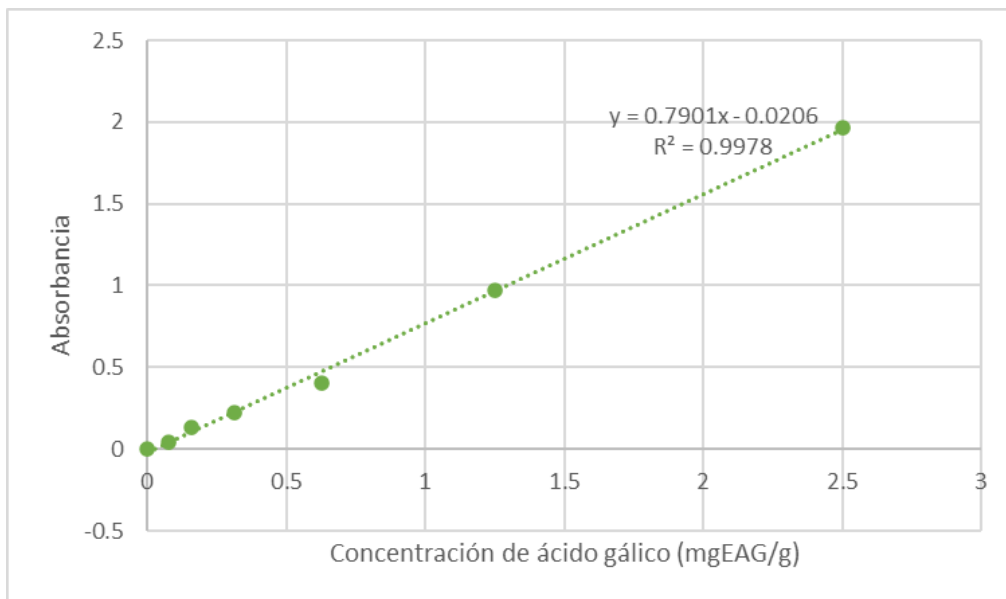


Figura 12. Curva de calibración del ácido gálico

6.3.3.3 Cenizas, minerales y proteínas

Se cuantificaron cenizas y minerales (nitrógeno, fósforo y calcio) para determinar la calidad de las plántulas.

El peso de las cenizas se determinó de la siguiente manera: la muestra se trituro en una licuadora, se pesó 1 g de la muestra homogénea. La mufla se corrió con un blanco de reactivo con agua desionizada para a continuación carbonizar la muestra en una parrilla de calentamiento a una temperatura inicial de 70 °C y hasta alcanzar los 120 °C. Las cenizas tienen que ser blancas o ligeramente grises. Las cenizas se pasaron a una estufa con una temperatura inicial de 90 °C hasta alcanzar los 100 °C por 20 min, seguido de esto, se pasó la muestra carbonizada dentro de un desecador hasta alcanzar la temperatura ambiente. Finalmente se pesó las cenizas en una balanza analítica.

Para la cuantificación del fósforo y el calcio, se pesaron 0.2 g de la muestra previamente licuada, y se realizó una predigestión de la muestra con 10 mL de ácido nítrico puro a 80°C durante 24 horas, luego se aforó el digerido a 20 mL con agua destilada y se filtró con un acrodisco o filtro de jeringa de 0.45 µm (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, 2002).

El fósforo de las plántulas se determinó de la siguiente manera: se tomó una alícuota de 2.5 mL del filtrado que se mezcló con 2.5 mL de la solución reductora, compuesta de una concentración de 0.5 g de ácido ascórbico en 100 mL de molibdato de amonio, y se aforó a 20 mL. Después de 30 min, esta mezcla se leyó en un espectrofotómetro a 650 nm. Se preparó una curva estándar con fósforo como solución patrón (Figura 13). El calcio se determinó por espectrofotometría de absorción atómica. Para ello, se tomó 5 mL de la muestra digerida y se midió la cantidad de calcio en el espectrofotómetro, a 422.7 nm. El contenido de calcio se calculó con la siguiente fórmula:

$$Ca\ soluble\ mmol/L \frac{(a - b) \times d}{PE}$$

Donde:

a: mg/L de Ca en el extracto diluido

b: mg/L en el blanco

d: Factor de dilución

PE: Peso equivalente (Ca= 20)

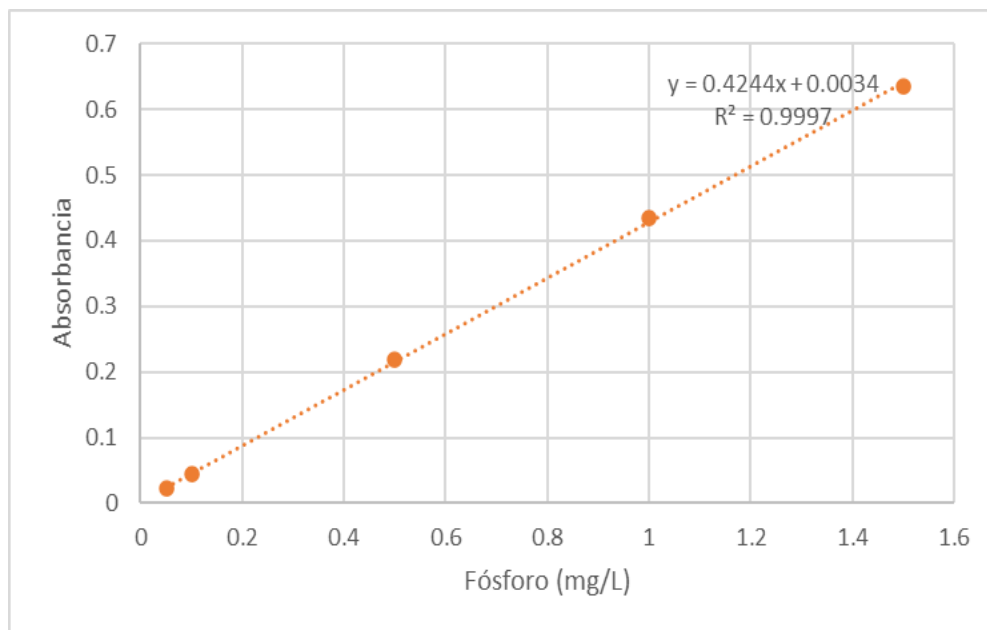


Figura 13. Curva de calibración del fósforo

En el caso de la cuantificación del nitrógeno total, este se envió para su análisis al Laboratorio Nacional de Nutrigenómica y Microbiómica Digestiva Animal (LANMDA) por el método de Dumas, de acuerdo con Saint-Denis y Goupy (2004). Se calculó el porcentaje de proteína tomando en consideración a Jones *et al.* (2020), quienes establecieron la correlación entre el porcentaje de nitrógeno con el contenido de proteína en los tejidos vegetales. La ecuación utilizada en este caso es la siguiente:

$$\%Proteína = FP \times \%N$$

6.4 Análisis estadístico

Los datos se analizaron mediante un análisis estadístico de ANOVA de una vía, además de una posterior comparación de medias a través de la prueba post hoc Tukey, con un nivel de significancia de 0.05, a fin de determinar si existen diferencias significativas entre los tratamientos. El análisis estadístico se llevó a cabo con el programa Statística (StatSoft, Inc., ver 8.0. 2007).

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El aislamiento de los microorganismos se realizó a partir de colectas de suelo de plantaciones de *A. cupreata* pertenecientes a la empresa “La Flor del Mezcal”, la cual se ubica en el municipio de Etúcuaro, Michoacán. Durante la búsqueda de dichos microorganismos, se encontraron de 22 colonias morfológicamente diferentes a partir de muestras rizosféricas colectadas; se registraron cinco colonias gram positivas y 17 gram negativas (Tabla 4). De estos aislados, se registraron 17 colonias bacterianas (47.2%) con alguna característica como promotoras del crecimiento. Además de esto, se complementó este ensayo con cuatro cepas (ACJ-14, Lad-7-1, C-13 y G50-78) obtenidas de la colección de rizobacterias del Laboratorio de Nutrición Vegetal, ubicado en el Centro de Innovación y Desarrollo Agroalimentario de Michoacán, que se encuentra a cargo del D. en C. Josué Altamirano Hernández, ya que estas rizobacterias, aisladas previamente de la rizósfera de caña de azúcar y agave, se han reportado como promotoras del crecimiento vegetal.

Tabla 4. Descripción de las bacterias aisladas

No de bacteria	Bacteria	Tinción gram	Morfología bacteria	Morfología colonia
1	ACJ-14	-	Bacilos	Color crema, tornasol a la luz, redonda, borde liso
2	G50-78	-	Bacilos	Traslucida, circular, bordes ondulados
3	Lad-7-1	+	Bacilos	Blanca, amorfa, opaca, borde liso
4	C1-13	-	Bacilos	Traslucida, amorfa, borde liso
5	Aculevv-3	+	Cocos	Blanquecina, translucida, amorfa, bordes lisos
6	AesM9-8	-	Bacilos	Blanquecina, amorfa, translucida, borde liso
7	AcuM11-2	-	Cocos	Amarilla, circular, translucida, borde liso
8	AcuM11-3	-	Bacilos	Circular, blanca, translucida, borde liso
9	AesM9-6	-	Bacilos	Blanca, translucida, amorfa, borde liso
10	AcuM1-8c	+	Cocos	Blanca, opaca, circular, borde liso
11	AinM4-1	-	Bacilos	Blanca, opaca, circular, borde irregular
12	AcuM1-1	-	Bacilos	Amorfa, blanca, opaca, borde irregular
13	AcuHo-1	-	Bacilos	Blanca, opaca, circular, bordes irregulares

Continuación

No de bacteria	Bacteria	Tinción gram	Morfología bacteria	Morfología colonia
14	AtoM6-1	+	Bacilos	Blanca, circular, opaca, borde liso
15	AtoM6-4 1.0	-	Bacilos	Blanca, circular, translúcida, borde irregular
16	AcuM11-1	-	Cocos	Blanquecina, amorfa, translúcida, borde liso
17	AcuM11-5	-	Bacilos	Blanca, tornasol a la luz, circular, borde liso
18	AcuM1-3	-	Bacilos	Crema, translúcida, amorfa, borde liso
19	AtoM6-3	-	Bacilos	Blancas, translúcidas, ovaladas, bordes irregulares
20	AtoM6-4 1.1	-	Bacilos	Blanquecina, translúcida, amorfa, bordes lisos
21	AesM9-7	-	Bacilos	Amarilla, circular, translúcida, borde liso
22	AesM9-5	-	Bacilos	Naranja, translúcida, circular, borde irregular
23	AcuHo-2	-	Bacilos	Blanca, circular, opaca, borde irregular
24	AcuM1-6	+	Bacilos	Naranja, circulares, de borde liso
25	AcuM1-2	+	Cocos	Amarilla, circular borde liso
26	AcuM11-4	-	Bacilos	Translúcida, blanquecina, circular, borde liso

Nota: En la tinción gram, “+”: gram positiva y “-”: gram negativa

7.1 Caracterización de las rizobacterias como promotoras del crecimiento

7.1.1 Solubilización de fosfatos

El fósforo es uno de los principales macronutrientes esenciales en las plantas debido a su papel en la nutrición y desarrollo vegetal, participa en procesos importantes como en la fotosíntesis, transferencia energética en el interior de la planta, formación de raíces, etc. (Kashawner *et al.*, 1980). Esta necesidad nutrimental, se ha suplementado extensamente por el uso de fertilizantes químicos, sin embargo, el uso de microorganismos del suelo puede ser una alternativa sustentable que contribuya a la solubilización y su posterior biodisponibilidad de estos minerales esenciales (Timofeeva *et al.*, 2022).

En los ensayos *in vitro* se realizó una prueba de solubilización de fosfatos, donde se aprecia un efecto positivo al encontrar un halo de aclaramiento alrededor de las

colonias (Figura 14), Aunado a esto, se calculó el Índice de Solubilidad (IS), dónde se observó un IS de 3.26 por la cepa control de *Burkholderia* sp., siendo esta la que presentó la mayor solubilidad, no obstante, los aislados bacterianos Lad-7-1, AesM9-8, G50-78 y AcuM11-4 alcanzaron un IS de 2.84 ± 0.58 , 2.81 ± 0.31 , 2.80 ± 0.12 y 2.55 ± 0.16 , respectivamente, el cual fue estadísticamente similar a *Burkholderia* sp.; por otro lado, el aislado con un menor IS fue AtoM6-4 1.0 con un índice de 2.15 (Tabla 5). Así mismo, los aislados Lad-7-1, AesM9-8, G50-78 y AcuM11-4 mostraron un IS similar al control positivo, sin embargo, se pueden considerar como buenas solubilizadoras de fosfatos, ya que se ha reportado al género de *Burkholderia* como un buen representante de esta actividad promotora (Bolívar-Anillo *et al.*, 2016). En apoyo a esta interpretación, Moreno-Conn *et al.* (2020), reportan índices de solubilidad de diferentes cepas de *Burkholderia* sp. que van de 1.20 a 2.26. Encontrando en nuestro caso, IS mayores para los aislados Lad-7-1, AesM9-8, G50-78 y AcuM11-4.

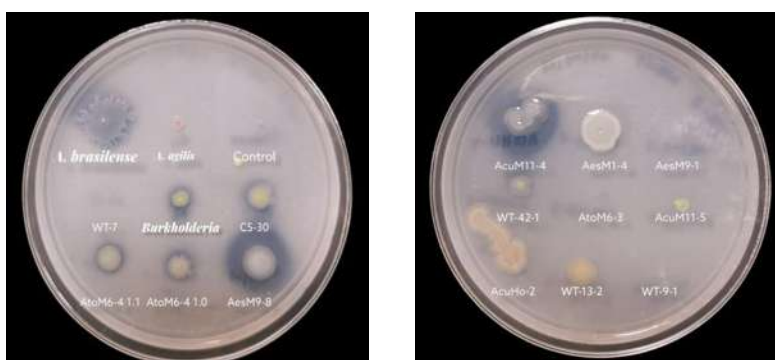


Figura 14. Capacidad de las bacterias para solubilizar fosfatos. El halo de aclaramiento indica actividad de solubilización.

7.1.2 Solubilización de calcio

El calcio es un macronutriente importante en el crecimiento vegetal, al actuar en procesos de división y elongación celular, así como en la activación enzimática (Prasad y Singh, 2020). Además, éste contribuye a generar una rigidez estructural en la pared celular al formar enlaces de polisacáridos de pectina dentro de la matriz extracelular (El Habbasha y Ibrahim, 2015), esta rigidez es una de las características primordiales en la aclimatación de plantas de agave, ya que la rigidez en la pared celular confiere estabilidad en los tejidos, además de proporcionar protección contra la invasión patogénica, la deshidratación y daños mecánicos (Kohorn, 2015).

La capacidad de solubilizar calcio se observa a través del crecimiento de un halo de aclaramiento alrededor de las colonias, en un medio con CaCO_3 como fuente insoluble de calcio (Figura 15). En este ensayo, se calculó el índice de solubilidad

de cada una de las cepas, siendo el mayor, el presentado por la cepa Aculevv-3 con un valor de 8.40, el cual fue significativamente mayor en comparación de la cepa control de *Burkholderia* sp. (con un IS de 2.38 ± 0.11). Otras cepas con un mayor IS, con respecto al control, fueron AcuM1-8c (4.43 ± 0.39), AtoM6-3 (3.04 ± 0.52) y ACJ-14 (2.80 ± 0.24) (Tabla 5). Hasta el momento no se han desarrollado suficientes estudios en la caracterización *in vitro* de las bacterias por su capacidad de solubilidad de calcio más que en su forma de fosfato tricálcico con el medio NBRIP. Sin embargo, Ramos *et al.* (2022) ensayaron el uso de rizobacterias solubilizadoras de calcio (como *Bacillus cereus* y *B. licheniformis*), en el cultivo de *Tagetes erecta* observando un incremento en diversos caracteres agronómicos, tales como la biomasa fresca y seca de raíces y hojas, y los carotenoides.

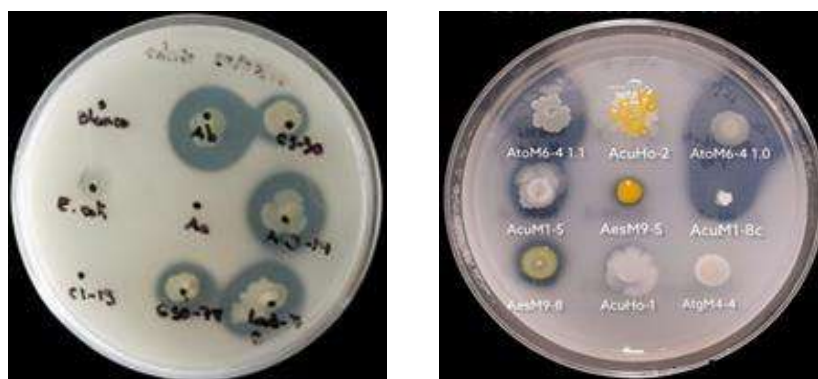


Figura 15. Ensayo de solubilización de calcio. El halo de aclaramiento alrededor de las colonias indica la capacidad de solubilidad.

7.1.3 Fijación biológica de nitrógeno

El nitrógeno es el principal macronutriente para el desarrollo de las plantas, es uno de los principales constituyentes de las proteínas y nucleótidos, sin embargo, también es un componente importante de la clorofila y del proceso fotosintético, así como en la producción del área foliar. Además, favorece la absorción de fósforo y potasio (Jahan *et al.*, 2016). Otra de sus funciones se relaciona con la estimulación del desarrollo radicular, y ayuda a la consecuente mejora de la tolerancia al estrés hídrico (Yuan *et al.*, 2022).

La capacidad de las bacterias para fijar nitrógeno se determinó en el medio semisólido libre de nitrógeno NFB, donde se pudo observar la actividad de las bacterias en esta función, por un viraje en el color del medio implementado con azul de bromotimol como indicador, el cuál inicialmente es de color verde y cambia a color azul por la alcalinización del medio, causado por el efecto de las bacterias al reducir el dinitrógeno atmosférico (N_2) en amonio (NH_3), forma soluble del nitrógeno

que las plantas pueden asimilar a partir de la solución del suelo (Figura 16). Las cepas analizadas con actividad de fijación de nitrógeno representan el 72% de las colonias estudiadas; resaltando las cepas ACJ-14, G50-78, Lad-7-1, AesM9-8, AcuM11-3, AcuM11-5 y AcuM11-4 debido a la intensidad del viraje de color producido, el cuál fue similar o superior a la cepa control *A. brasilense* sp45 (Tabla 5).

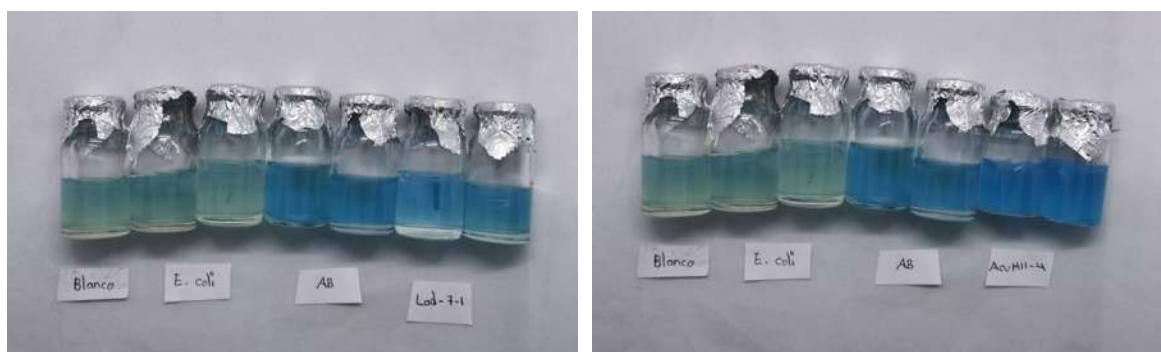


Figura 16. Fijación biológica de nitrógeno. La coloración azul indica la fijación de nitrógeno.

7.1.4 Producción de auxinas

Las auxinas son hormonas vegetales presentes en las plantas, que participan en procesos importantes como la elongación celular, división celular, fototropismo, dominancia apical, etc. Sin embargo, estas hormonas de igual manera pueden ser producidas por las bacterias presentes en el suelo rizosférico. Una de las auxinas principalmente producidas por las rizobacterias es el ácido indol-3-acético, que influye en el desarrollo del sistema radicular en las plantas, y de esta manera, mejora la absorción de nutrientes (Velasco-Jiménez *et al.*, 2020).

La determinación de las bacterias productoras de auxinas se llevó a cabo mediante la técnica colorimétrica del reactivo Salkowski en el sobrenadante producido por las bacterias, ya que este, al reaccionar con el anillo indólico de diferentes compuestos como el ácido indol-3-acético, produce un cambio en la coloración del sobrenadante a color rojo o rosa (Figura 17). Gilbert *et al.* (2018) mencionan la existencia de una correlación entre el color producido por la reacción, y el compuesto producido por las bacterias, de manera que el color rosa se produce en la presencia de ácido indol-3-acético, índol-acetamida y ácido índol-3-piruvico (siendo estos dos últimos compuestos precursores del ácido indol-3-acético), mientras que el color naranja ocurre ante el ácido Indol-3-butírico y el púrpura con el indoxil sulfato. En el ensayo de las bacterias analizadas, el 54% cuentan con efecto en la producción de

compuestos indólicos, posiblemente del tipo auxínico; las más sobresalientes fueron G50-78, ACJ-14, AesM9-6, AtoM9-6 1.0, AcuM11-5 y AcuM11-4 por la intensidad del color rosa producido, el cuál es similar o mayor a la cepa control (Tabla 5).

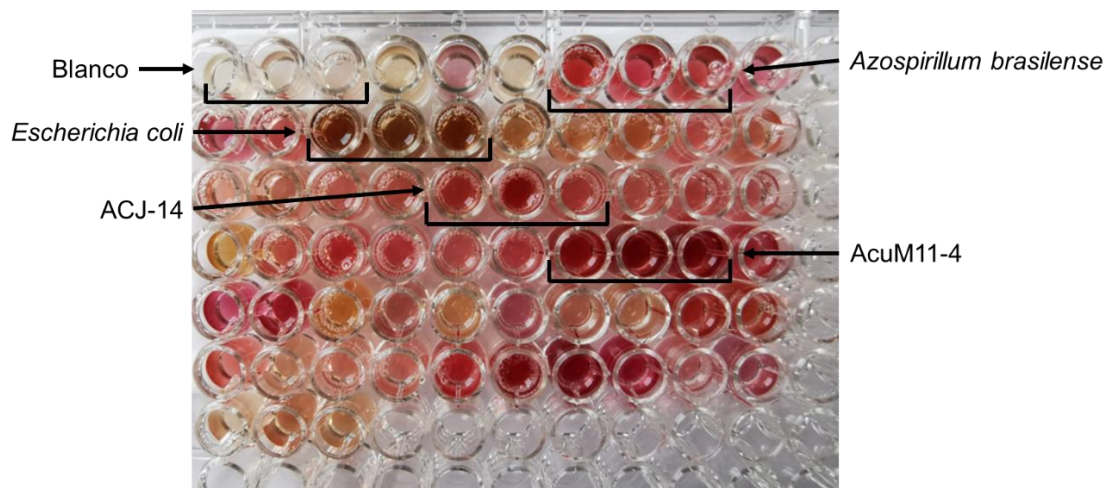


Figura 17. Producción de auxinas. La coloración rosa o roja indica la presencia de indoles

7.1.5 Producción de exopolisacáridos (EPS)

Los exopolisacáridos son exudados de las bacterias compuestos principalmente por polímeros de alto peso molecular y son los componentes principales de la formación de la biopelícula microbiana. Tienen importancia agronómica, al formar macroagregados del suelo como de las partículas de arcilla, las cuales regulan la retención de agua y nutrientes en las inmediaciones de las raíces, contribuyendo a la tolerancia al estrés biótico y abiótico (Ahmad *et al.*, 2021). La biopelícula (biofilm) confiere a las bacterias, la capacidad de establecerse en la superficie de las raíces con mayor facilidad, además, gracias a este compuesto, estos microorganismos presentan resistencia contra antibióticos, lo cual promueve su supervivencia en la zona radicular (Backer *et al.*, 2018). En el presente trabajo, se reportó como productoras de exopolisacáridos a aquellas bacterias que presentaban una colonia brillante y de consistencia viscosa (Figura 18). El 81.8% de las colonias evaluadas presentaron la morfología mencionada, sin embargo, resaltan las cepas Lad-7-1 y AesM9-6 con mayor viscosidad y adherencia de la colonia al asa bacteriológica en las cepas indicadas (Tabla 5).



Figura 18. Producción de exopolisacáridos por las bacterias aisladas. La consistencia viscosa indica la producción de exopolisacáridos

7.1.6 Antagonismo contra *Fusarium* sp.

Algunas bacterias tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos que afectan el vigor y desarrollo de las especies vegetales, esto lo llevan a cabo mediante diversos mecanismos como la producción de metabolitos o antibióticos que repercuten en el crecimiento del hongo, la inducción de resistencia, donde el antagonista estimula en las plantas respuestas de defensa contra el patógeno, competencia por nutrientes, la secreción de enzimas hidrolíticas, entre otros (Thambugala *et al.*, 2020).

Se calculó el Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Radial (PICR) de las confrontaciones entre las rizobacterias y *Fusarium* donde se observó un halo de inhibición (Figura 19); el 27% de las bacterias analizadas presentaron el halo de inhibición. Las cepas con un mayor PICR fueron Lad-7-1, AtoM6-1, AcuM1-1 y C1-13, estas cepas inhibieron en promedio el 58.9 ± 3.16 , 56.3 ± 4.33 , 50.5 ± 1.45 y $48.9 \pm 2.65\%$, respectivamente, el crecimiento radial del hongo *Fusarium* sp. (Tabla 5). Al respecto, Ben *et al.* (2018) estudiaron el efecto antagonista de diversas cepas de *Bacillus halotolerans* contra el patógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*, y registraron porcentajes de inhibición de 53.5 a 55.5%, siendo la cepa BFOA4 con el mayor porcentaje de inhibición.

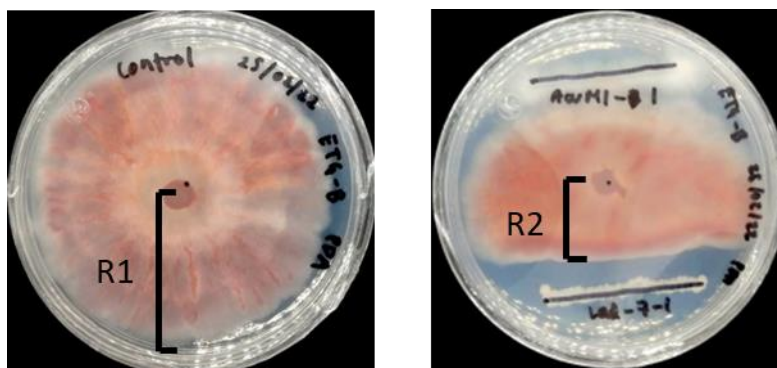


Figura 19. Confrontación de las rizobacterias analizadas contra *Fusarium* sp.

Después de caracterizar estos aislados por su actividad *in vitro* como promotoras del crecimiento, se seleccionaron a aquellas bacterias con los mejores atributos, de acuerdo con su actividad potencial como PGPR, por lo tanto se seleccionó a C1-13 por su capacidad de fijar nitrógeno y biocontrol contra enfermedades fúngicas; G50-78, ACJ-14 y AcuM11-4 por fijar nitrógeno y producir auxinas; Lad-7-1 por la fijación de nitrógeno, solubilización de calcio y fósforo, así como la producción de exopolisacáridos; y AtoM6-4 1.0 por tener algún efecto en todos los atributos mencionados (Tabla 5).

Tabla 5. Caracterización *in vitro* de las rizobacterias con efecto como promotoras del crecimiento vegetal.

Aislado	Nbrp (IS)	Calcio (IS)	Biocontrol (PICR)	NFB	Auxinas (indoles)		EPS
					Con Trp	Sin Trp	
<i>Azospirillum brasilense</i>	NA	NA	-	++	++	+	NA
<i>Escherichia coli</i>	NA	NA	-	-	-	-	NA
<i>Arthrobacter agilis</i>	-	-	-	NA	NA	NA	NA
<i>Burkholderia</i> sp.	3.26 ±	2.38 ± 0.11	-	NA	NA	NA	NA
	1.44 a	d					
ACJ-14	2.44 ±	2.8 ± 0.24	-	++	++	+	+
	0.29 ab	d					
G50-78	2.80 ±	2.6 ± 0.14	32.02 ± 2.3	++	+++	+++	+
	0.12 ab	d					
Lad-7-1	2.84 ±	-	58.89 ±	++	-	-	+++
	0.58 ab	-	3.16 a				
C1-13	2.37 ±	-	48.88 ±	+++	-	+	+
	0.031 ab	-	2.65 c				

Continuación

Aislado	Nbrp (IS)	Calcio (IS)	Biocontrol (PICR)	NFB	Auxinas (indoles)		EPS
					Con Trp	Sin Trp	
Aculevv-3	-	8.4 ± 0.67 a	-	+	+	+	-
AesM9-8	2.81 ± 0.31 ab	2.35 ± 0.17 d	-	++	-	+	+
AcuM11-2	-	2.35 ± 0.15 d	-	-	-	+	+
AcuM11-3	-	-	-	++	-	-	++
AesM9-6	-	-	-	-	++	-	+++
AcuM1-8c	-	4.43 ± 0.39 b	-	-	-	-	-
AinM4-1	-	-	-	++	-	-	-
AcuM1-1	-	-	50.53 ± 1.45 bc	-	+	+	-
Acuho-1	-	2.13 ± 0.04 d	-	-	-	-	-
AtoM6-1	-	-	56.3 ± 4.33 ab	-	-	-	-
AtoM6-4 1.0	2.15 ± 0.045 b	2.68 ± 0.09 d	25.22 ± 3.35 d	+	++	++	++
AcuM11-1	2.21 ± 0.02 b	-	-	+	-	-	++
AcuM11-5	-	-	-	++	++	+	++
AcuM1-3	-	-	-	+	+	+	+
AtoM6-3	-	3.04 ± 0.52 cd	-	-	-	-	-
AtoM6-4 1.1	2.21 ± 0.06 b	2.68 ± 1.44 bc	-	+	-	-	++
AesM9-7	-	2.37 ± 0.12 d	-	-	-	-	++
AesM9-5	-	2.19 ± 0.07 d	-	-	-	-	+
AcuHo-2	-	-	-	+	-	-	+
AcuM1-6	-	.	-	+	-	-	-
AcuM1-2	-	-	-	-	-	-	++
AcuM11-4	2.55 ± 0.16 ab	-	-	+++	++	++	+

*Simbología: NA: no aplica, -: no presentó, +: Efecto en color y viscosidad (en EPS) menor que el control, ++: efecto similar al control, +++: efecto mayor al control. Código de acuerdo con Mohamad *et al.*, 2020. Las letras diferentes indican diferencias significativas (p<0.05).

7.2 Efecto de las rizobacterias en los parámetros morfológicos de vitroplantas de *Agave cupreata*, durante la aclimatación

El fertirriego consiste en la aplicación de fertilizante en presentación líquida, aplicándolo en conjunto con el agua de riego, generalmente mediante un microaspersor o un sistema de goteo (Mattos *et al.*, 2022), este tiene algunas ventajas sobre la fertilización tradicional aplicada en los cultivos, ya que se presenta un constante suministro de nutrientes, reduciendo la fluctuación de nutrientes; existe una eficiente aplicación y aprovechamiento de los nutrientes de acuerdo con los requerimientos nutricionales; se aplica el fertilizante en todo el volumen de suelo irrigado; además de proporcionarse de manera soluble en el riego, esto último resulta útil en la aclimatación de las plántulas, debido a que los nutrientes pueden ser directamente aprovechados por las plantas (Kafkafi y Kant, 2005). En otro aspecto Zúñiga-Estrada (2013), menciona la importancia de aplicar un adecuado fertirriego en los cultivos de agave, ya que se obtiene un mayor crecimiento de las plantas, como en el caso de plantas de *A. tequilana* de 4 a 77 meses de edad, aplicando un fertirriego con 162, 50 y 250 kg ha⁻¹ de N, P₂O₅ y K₂O, respectivamente. Por estas ventajas, el fertirriego es la principal forma de fertilización aplicada en la fase de aclimatación reportada en la literatura y se determinó una técnica eficiente para aplicar en este proyecto.

En el estudio realizado, se observó el efecto de las rizobacterias en los parámetros morfológicos durante la fase de aclimatación de las vitroplantas, dónde se observó un aumento en el desarrollo de gran parte de estos parámetros, en comparación con los tratamientos control, en los cuales se aplicó únicamente fertilización química (Figura 20). Sin embargo, se observó que la fertilización completa tuvo un efecto adverso en parámetros como el peso fresco, la altura, número de hojas, diámetro de tallo y diámetro de roseta en comparación de la fertilización reducida. Esto difiere de lo obtenido por Enríquez-del Valle *et al.* (2020), quienes concluyen que el aumento de la concentración de la solución Steiner tiene una relación positiva en cuanto al aumento de los parámetros ya mencionados, al obtener un mayor crecimiento de las plantas aclimatadas de *A. potatorum* con la fertilización completa. Sin embargo, Enríquez-del Valle *et al.* (2012) mencionan como la fertilización al 66% en plantas aclimatadas de *A. angustifolia*, tuvieron un efecto mayor en el crecimiento de los parámetros evaluados de esta especie, en parámetros como el número de hojas, largo y ancho de las hojas, peso seco de raíces y peso seco de la parte aérea. Por ello, se deduce que la fertilización requerida difiere entre especies de agave. En este estudio en este proyecto, la fertilización adecuada en la aclimatización de *A. cupreata* es la fertilización reducida al 50%, sin embargo cabe resaltar que la fertilización realizada en las inoculaciones bacterianas, las cuales se relacionaron con un mayor desarrollo morfológico, fue la concentración reducida de la solución

nutritiva, siendo igual al 50% óptimo para el crecimiento, por lo tanto sería interesante verificar si se puede obtener un crecimiento similar o mayor a este control (fertilización reducida), si se disminuye la concentración de la fertilización en los tratamientos con bacterias, teniendo incidencia en un menor costo en la planificación de una aclimatación masiva de estas plántulas.

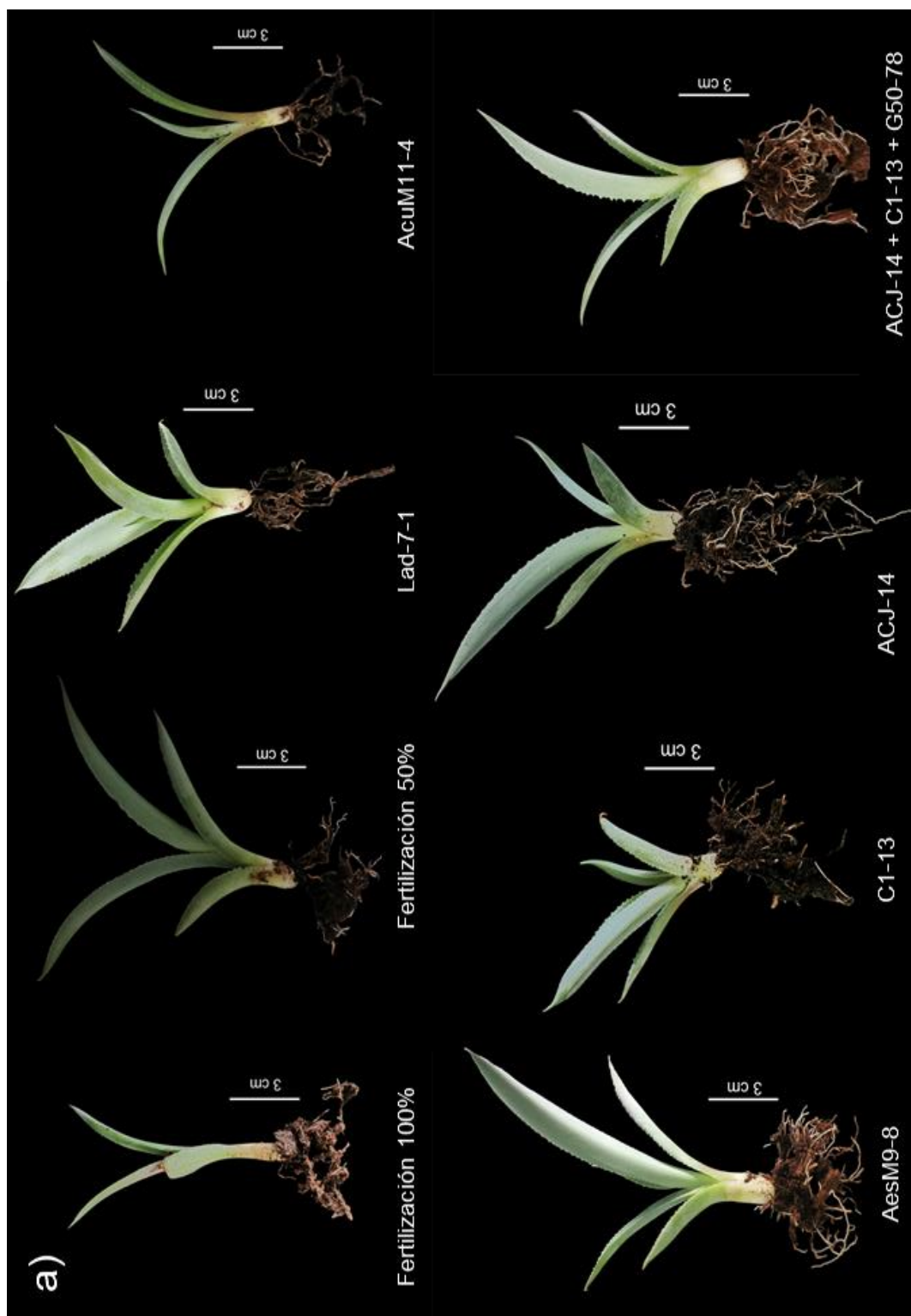


Figura 20. Efecto de las inoculaciones con rizobacterias en la morfología de las plántulas. a) Crecimiento al cuarto mes, b) crecimiento al séptimo mes

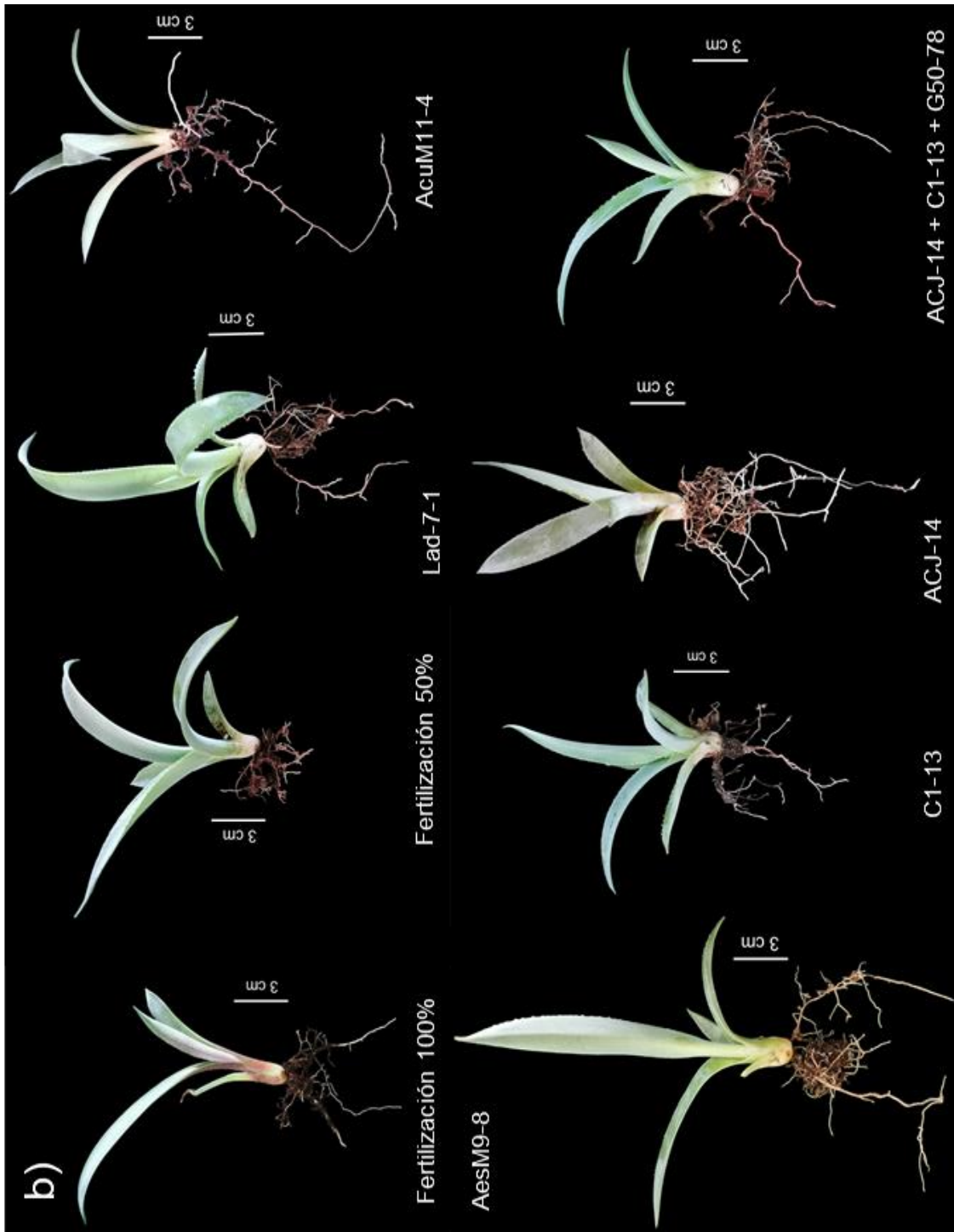


Figura 20. Efecto de las inoculaciones con rizobacterias en la morfología de las plántulas. a) Crecimiento al cuarto mes, b) crecimiento al séptimo mes

7.2.1 Altura de las vitroplantas

La altura de las plántulas se vio positivamente influenciada por la fertilización reducida, durante los primeros cuatro meses, aumentó un 38.7% (5.73 ± 1.51 cm) con respecto a la fertilización completa (4.13 cm), sin embargo, este efecto fue numéricamente mayor, aunque estadísticamente similar, con los consorcios ACJ-14 + C1-13 + G50-78 y Lad-7-1 + G50-78, incrementando el 28.5 (7.37 ± 1.05 cm) y 15.7% (6.63 ± 0.65 cm) respectivamente, contrastándolas con la fertilización reducida. Al final del séptimo mes, las plantas con la nutrición reducida incrementaron un 50% (8.9 ± 0.9 cm) su crecimiento con respecto a la nutrición completa (5.93 ± 0.92 cm), sin embargo, se logró la mayor altura en el tratamiento de las plantas inoculadas con la cepa AcuM11-4, al incrementar el crecimiento longitudinal en un 8% (9.61 ± 1.36 cm), y, en menor medida, el consorcio de ACJ-14 + C1-13 + G50-78 aumentó el 2.2% (9.10 ± 0.55 cm), con respecto a la fertilización reducida (Figura 21). Adicionalmente, es notorio como la cepa AcuM11-4 logró incrementar poco más del doble de la altura de los individuos del tratamiento, en el periodo comprendido tras el momento del trasplante al nuevo sustrato (cuarto mes) y el séptimo mes de tratamiento, resultando la bacteria más influyente en el tamaño de las plántulas durante este periodo. Lo indicado anteriormente, quizá es posible por ser productora de auxinas, contribuyendo en el incremento de la longitud radicular de los vegetales durante este periodo, al facilitar la obtención de nutrientes de los individuos vegetales en este tiempo, y contribuyó en el aumento de la altura. Con relación a este incremento en altura causado por los microorganismos rizosféricos, Montoya-Martínez *et al.* (2019), reportaron la relación de hongos micorrízicos arbusculares en *A. tequilana*, y visualizaron un aumento del 41.4% en la altura de las plantas, por parte de hongos aislados en el municipio Paso ancho, en el estado de Michoacán, sin embargo, este resultado fue significativamente similar al control.

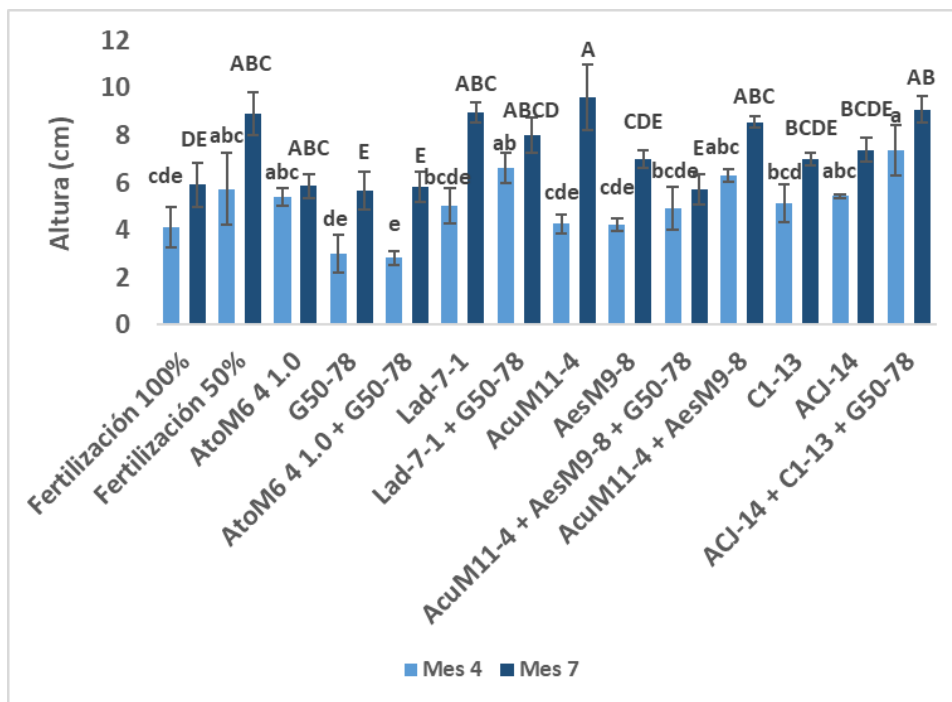


Figura 21. Efecto de las rizobacterias promotoras del crecimiento en la altura de *A. cupreata*. Promedio $\pm$ DE. Las letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas al cuarto mes, y las letras mayúsculas diferentes diferencias significativas al séptimo mes, Tukey $p < 0.05$ ($n = 10$)

7.2.2 Diámetro de roseta

El tratamiento con la fertilización reducida incrementó un 23.1% (5.33 ± 0.49 cm) el diámetro de la roseta de las plántulas de agave con respecto a la fertilización completa (4.33 ± 0.32 cm), mientras que, al séptimo mes, este incremento fue del 8.7% (10.80 ± 2.72 cm), el cuál fue estadísticamente similar. Por otra parte, los tratamientos con las rizobacterias aumentaron el 26.2% o 6.7 ± 0.45 cm (AcuM11-4), y el 25% o 6.66 ± 0.50 cm (Lad-7-1 y el consorcio ACJ-14 + C1-13 + ACJ-14) en comparación con la fertilización reducida, al cuarto mes, mientras que, al séptimo mes, únicamente la cepa Lad-7-1 incrementó este parámetro un 10.5% o 11.93 ± 0.46 cm (Figura 22). El incremento en el diámetro de la roseta se ve influenciado por el crecimiento de las hojas, por lo que estas bacterias pudieron haber influenciado en este crecimiento, al tratarse de cepas fijadoras de nitrógeno y solubilizadoras de fósforo, nutrientes esenciales para el desarrollo de las hojas en plantas. Por otro lado, esto tiene relación con lo reportado por Bautista-Cruz y Martínez-Gallegos (2020), quienes registraron un aumento del 48.6% en el diámetro de roseta de plántulas de *A. potatorum*, al ser inoculadas con cepas de *Burkholderia cepacia*, *Favobacterium* sp. y *Paenibacillus amylolyticus*, en comparación del control.

A partir de las siguientes gráficas únicamente se considerará a la fertilización reducida, debido a que no se observó un efecto notable de la fertilización completa, en comparación de los demás tratamientos, además de considerarse importante comparar los tratamientos bacterianos con la fertilización reducida (al 50% de la recomendación) ya que estos, de igual manera, se complementaron con una fertilización al 50%.

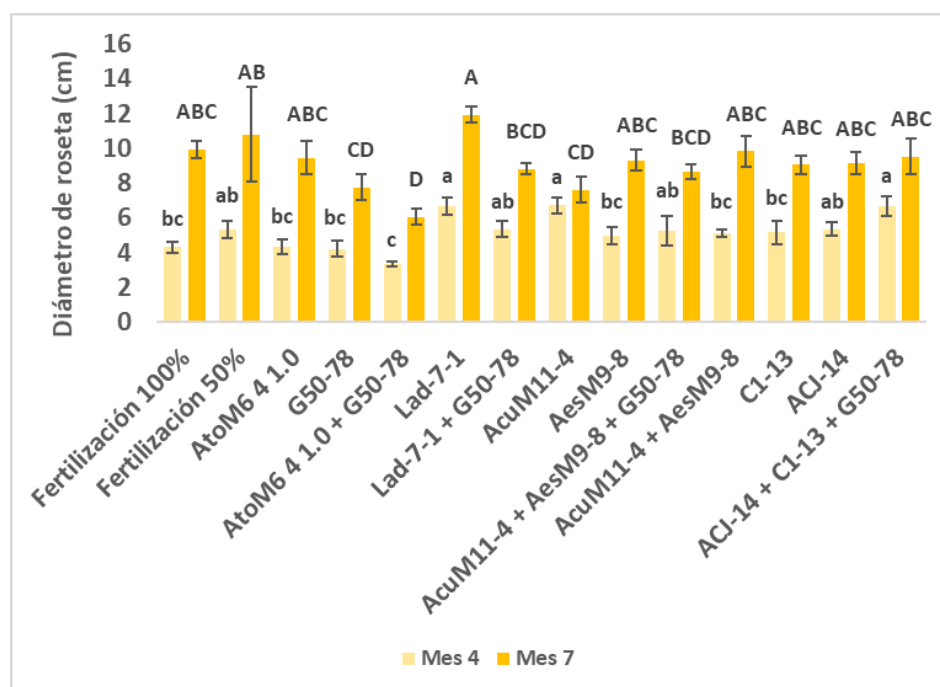


Figura 22. Efecto de las rizobacterias promotoras del crecimiento en el diámetro de la roseta de *A. cupreata*. Promedio $\pm$ DE. Las letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas al cuarto mes, y las letras mayúsculas diferentes diferencias significativas al séptimo mes, Tukey $p < 0.05$ ($n=10$)

7.2.3 Diámetro del tallo

El tallo de los agaves es un órgano importante dónde se almacena agua y nutrimentos esenciales para su desarrollo, es en esta zona dónde se almacena la mayor cantidad de fructanos, los cuales, serán utilizados como reservorio energético para la reproducción sexual (Regalado *et al.*, 2021).

En este estudio se observó que, al cuarto mes, la fertilización completa logró un 15 % (0.19 ± 0.01 cm) de incremento (no significativo) del tallo en comparación del control con la fertilización reducida (0.16 ± 0.06 cm), en el caso de las plantas inoculadas con C1-13, como por ACJ-14, se registró un incremento del 100% (0.33 ± 0.06 cm). Además de un aumento del 92% (0.32 ± 0.07 cm) por el consorcio ACJ-14 + C1-13

+ G50-78, en relación a la fertilización reducida, sin embargo, estos fueron estadísticamente similares entre ellos. En cambio, al séptimo mes, se registró un incremento del 25% (0.5 ± 0.10 cm) por la fertilización reducida, en comparación de la completa (0.4 ± 0.10 cm), mientras que hubo un crecimiento significativamente mayor en las plantas inoculadas con la cepa C1-13, el cual fue del 53.3% (0.77 ± 0.15 cm), en relación a la fertilización reducida, esto se debe a que la bacteria es una buena solubilizadora de fósforo y fijadora de nitrógeno, nutrientes necesarios para el crecimiento diametral del tallo. Otros tratamientos que sobresalen son las inoculaciones con AesM9-8 y con el consorcio AtoM6-4 1.0 + G50-78 (ambas incremento el 33.3% o 0.67 ± 0.6 cm), bacterias solubilizadoras de fósforo, calcio, y fijadoras de nitrógeno (Figura 23). Este incremento del tallo por parte de las bacterias también se puede observar en el trabajo de De la Torre-Ruiz *et al.* (2016), quienes obtuvieron un incremento del diámetro de *A. americana* del 108.7% (0.48 cm) con la inoculación de *Pseudomonas mosselii*, en contraste con el tratamiento fertilizado con $\text{KNO}_3\text{-N}$ (0.23 cm), y, de igual manera, esta bacteria es una buena solubilizadora de fósforo.

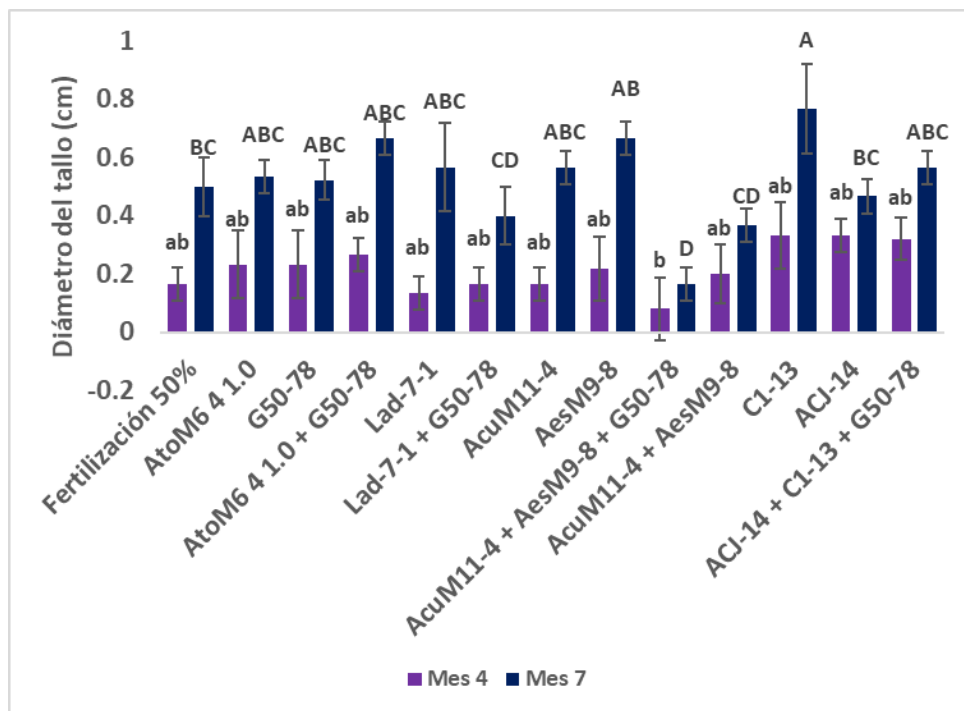


Figura 23. Efecto de las rizobacterias promotoras del crecimiento en el diámetro del tallo de *A. cupreata*. Promedio $\pm$ DE. Las letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas al cuarto mes, y las letras mayúsculas diferentes diferencias significativas al séptimo mes, Tukey $p < 0.05$ ($n = 10$)

7.2.4 Desarrollo de las hojas

7.2.4.1 Número de hojas

Durante la fase de aclimatación, hay un recambio de hojas en plantas de agave donde se sustituyen las hojas generadas en condiciones *in vitro* como estrategia para adaptarse de manera fisiológica en su desarrollo, estas primeras hojas generadas mediante la micropropagación son frágiles, delgadas, sus estomas no son funcionales, su cutícula no se encuentra muy desarrollada y es delgada, la tasa de transpiración que realizan es alta, además de una tasa fotosintética baja, por lo tanto, al generar nuevas hojas de manera adecuada, estas empiezan a tomar características similares a condiciones naturales como es una capa de cera, y cutícula adecuada, rigidez, grosor, desarrollo estomático y sistema fotosintético adecuado y la presencia de espinas en los bordes (Cruz *et al.*, 2017). Todas estas características se notaron en las plántulas de *A. cupreata* durante la fase de aclimatación, sin embargo, se hablará un poco más a detalle de ello a continuación.

En este estudio, la fertilización reducida incrementó el número de hojas en un promedio de 1.33, a comparación de la fertilización completa (con 0.92 ± 0.14 hojas), al mes 4. Sin embargo, aun cuando fue estadísticamente similar, los tratamientos con la cepa Lad-7-1 y el consorcio AesM9-8 + AcuM11-4 mostraron un incremento de 2.3 ± 0.58 hojas en comparación de la fertilización completa, además, el consorcio ACJ-14 + C1-13 + G50-78 aumentó el número a 1.6 ± 0.58 hojas, y la bacteria C1-13 tuvo un incremento de 1.5 ± 0.57 hojas. Al séptimo mes, el incremento por parte de la fertilización reducida fue de 2.2 hojas, mientras que la bacteria Lad-7-1 influyó en un incremento de 2.7 ± 0.50 hojas (Figura 24). En cuanto al consorcio de AesM9-8 + AcuM11-4, al inicio del ensayo presentó un incremento en el número de hojas (2.3 ± 0.58 hojas), no obstante, al final del séptimo mes se produjo una disminución con 1.7 ± 0.50 hojas, esto se puede ver reflejado en el hecho de que al momento del trasplante (al séptimo mes), debido al estrés ocasionado, no hubo un incremento del desarrollo de raíces por parte de las plántulas de este tratamiento, afectando a la toma de nutrientes y agua, y probablemente, en respuesta estas plántulas eliminaron las hojas más viejas para compensar esta pérdida de nutrientes, pero no lograron desarrollar nuevas hojas. De igual manera, De la Torres-Ruiz *et al.* (2016), observaron un incremento en el número de hojas en un 166.7% (4 hojas) ocasionada por la cepa *Rizobium daejeonense*, en comparación con el tratamiento fertilizado (1.5 hojas).

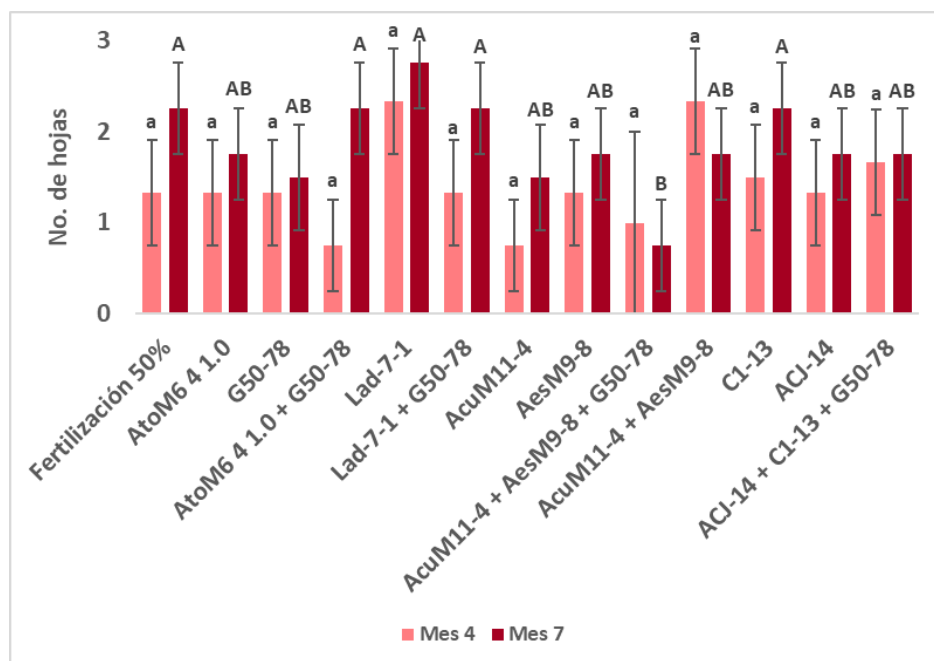


Figura 24. Efecto de las rizobacterias promotoras del crecimiento en el número de hojas de *A. cupreata*. Promedio $\pm$ DE. Las letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas al cuarto mes, y las letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas al séptimo mes, Tukey $p < 0.05$ ($n=10$).

7.2.4.2 Densidad estomática (DE).

La transpiración de las plantas se encuentra relacionada con la densidad y apertura de los estomas, además del número y distribución de estos influye directamente sobre la asimilación clorofílica (Sosa del Castillo *et al.*, 2014).

Se cuantificó la densidad estomática tanto del haz como del envés de las plántulas para determinar el efecto de las bacterias en este parámetro (Figura 25). Se registró una densidad estomática del haz, de las plantas con fertilización completa, de 15.23 ± 2.41 estomas/cm², así como un aumento del 7.6% (16.40 ± 1.46 estomas/cm²) con la fertilización reducida, comparándola con la fertilización completa, no obstante, se observó un incremento significativamente mayor en las plantas inoculadas con AcuM11-4 (40.5% o 23 ± 2.07 estomas/mm²), AtoM6-4 + G50-78 (38.3% o 22.68 ± 2.08 estomas/mm²), AtoM6 4 1.0 (32% o 21.66 ± 2.10 estomas/mm²) y Lad-7-1 + G50-78 (24.8% o 20.48 ± 0.42 estomas/mm²) con respecto al control de fertilización reducida (Figura 26a). En la densidad estomática del envés, se observó un incremento del 31.1% (17.48 ± 0.33 estomas/mm²) en la fertilización reducida, en comparación con la completa (13.33 ± 0.33 estomas/mm²). Este parámetro fue significativamente mayor en los tratamientos AcuM11-4 (35.5% o 23.69 ± 1.03 estomas/mm²) y AtoM6-4 + G50-78 (30.8% o 22.86 ± 3.02 estomas/mm²), en

relación a la fertilización reducida (Figura 26b). Este incremento de los estomas en los tratamientos mencionados se relaciona con lo estudiado por Bazaldúa-Muñoz *et al.* (2008), quienes comentan que la disminución paulatina del potencial hídrico durante la fase de aclimatación de plantas de tomate se vio relacionado con un aumento en la densidad estomatal. Por otra parte, Francisco *et al.* (2011) descubrieron un incremento de la densidad estomática en la aclimatación de *Laelia eyermaniana* (planta CAM), contrastando con plantas *in vitro* de la especie, además de notar una disminución del tamaño de los estomas, ya que esto les ayuda a las plantas a controlar la tasa de transpiración, esta reducción en el tamaño de los estomas, también se observó en las plántulas de *A. cupreata*. Añadido a esto, Sosa del Castillo *et al.* (2014) observan una mayor densidad estomática de plántulas aclimatadas de *A. fourcroydes*, a los 7 meses de esta etapa, en condiciones semicontroladas (31.78 estomas/ μm^2 en el haz y 34.14 estomas/ μm^2 en el envés), tiempo en que son consideradas aptas para pasar a invernadero, no obstante a los 15 meses de aclimatación, tiempo apto para pasar a una plantación comercial, presentaron una disminución de la densidad estomática (23.54 estomas/ μm^2 en el haz y 29.43 estomas/ μm^2 en el envés), esto debido a la reducción de reservas nutritivas y sufrir una mayor pérdida de agua. Por otra parte, la densidad estomática reportada de las plantas inoculadas, difiere de Monja-Mio *et al.* (2015), quienes reportan una densidad estomática de alrededor de 45 estomas/ mm^2 en el haz y 37 estomas/ mm^2 en el envés, en plantas de *A. angustifolia* con 5 meses de aclimatación, no obstante esta diferencia en la densidad estomática puede deberse a la diversidad de especies, empero si se observó un aumento de la densidad estomática de estas plantas cuando se trasladaron a un vivero sombreado (55 estomas/ mm^2 en el haz y 50 estomas/ mm^2 en el envés) y posteriormente en campo (68 estomas/ mm^2 en el haz y 46 estomas/ mm^2 en el envés).

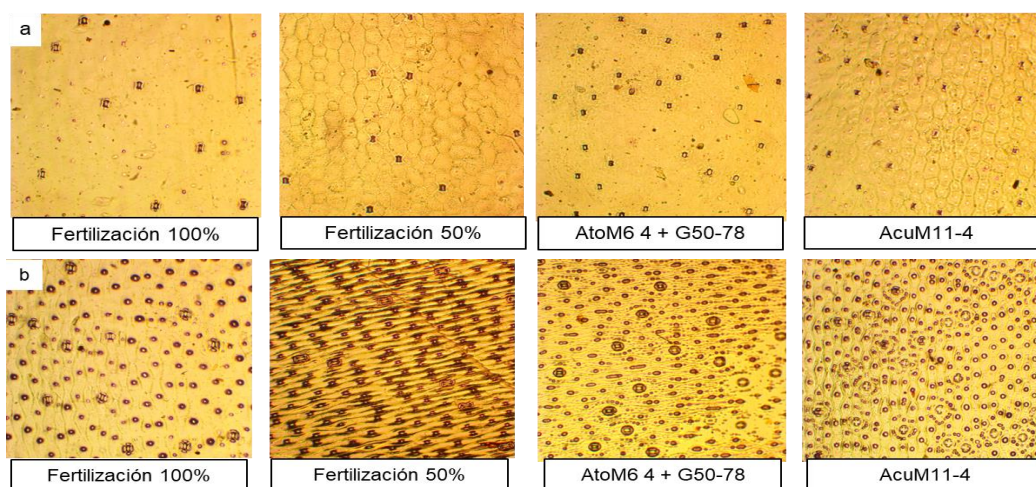


Figura 25. Influencia de las rizobacterias promotoras en la densidad estomática (DE) de *A. cupreata*. a) Densidad estomática en los tratamientos con mejor resultado de haz b) Densidad estomática en los tratamientos con mejor resultado del envés

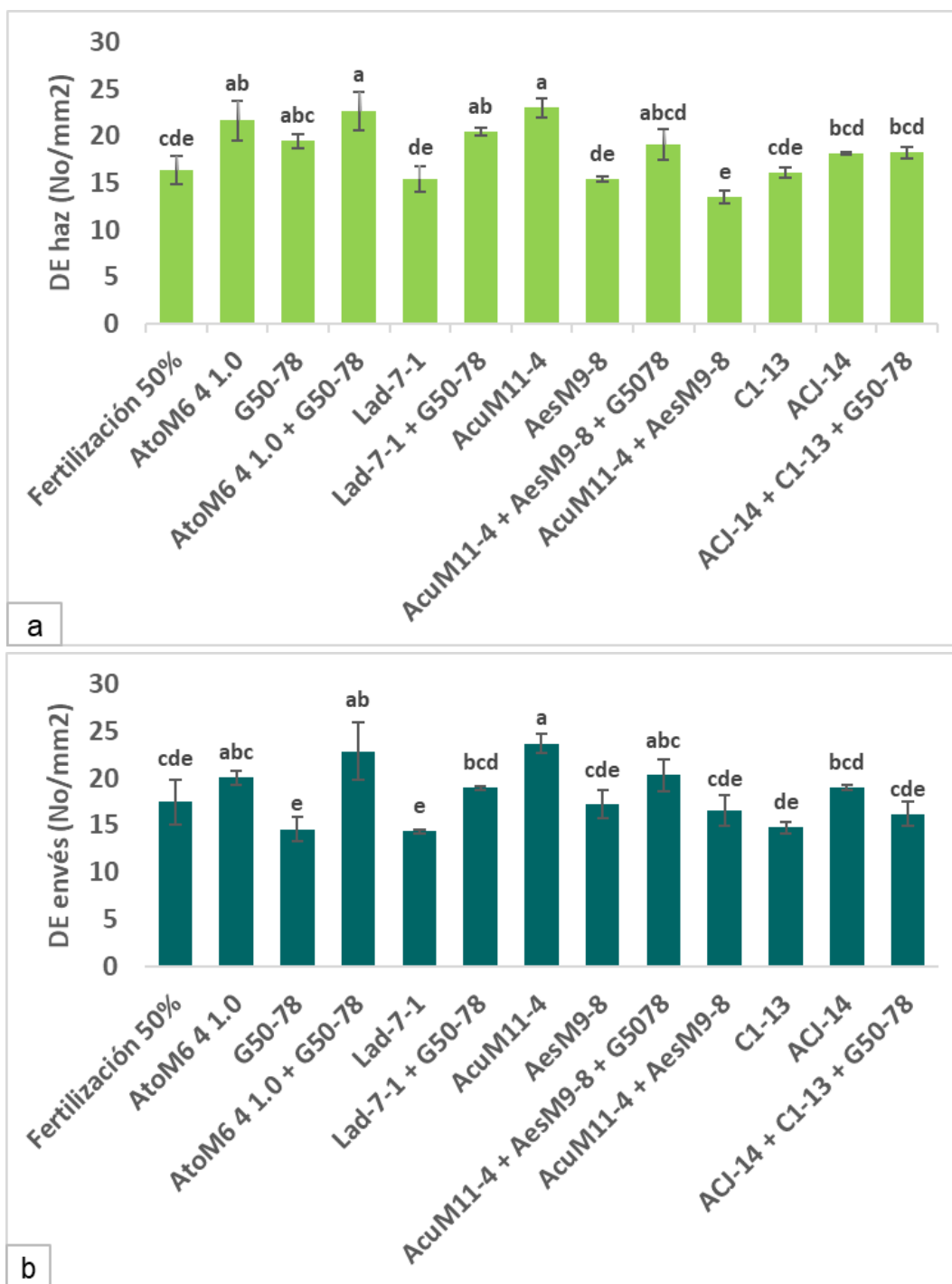


Figura 26. Efecto de las rizobacterias promotoras del crecimiento en la densidad estomática de las hojas de *A. cupreata*. a) Densidad estomática del haz, b) densidad estomática del envés. Promedio $\pm$ DE. Las letras diferentes indican diferencias significativas Tukey $p < 0.05$ ($n = 10$).

7.2.4.3 Epidermis

La epidermis es una capa celular que cubre los órganos vegetales, y cumple diversas funciones en la protección de las estructuras internas y la comunicación con el medio externo, por ejemplo, las células guarda de la epidermis participan en el intercambio gaseoso, la forma de las células modulan la temperatura de las hojas y la cera epicuticular tiene una función hidrofóbica que acumula gotas de agua para posteriormente resbalar por la superficie de las hojas, y autorregarse, lo cual contribuye a la supervivencia en hábitats áridos (Riglet *et al.*, 2021).

Las vitroplantas desarrollan hojas con una capa epidérmica delgada o algo colapsada, debido a lo cual, el retraso en el desarrollo de la epidermis de las vitroplantas se ve reflejado en un deficiente desenvolvimiento de las estructuras epidérmicas como la cutícula, la cera epicuticular y el aparato estomático, lo cual, al ser trasplantadas en condiciones *ex vitro*, estas deficiencias tienen consecuencias en la regulación de la transpiración y el potencial hídrico (Donnelly y Tisdall, 1992; Chandra *et al.*, 2010).

En este caso, en las plantas inoculadas con la cepa C1-13 se registró un incremento del grosor de la epidermis del haz en un 76% (0.62 ± 0.09 mm), siendo significativamente mayor en comparación con los demás tratamientos, por otra parte, el incremento por parte de la fertilización completa fue del 14.2% (0.40 ± 0.08 mm), en relación con la fertilización reducida (0.35 ± 0.06 mm) (Figuras 27a y 27c). En relación al grosor de la epidermis del envés se observó positivamente influenciado por AtoM6-4 1.0, AcuM11-4 y ACJ-14, con un incremento del 21.6 (0.38 ± 0.04 mm), 14 (0.36 ± 0.02 mm) y 14% (0.36 ± 0.007 mm) respectivamente, en relación con la fertilización reducida, mientras la fertilización reducida presentó un aumento del 34% (0.31 ± 0.03 mm) en relación a la fertilización completa (0.23 ± 0.004 mm) (Figuras 27b y 27c). Tomando en consideración a Pinto *et al.* (2011), durante la fase de aclimatación ocurre un aumento en el desarrollo de la epidermis de plántulas de *Eucalyptus globulus*, especialmente de la cutícula, en este sentido, un decremento en el desenvolvimiento de este se reflejaría en una mayor transpiración no estomática, así como una excesiva pérdida de agua, lo cual tendría repercusiones en la supervivencia de las plántulas. De igual manera, Pérez *et al.* (2016) registran un aumento del tamaño de las células epidérmicas de plántulas aclimatadas de *A. fourcroydes* como una modificación a las características histológicas que ocurren durante la fase de adaptación a un medio *ex vitro*. Por lo tanto, un crecimiento adecuado y desarrollo de la epidermis les confiere a las plántulas aclimatadas una ventaja en su adaptación a condiciones externas. En otro sentido, la succulencia en agaves no depende únicamente de la cantidad de agua almacenada en las hojas, si no también se relaciona con el grosor del tejido epidérmico y la capacidad de

retención, la succulencia es una de las características fisiológicas que desarrollan los agaves para enfrentarse al estrés por sequía (Pérez-López *et al.*, 2019).

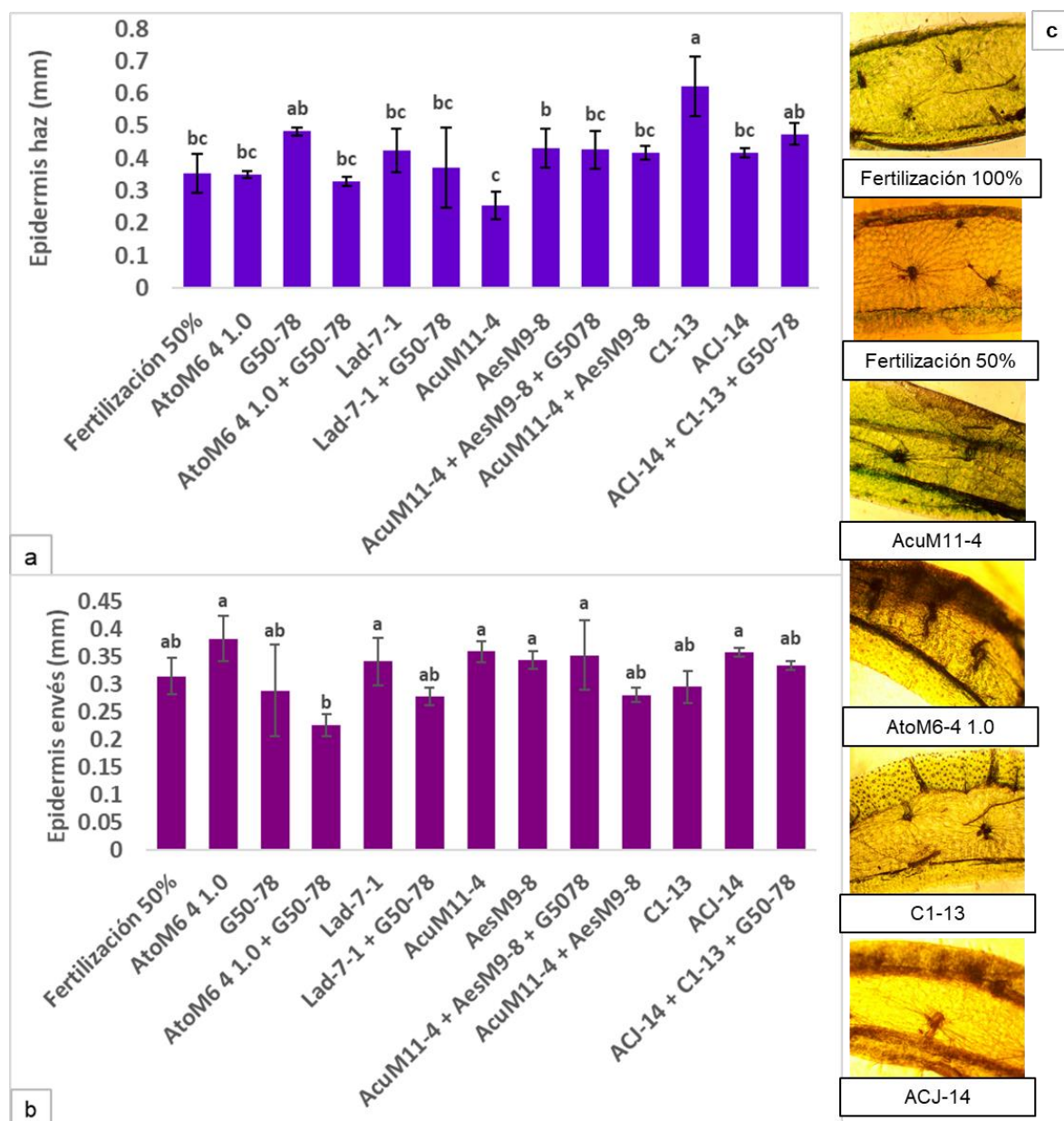


Figura 27. Efecto de las rizobacterias promotoras del crecimiento en el grosor de la epidermis de las hojas de *A. cupreata*. a) Epidermis del haz, b) epidermis del envés. Promedio $\pm$ DE. Las letras diferentes indican diferencias significativas Tukey $p < 0.05$ ($n=10$), c) influencia de las rizobacterias promotoras en el grosor de la epidermis de *A. cupreata*

7.2.5 Longitud de raíces

El crecimiento y desarrollo de las raíces es un factor importante en la aclimatación de plantas micropropagadas, ya que este influye directamente en el desarrollo de otros parámetros como el área foliar, número de segmentos nodales, peso fresco y seco, clorofila total, entre otros (Silva *et al.*, 2021).

El crecimiento longitudinal de la raíz se vio afectada positivamente, al cuarto mes, por la bacteria C1-13, incrementando el 367.6% (5.30 ± 0.70 cm) en relación de la fertilización reducida (1.13 ± 0.47 cm), siendo este crecimiento significativamente mayor a comparación de las 2 fertilizaciones sin inóculo bacteriano. Otros tratamientos con un efecto positivo es la inoculación con Lad-7-1 (crecimiento de 308.8% o 4.63 ± 0.30 cm) y el consorcio AcuM11-4 + AesM9-8 (302.9% o 4.57 ± 1.18 cm). El crecimiento de la raíz en esta etapa es esencial, ya que las plántulas empiezan con el establecimiento y adaptación a las condiciones *ex vitro*. Por otro lado, al séptimo mes, los tratamientos con un efecto significativamente mayor fueron AcuM11-4, incrementando la longitud radicular en un 292.9% (9.30 ± 2.16 cm) contrastando con la fertilización reducida (2.37 ± 0.98 cm), y el consorcio de ACJ-14 + C1-13 + G50-78, incrementando el 250.7% (8.30 ± 0.98 cm). Otros tratamientos con un efecto notable son ACJ-14 (226.8% o 7.73 ± 1.07 cm) y C1-13 (211.5% o 7.37 ± 2.87 cm) (Figura 28). De igual manera, el desarrollo radicular juega un papel importante en esta fase, al ser trasplantadas a un nuevo sustrato, el establecimiento adecuado de las raíces les permitirá una obtención oportuna de nutrientes necesarios para las plantas. En este caso, la capacidad de estas cepas para producir auxinas es probable que haya ocasionado este crecimiento de las raíces, además, la actividad de estas para solubilizar fósforo es otra característica involucrada en este desarrollo.

Como mencionan Ramírez-Tobias *et al.* (2019), un efecto de *A. cupreata* a la restricción de la humedad es la disminución en la biomasa radical, además de un incremento en la biomasa foliar, teniendo incidencia en el índice raíz/vástago, de manera que el mantenimiento de la biomasa foliar se explica como una adaptación para mantener una reserva importante de agua en las hojas, por lo cual, parece innecesario, en estas condiciones, el aumento del volumen radicular de estas plantas. De igual manera, el aumento en la longitud de la raíz causado por AcuM11-4, C1-13, ACJ-14 y el consorcio ACJ-14 + C1-13 + G50-78 aun en condiciones de estrés, propicia una ventaja, ya que, al no disminuir esta y conservarse la biomasa fresca, se relaciona con mayor absorción de nutrientes y agua y conserva de estos recursos en las estructuras foliares.

El efecto de las rizobacterias en la longitud de las raíces de las plántulas de *A. cupreata* tiene relación con lo reportado por De la Torre-Ruiz *et al.* (2016), ya que

ellos registran un incremento de este parámetro en *A. americana* inoculado con la cepa de *Rhizobium daejeonense*, significativamente mayor (86%) en comparación del tratamiento fertilizado.

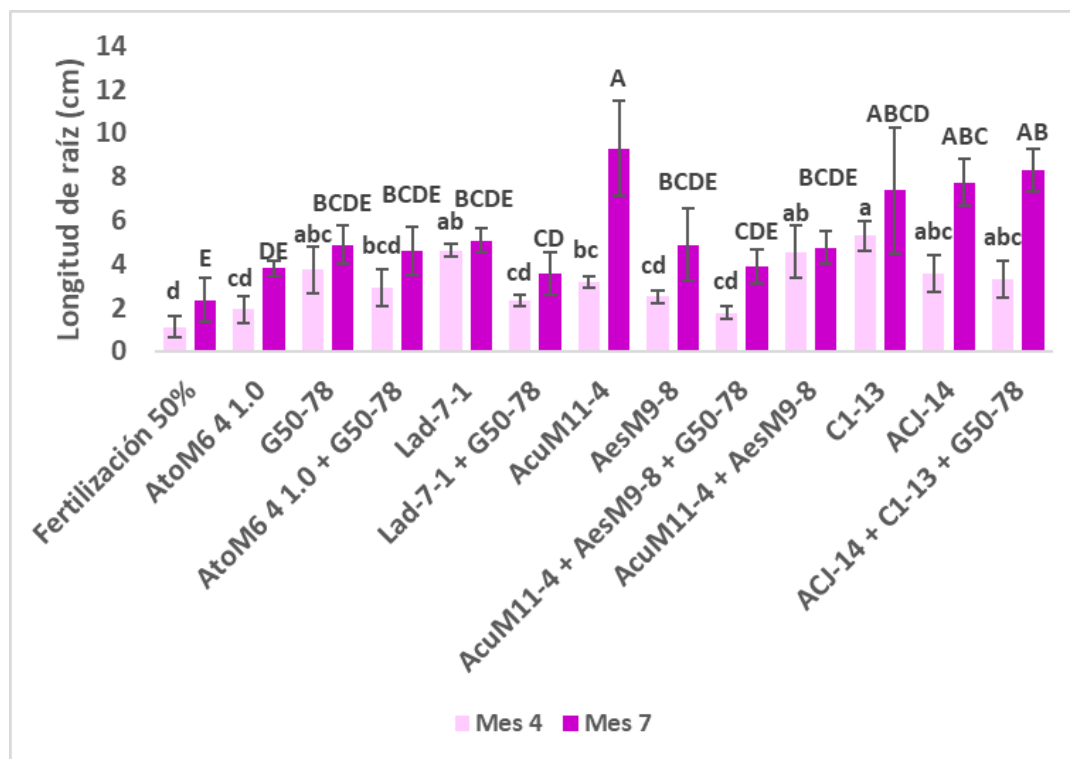


Figura 28. Efecto de las rizobacterias promotoras en el desarrollo de la longitud de raíz de *A. cupreata*. Promedio $\pm$ DE. Las letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas al cuarto mes, y las letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas al séptimo mes, Tukey $p < 0.05$ ($n=10$).

7.2.6 Biomasa fresca total

El peso fresco de las plántulas se determinó al cuarto mes del ensayo, tiempo en el que se llevó a cabo el trasplante en el nuevo sustrato, y al finalizar el experimento, en el séptimo mes de evaluación. Al cuarto mes, la fertilización reducida tuvo un incremento del 66.5% (3.51 ± 1.11 g) de biomasa fresca con respecto a la fertilización completa (2.11 ± 0.79 g), sin embargo, aun cuando fue estadísticamente igual, se observó un aumento del 60.5 (5.65 ± 0.65 g) y 11.4% (3.92 ± 0.28 g) por la inoculación de Lad-7-1 y el consorcio compuesto por ACJ-14 + C1-13 + G50-78, respectivamente, en comparación con la fertilización reducida. Al séptimo mes, la fertilización reducida mostró un incremento del 90% (6.94 ± 0.41 g) con respecto a la fertilización completa (3.65 ± 0.53 g), no obstante, en esta etapa, las plantas inoculadas con la cepa Lad-7-1 mostraron el mayor peso fresco, incrementado el

21.7% (8.45 ± 0.84 g), con respecto a la fertilización reducida (Figura 29). Esto se relaciona con el crecimiento de varios parámetros causado por esta bacteria, así como la disponibilidad de nutrientes propiciados por esta, y la formación de exopolisacáridos que facilita la retención de estos nutrientes. En este sentido, Montoya-Martínez *et al.* (2019) registran un incremento de la biomasa fresca en plantas de *A. tequilana* inoculadas con hongos micorrícicos arbusculares, destaca la inoculación con los hongos aislados del municipio Barranca de las nueces, sitio donde predominaron hongos del género *Acaulospora* y *Glomus*, aumentando un 186.6% este peso, en comparación del tratamiento sin inóculo. Por otro lado, Cruz *et al.* (2013), mencionan la existencia de una relación del peso fresco de las plantas y el contenido de azúcares reductores presentes, representando este componente, alrededor del 25 a 30% del peso fresco, por lo tanto, es importante procurar un buen desarrollo en el peso de las plántulas, sobre todo del tallo de estas, ya que la acumulación de biomasa en agaves constituye un punto de interés para los productores.

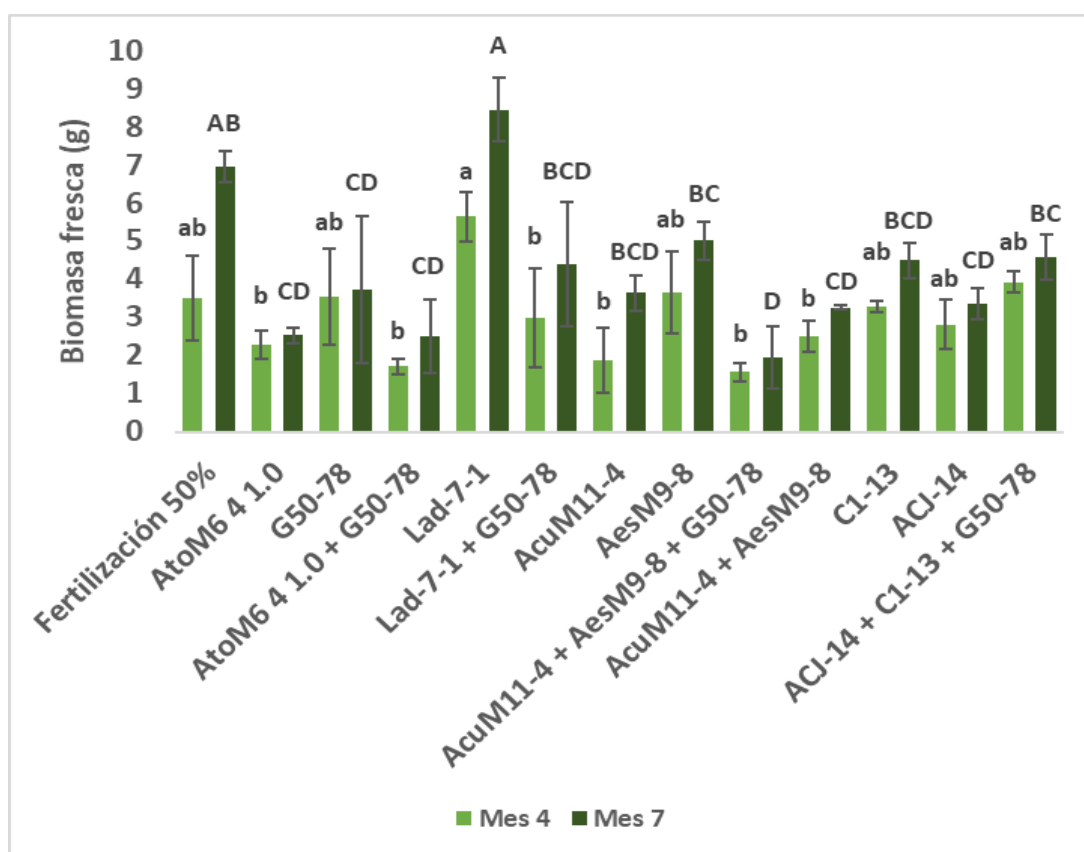


Figura 29. Efecto de las rizobacterias promotoras del crecimiento en la biomasa fresca de *A. cupreata*. Promedio $\pm$ DE. Las letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas al cuarto mes, y las letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas al séptimo mes, Tukey $p < 0.05$ ($n = 10$).

7.2.7 Biomasa seca total

La biomasa fresca de las plantas de agave es el agua que constituye el cuerpo succulento característico de los agaves, como una adaptación para habitar en climas áridos, por otro lado, el peso de los tejidos de la biomasa seca de las plantas es bajo en comparación. Esta biomasa está compuesta de un 95% de carbono, hidrógeno y oxígeno, 5% restante representan el resto de los elementos. Por lo tanto, la biomasa seca es un buen estimador del contenido total de carbono en las plantas (Zuñiga 2013; Benedetto y Tognetti, 2016).

La biomasa seca se cuantificó al finalizar la fase experimental por tratarse de una medición destructiva. La fertilización reducida produjo un incremento en la biomasa seca total de las plantas en un 34% (0.29 ± 0.11 g) con respecto a la fertilización completa (0.22 ± 0.03 g), sin embargo, este crecimiento fue superado por el tratamiento con Lad-7-1 y el consorcio ACJ-14 + C1-13 + G50-78, incrementando un 41% (0.41 ± 0.06 y 0.41 ± 0.04 g, respectivamente) este parámetro con respecto a la fertilización reducida, además de estos dos tratamientos, también es notable el efecto de AesM9-8, mostrando un aumento del 23.6% (0.36 ± 0.06 g) de la biomasa seca total con relación a la fertilización reducida (Figura 30). La biomasa seca es uno de los parámetros estudiados con frecuencia en relación del efecto de las rizobacterias promotoras del crecimiento en el desarrollo de las plantas, con respecto a esto, Bautista-Cruz y Martínez-Gallegos (2020) estudiaron el efecto de bacterias fijadoras de nitrógeno en *A. potatorum* en parámetros como el peso seco de las plántulas, y reportan un incremento del 164.8% en la biomasa seca total, por *Flavobacterium* sp. además del 317.1% en la biomasa seca del tallo de estas plantas por *Paenibacillus amyloolycoticus*. Por otro lado, la poca disponibilidad de agua en el medio puede repercutir negativamente en el peso seco de las plantas; en este sentido, Ramírez-Tobías *et al.* (2014), documentaron el efecto de la restricción de la humedad en diversas plantas de agave, así como en *A. cupreata*. Ellos observaron que la respuesta de esta planta a un riego restringido (-3.5 MPa), disminuyó significativamente el peso seco del vegetal, sin embargo, en el caso de este estudio, las plántulas tratadas con Lad-7-1 y ACJ-14, mantuvieron una mayor biomasa seca, por lo que esto le confiere una ventaja morfológica para adaptarse de manera más eficiente al cambio en las condiciones ambientales.

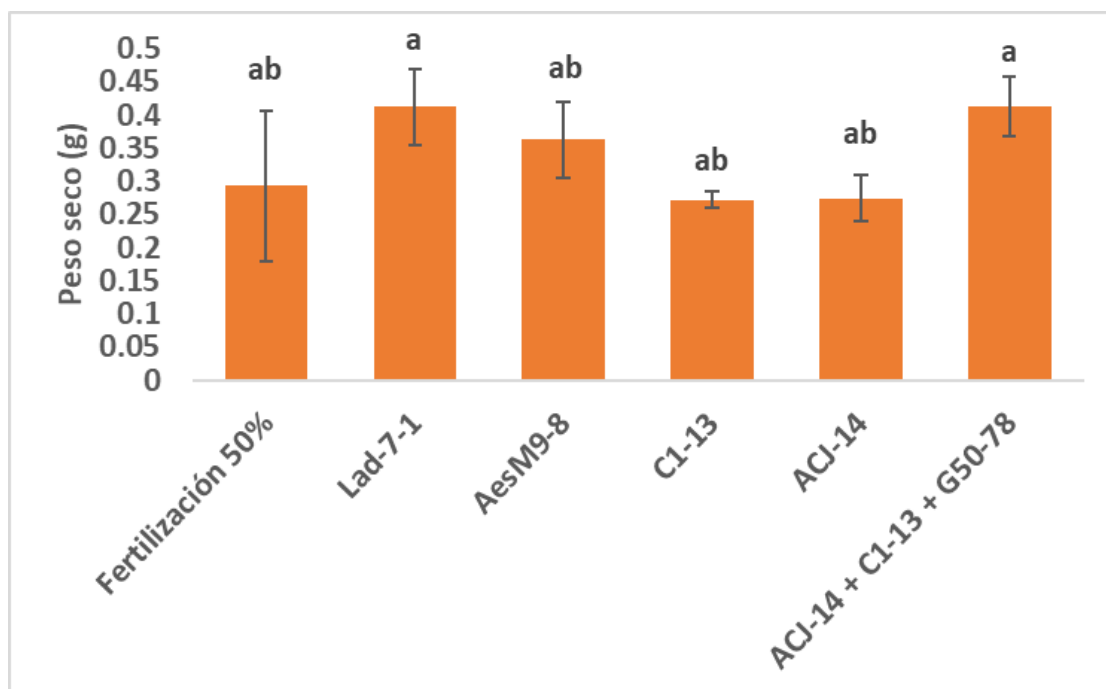


Figura 30. Efecto de las rizobacterias promotoras del crecimiento en la biomasa seca de *A. cupreata*. Promedio $\pm$ DE. Las letras diferentes indican diferencias significativas Tukey $p < 0.05$ ($n = 10$).

7.3 Efecto de las rizobacterias promotoras del crecimiento en parámetros bioquímicos

7.3.1 Clorofila a, b, total y carotenoides

La clorofila es el pigmento esencial en las plantas que convierte la energía solar en energía química para posteriormente obtener carbohidratos con el propósito de ser usados como fuente de alimento. La clorofila a es la principal molécula fotosintética en las plantas, absorbe esencialmente la luz roja y su pico de absorción se encuentra entre los 420-660 nm, en cuanto a la clorofila b, es el segundo tipo de clorofila, esta auxilia a la clorofila a en el proceso fotosintético, absorbe la luz azul y su rango de absorción es de 453-625 nm (Pareek *et al.*, 2017). Los carotenoides son pigmentos que recogen energía lumínica y la transfieren a las moléculas de clorofila mediante la transferencia de excitación, este estado de transferencia a partir de los carotenoides es baja durante la fotosíntesis, sin embargo, tienen un papel importante de fotoprotección (Takashi, 2019).

No se encontraron diferencias significativas del contenido de clorofila a, de los tratamientos con respecto a las fertilizaciones sin inóculo, sin embargo, si se pudo observar un incremento del 11.2% ($145 \pm 15.11 \mu\text{g/mg}$) por parte del tratamiento AesM9-8, además del 9.4% ($142.8 \pm 13.21 \mu\text{g/mg}$) en el caso de Lad-7-1, con

respecto a la fertilización reducida, por otra parte, la fertilización reducida incremento el contenido de este pigmento en un 4.8% ($130.6 \pm 1.84 \mu\text{g/mg}$) con respecto a la completa ($124.64 \pm 4.44 \mu\text{g/mg}$) (Figura 31a). En cuestiones de la clorofila b, el tratamiento ACJ-14 + C1-13 + G50-78 mostró un incremento, siendo este del 13.8% ($99.70 \pm 6.98 \mu\text{g/mg}$), en comparación de la fertilización reducida, siendo significativamente similar a este y estadísticamente mayor a la fertilización completa. Por otro lado, la fertilización reducida incrementó un 23.9% ($87.6 \pm 6.83 \mu\text{g/mg}$), en relación con la fertilización completa ($70.70 \pm 3.34 \mu\text{g/mg}$) (Figura 31b).

La clorofila total incrementó en un 6.2% ($231.74 \pm 12.40 \mu\text{g/mg}$) con el tratamiento AesM9-8, y un 4.8% ($228.81 \pm 4.85 \mu\text{g/mg}$) con el consorcio ACJ-14 + C1-13 + G50-78 en relación con la fertilización reducida, mientras que la fertilización reducida aumentó un 11.7% ($218.23 \pm 5.31 \mu\text{g/mg}$) el contenido de este compuesto, en comparación de la fertilización completa ($195.35 \pm 6.89 \mu\text{g/mg}$) (Figura 31c). Uno de los principales componentes de la clorofila es el nitrógeno, por lo que la homogeneidad del contenido clorofílico total entre los tratamientos se puede explicar por la poca variabilidad en el porcentaje de nitrógeno presente en las plantas, sin embargo, de igual manera, se observa una disminución de la clorofila en el tratamiento C1-13.

Estos resultados difieren de lo obtenido por Pérez *et al.* (2016), quienes registran una disminución de la concentración de clorofila total en plántulas aclimatadas, con un pre tratamiento en condiciones *in vitro*, donde se mantuvieron las plántulas en medio MS con reguladores para el enraizamiento, durante 5 meses. En las plántulas pre tratadas observaron un contenido de clorofila de 25.92 mg/mL, mientras que, en los individuos sin este pre tratamiento, la concentración fue de 71.78 mg/mL, ellos mencionan la degradación de la clorofila probablemente ocasionada por un aumento en la concentración de especies reactivas de oxígeno causado por el estrés abiótico, compuestos que provocan la oxidación de clorofilas y proteínas, y generan inestabilidad en el complejo proteína-pigmento. Sin embargo, no se observó una disminución del contenido de clorofila en los tratamientos en este estudio, debido posiblemente al aumento de los carotenoides y los fenoles registrados en las plántulas, compuestos que protegen a estos vegetales del aumento de las especies reactivas de oxígeno.

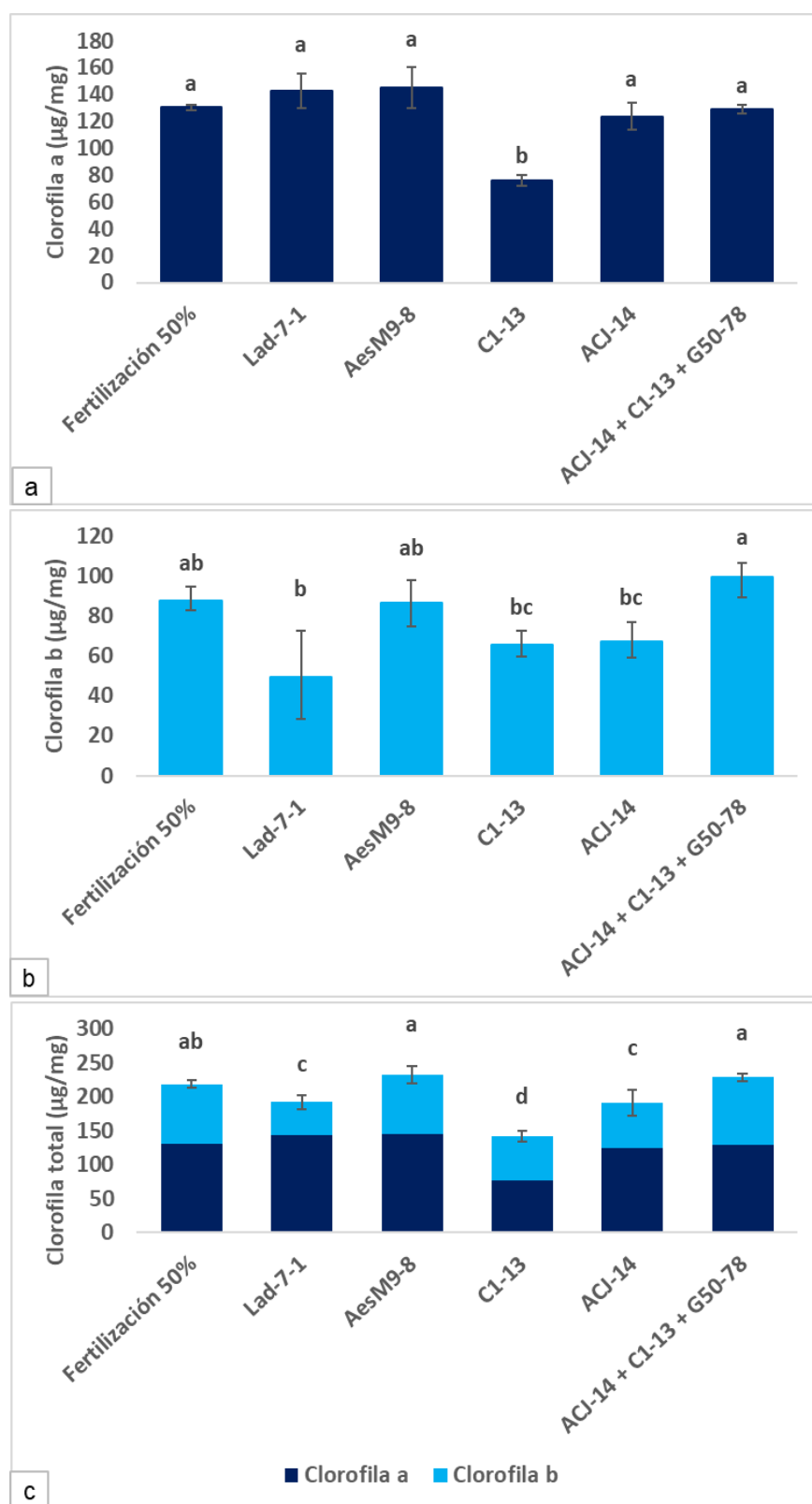


Figura 31. Efecto de las rizobacterias promotoras en el contenido de clorofila de *A. cupreata*. a) Clorofila a, b) clorofila b, c) clorofila total. Promedio $\pm$ DE. Las letras diferentes indican diferencias significativas Tukey $p < 0.05$ ($n=3$)

En cuanto al contenido de carotenoides, se registró un incremento significativo en las plantas inoculadas con el tratamiento Lad-7-1, incrementando el contenido del pigmento en un 339.2% ($20.83 \pm 6.95 \mu\text{g}/\text{mg}$), en comparación con la fertilización reducida, otros tratamientos con un efecto notable son AesM9-8 (147.2% o $11.72 \pm 2.05 \mu\text{g}/\text{mg}$), ACJ-14 (74.2% o $8.26 \pm 0.15 \mu\text{g}/\text{mg}$) y el consorcio ACJ-14 + C1-13 + G50-78 (126.2% o $10.73 \pm 4.97 \mu\text{g}/\text{mg}$) (Figura 32). El aumento en la concentración de carotenoides es importante en la aclimatación de las plántulas debido a que estos compuestos absorben el exceso de energía de las clorofilas y liberan este exceso mediante vibración de polieno. Durante la fotosíntesis, se producen especies reactivas de oxígeno, radicales hidroxilos y radicales aniónicos, no obstante, los carotenoides tienen la capacidad de regular los singletes de oxígeno, al absorber la energía térmica de este singlete y la liberarla mediante la vibración, esto es esencial para la fotoprotección de las estructuras fotosintéticas (Takashi, 2019). Por lo que el incremento del contenido de carotenoides en las plántulas de los tratamientos mencionados, tiene incidencia en su mayor capacidad para resistir el estrés ambiental causado en condiciones *ex vitro*, lo cual se relaciona de igual manera, con el porcentaje de sobrevivencia de las plantas inoculadas con ACJ-14 y ACJ-14 + C1-13 + G50-78 y en el incremento del tamaño físico y bioquímico de las plántulas en esos tratamientos y en AesM9-8. Este resultado en el incremento causado por las bacterias, también se puede observar en plántulas aclimatadas de *Vitis vinífera*, en este sentido, Krishna *et al.* (2005) señalan un aumento de los carotenoides en las plántulas micorizadas, particularmente este incremento se observa en la inoculación del consorcio de *Glomus manihotis*, *Glomus mosseae* y *Gigaspora gigantea*.

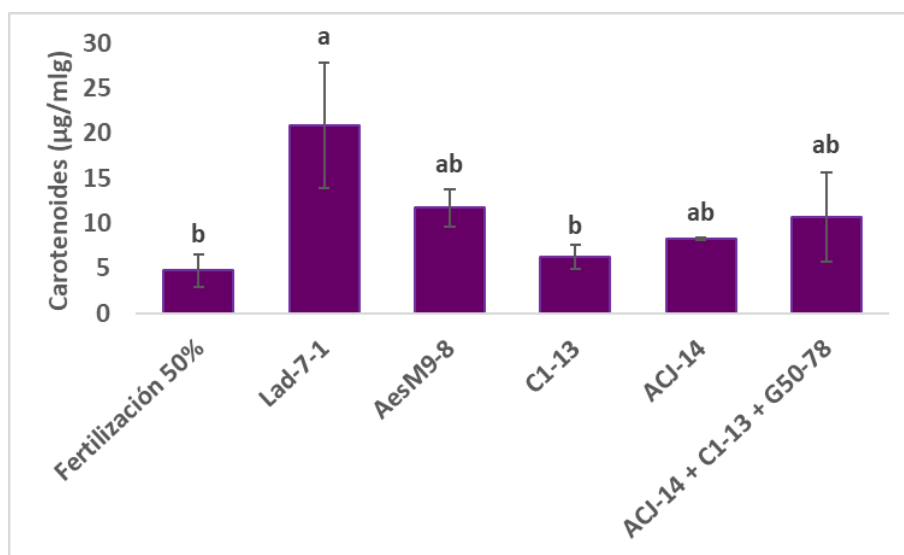


Figura 32. Efecto de las rizobacterias promotoras en el contenido de carotenoides de *A. cupreata*. Promedio $\pm$ DE. Las letras diferentes indican diferencias significativas Tukey $p < 0.05$ ($n=10$)

7.3.2 Fenoles

En condiciones de estrés biótico o abiótico, las plantas se enfrentan a un incremento de las especies reactivas de oxígeno, lo cual puede causar daños importantes en estas, cuando las ROS se encuentran en mayor cantidad que la capacidad antioxidante (Zárate-Martínez *et al.*, 2021). Sin embargo, los compuestos fenólicos tienen diversas funciones importantes en las plantas, como su participación en procesos de reducción oxidativa, el metabolismo de células vegetales, las interacciones químicas entre las plantas con otros organismos como la actividad alelopática, antibacteriana y antifúngica, además se cree que estos compuestos regulan el crecimiento y desarrollo vegetal, al afectar la biosíntesis del ácido indol-3-acético. También, algunos flavonoides se concentran en los cloroplastos, protegiendo los plastidios por la desintoxicación de radicales libres (Babenko *et al.*, 2019). Por ello, en el estudio se consideró la importancia de determinar el contenido fenólico, como mecanismo de protección contra el estrés en las plántulas de *A. cupreata*. El contenido de fenoles incrementó de manera significativa en las plantas inoculadas con el consorcio ACJ-14 + C1-13 + G50-78, en un 43.6% (2.95 ± 0.03 mgEAG/g) con respecto a la fertilización reducida. También el tratamiento con C1-13 incrementó un 29.2% (2.65 ± 0.45 mgEAG/g) y ACJ-14 un 15.3% (2.37 ± 0.26 mgEAG/g), sin embargo, estos últimos fueron estadísticamente similares a la fertilización reducida (19% en relación a la fertilización completa o 2.05 ± 0.19 mgEAG/g) (Figura 33). Algunos autores han reportado el efecto de microorganismos promotores del crecimiento vegetal en el incremento del contenido fenólico en plantas sometidas a estrés abiótico, en relación a esto, Khan *et al.* (2020) registraron un incremento del 66% del compuesto en plantas de garbanzo de las variedades “tolerante a la sequía” y “sensible a la sequía”, este efecto fue causado por los tratamientos conformados por el consorcio de *Bacillus subtilis*, *B. thuringiensis* y *B. megaterium* e influyó en la tolerancia de las plantas al estrés hídrico. De igual manera, Krishna *et al.* (2005), reportan un aumento en los fenoles totales de las plántulas aclimatadas de *Vitis vinífera* como respuesta a la inoculación de micorrizas arbusculares, principalmente por *Acaulospora scrobiculata*, siendo de 40.27 mg/g de materia fresca, mientras que, en el control, el contenido fue de 4.02 mg/g. Por otro lado, Pérez *et al.* (2016) señalan un aumento en el contenido de fenoles del 49.3%, en plántulas de *A. fourcroydes* sometidas a una pre aclimatación durante 5 meses, en medio MS para enraizamiento, esto en relación con el control, el cuál fue tratada con una pre aclimatación de un mes en el mismo medio. Ellos argumentan que un pre tratamiento, el cual consiste en una aclimatación *in vitro*, anterior a la aclimatación *ex vitro*, puede aliviar el efecto del estrés ocasionado por el cambio en las condiciones. Sin embargo, este aumento en el contenido de fenoles también se observa en la inoculación de bacterias, el efecto de las bacterias tiene la ventaja de que puede influir, inclusive, en condiciones de campo, además de

acortar el tiempo de encontrarse creciendo en condiciones *in vitro*. Con base en esto, el estrés abiótico de las plántulas de agave, ocasionado por el cambio de las condiciones en un medio *ex vitro*, se visualizó atenuado por el aumento del contenido fenólico, principalmente en los tratamientos C1-13, ACJ-14 y el consorcio ACJ-14 + C1-13 + G50-78, y esto se ve reflejado en la influencia de estas bacterias sobre la sobrevivencia de las plántulas, en el caso del consorcio y ACJ-14, así como en el efectivo desarrollo de algunos parámetros tanto morfológicos como bioquímicos de estos tratamientos, así como de C1-13.

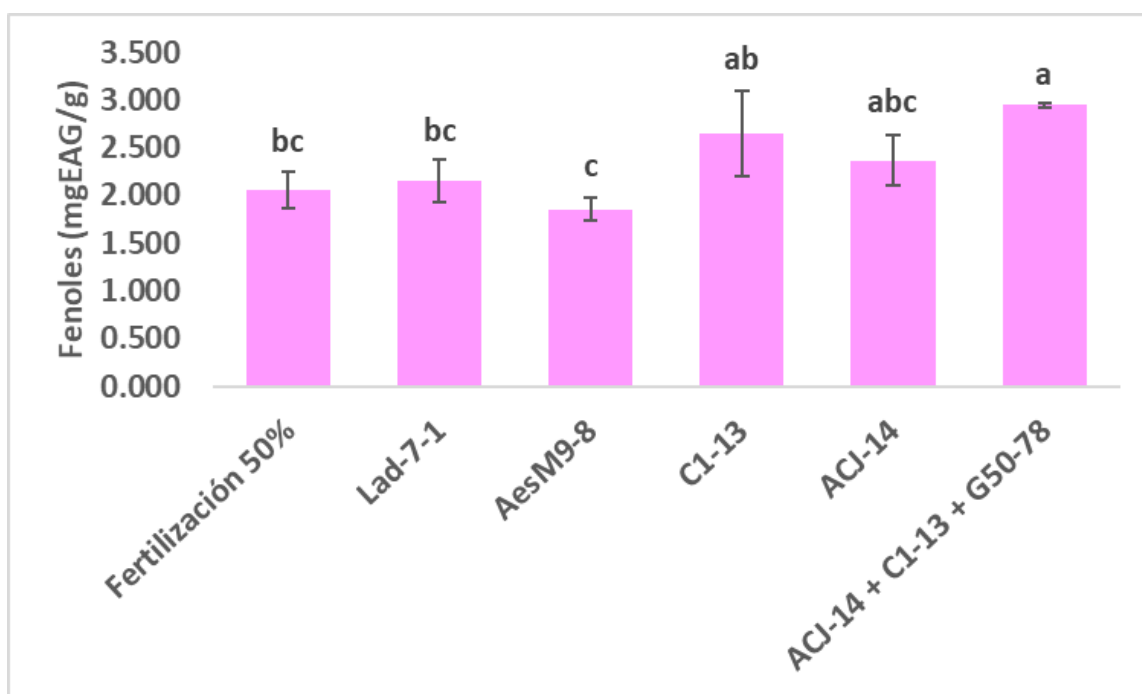


Figura 33. Efecto de las rizobacterias promotoras en el contenido de fenoles de *A. cupreata*. Promedio $\pm$ DE. Las letras diferentes indican diferencias significativas Tukey $p < 0.05$ ($n = 10$).

7.3.3 Cenizas

La incineración de la materia orgánica de las plantas elimina el carbono presente en los tejidos vegetales, dando como resultado la obtención de cenizas que representan el contenido de minerales presente en las plántulas, por lo cual, la cuantificación de estas, nos da una estimación aproximada del contenido total de minerales.

Las plántulas aclimatadas de *A. cupreata* tienen un porcentaje de cenizas de alrededor de 0.7 a 0.94%. Sin embargo, el mayor contenido se obtuvo con el tratamiento C1-13, el cual es de $0.94 \pm 0.03\%$, este fue significativamente mayor

que la fertilización reducida, ya que, en las plantas con este tratamiento, el porcentaje de cenizas fue de $0.81 \pm 0.04\%$, no obstante, el efecto de la inoculación con C1-13, fue significativamente similar a la fertilización completa, con un porcentaje de $0.93 \pm 0.04\%$ (Figura 34). Esto nos permite vislumbrar que los tratamientos con bacterias como la C1-13, nos permite obtener en las plántulas de agave, un contenido de minerales totales (reflejado en el contenido de cenizas) similar a la fertilización completa, donde se les proporciona a estas, todos los minerales esenciales para su desarrollo. González-López *et al.* (2014) estudiaron el contenido de minerales en cenizas de plantas de *A. salmiana* y reportan un contenido químico compuesto por MgO, SiO₂, P₂O₅, SO₃, K₂O, CaO, Fe₂O₃ y SrO; el componente encontrado en mayor proporción es CaO, conformando el 64.6% de la muestra, seguido de MgO (16.1%) y K₂O (12.7%). El alto porcentaje de CaO se relaciona con los oxalatos y carbonatos de calcio presentes en gran proporción en los agaves. De igual manera, se puede dilucidar que, en las plántulas de *A. cupreata* tratadas con la bacteria C1-13, el contenido de calcio es directamente proporcional al contenido de cenizas debido probablemente a la presencia de estos mismos compuestos encontrados en *A. salmiana*, ya que el contenido de cenizas y calcio fue mayor en el tratamiento con esta bacteria.

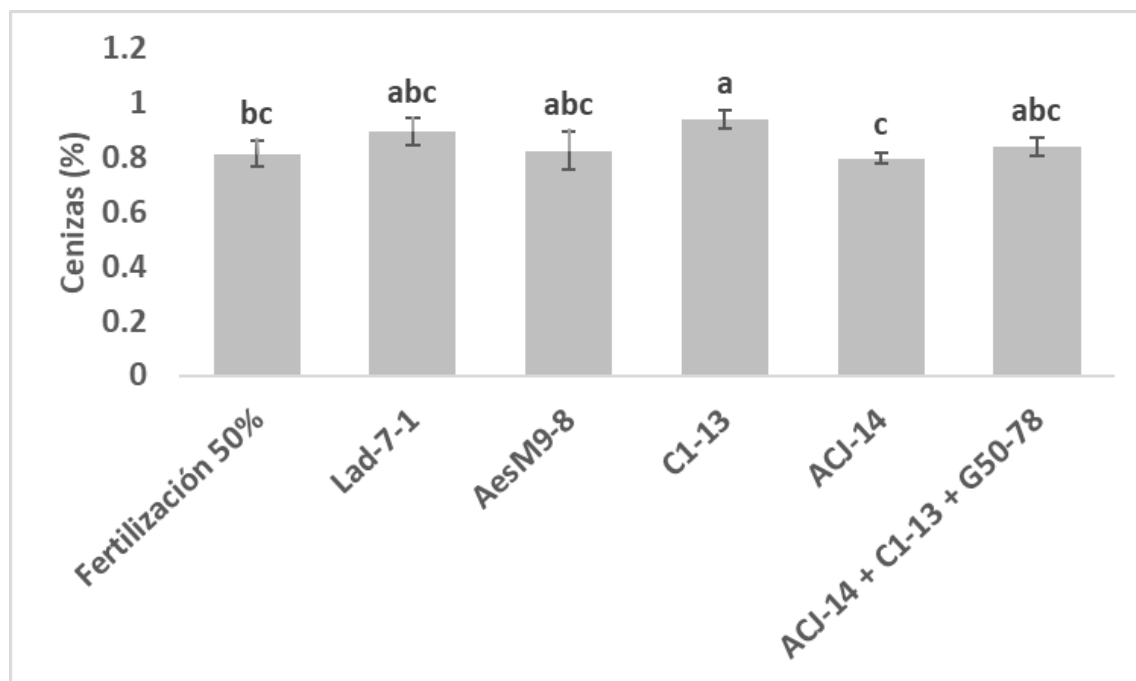


Figura 34. Efecto de las rizobacterias promotoras en el contenido de cenizas de *A. cupreata*. Promedio $\pm$ DE. Las letras diferentes indican diferencias significativas Tukey $p < 0.05$ ($n=10$)

7.3.4 Proteínas

Las proteínas son polímeros de aminoácidos lineares que cumplen con las principales funciones estructurales y roles regulatorios en los organismos (Arif y Pauls, 2018). La dinámica de las proteínas se va modificando con las diferentes fases en el ciclo de vida de las plantas y en respuesta a las interacciones entre estos vegetales con el medio externo. En este sentido, posterior a la germinación las proteínas de almacenamiento son utilizadas para la obtención de energía, el desarrollo y mantenimiento del mecanismo necesario para la división celular, expansión y metabolismo primario; seguido de la germinación, durante el desarrollo de las plántulas, son utilizadas las proteínas fotosintéticas y las relacionadas con la defensa y el metabolismo secundario; finalmente, con el comienzo de la senescencia de las hojas y la fructificación, comienza el uso de los componentes obtenidos durante la fotosíntesis y las proteínas necesarias para la adquisición de energía, aminoácidos y otros materiales para fabricar las proteínas de reserva necesarias para las posteriores etapas (Nelson y Miller, 2015).

Con relación al contenido proteínico de las plántulas de agave, la mayor proporción se observó en las plantas con la fertilización completa, con un porcentaje de 7.04%, seguido de este, podemos notar a las plantas inoculadas con AesM9-8 y C1-13 con 6.26%, Lad-7-1 con 6.03%, el consorcio ACJ-14 + C1-13 + G50-78 con 5.89%, mientras que ACJ-14 y la fertilización reducida tuvieron en mismo contenido de proteína (5.34%) (Tabla 6). Las proteínas son biomoléculas que, al igual que la clorofila, comprenden uno de los principales compuestos que contienen la mayor cantidad de nitrógeno total presente en las plantas, por lo tanto, su contenido pudo haber incrementado por la actividad de las bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico. Esta ampliamente reportado el efecto promotor de las PGPR en el crecimiento y desarrollo de diversas especies de plantas, sin embargo, estas rizobacterias también tienen influencia en el contenido nutrimental de las plantas, así como en el contenido proteínico (Kumar *et al.*, 2021). Así mismo, Khan *et al.* (2019) señalaron una disminución del 18% de las proteínas en plantas de *Cicer arietinum* en condiciones de estrés hídrico, en relación al control (con irrigación normal) no obstante, el volumen de proteínas en los tratamientos con el consorcio de bacterias (*B. subtilis*, *B. thuringiensis* y *B. megaterium*) añadido con ácido salicílico y putrescina (reguladores del crecimiento) fue incluso mayor en comparación al control, incrementando un 20% en la variedad sensible a sequía y un 33% en la variedad tolerante.

7.3.5 Minerales (nitrógeno, fósforo y calcio)

Se calculó el contenido de minerales en las plántulas aclimatadas de *A. cupreata* con el fin de determinar el efecto de las bacterias fijadoras de nitrógeno y solubilizadoras de fuentes insolubles de fósforo y calcio, en la obtención de estos nutrimentos por las plantas. En este caso, se observó al calcio, como el mineral que se encontró en mayor abundancia en porcentaje de peso seco (2.3-3.5%), seguido del nitrógeno (1.2-1.5%) y el fósforo (0.001-0.004%) (Tabla 6). Teniendo en cuenta a Cruz *et al.* (2013), reportan al calcio como el macronutriente presente en mayor proporción en los tallos de plantas adultas de *A. angustifolia* (10.25 mg/g) y *A. karwinskii* (10.13 mg/g), lo mismo ocurre en *A. cupreata*. En adición, la proporción de nitrógeno es de 4.30 y 5.33, y el fósforo de 0.28 y 0.33 mg/g, respectivamente. No obstante, también mencionan que la concentración de estos nutrientes es mayor en el tejido foliar, registrando un contenido de calcio de 40.3 en *A. angustifolia* y 66 mg/g en *A. karwinskii*, no obstante, el nitrógeno es de 8.7 y 9 mg/g y el fósforo de 1.3 y 1.61 mg/g respectivamente. Cabe resaltar que no existen reportes del contenido de estos minerales en plántulas aclimatadas de agave.

Tabla 6. Porcentaje del contenido de minerales (N, P y Ca) y proteína en *A. cupreata*

Tratamiento	Nitrógeno (%)	Fósforo (%)	Calcio (%)	Proteína (%)
Fertilización 100%	1.53	0.002	2.56	7.04
Fertilización 50%	1.16	0.002	2.84	5.34
Lad-7-1	1.31	0.002	2.40	6.03
AesM9-8	1.36	0.002	3.18	6.26
C1-13	1.36	0.001	3.56	6.26
ACJ-14	1.16	0.002	2.33	5.34
ACJ-14 + C1-13 + G50-78	1.28	0.004	3.14	5.89

7.3.5.1 Nitrógeno

El nitrógeno es uno de los macroelementos esenciales que se encuentra formando parte de componentes importantes como las proteínas, aminoácidos clorofila, ácidos nucleicos, coenzimas y alcaloides (Morales-Maldonado *et al.*, 2022). Este mineral realiza una función importante en varios procesos fisiológicos como el crecimiento y desarrollo de órganos vegetales, un ejemplo de ellos son las hojas, tallos y raíces, además de promover la calidad de los frutos y relacionarse de manera importante con los pigmentos fotosintéticos (Jahan *et al.*, 2016).

Adicionalmente, el nitrógeno tiene incidencia en el estrés abiótico por sequía, de manera que incrementa el uso eficiente de agua y promueve el crecimiento radicular, la tasa fotosintética y actúa en la transpiración vía conductancia estomatal, además, el nitrógeno en forma de óxido nítrico (NO) actúa como un detoxificador y alivia los efectos adversos de las especies reactivas de oxígeno (ROS) y de esta forma ayuda en respuesta a la aclimatación de las plantas (Zayed *et al.*, 2023).

En el proyecto realizado, el porcentaje de nitrógeno presente en las plántulas de agave no mostró variación en su contenido, sin embargo, si se puede observar un mayor porcentaje con la fertilización completa de la solución nutritiva, con un contenido de 1.53% de la materia seca, seguido de esta podemos observar el efecto en el tratamiento AesM9-8 y C1-13 con 1.36%, Lad-7-1 con 1.31% y el consorcio ACJ-14 + C1-13 + G50-78 con 1.28%, mientras que ACJ-14 tuvo un efecto similar a la fertilización al 50% con 1.16% (Tabla 6). En este sentido, C1-13, AesM9-8 y Lad-7-1 son bacterias fijadoras de nitrógeno, por lo cual, el aumento en la proporción de este elemento en las plántulas, en comparación de la fertilización reducida, se puede asociar con esta capacidad de las bacterias. Se ha estudiado ampliamente el efecto de las PGPR en el contenido de nitrógeno de las plantas, potenciando el nitrógeno asimilable por las plantas, a propósito de ello, Gallarte *et al.* (2021) registraron que el nitrógeno asimilado por plántulas de *Macadamia integrifolia* fue 43% mayor, cuando se implementó con una fertilización compuesta nitrogenada conformada de 50% de urea y 50% del fertilizante orgánico comercial EcoNPK™ (compuesto de 4% de N, 1.6% de P y 1.9% de K, C:N 5.3:1), y complementada con la inoculación de una cepa de *Paraburkholderia* sp., una bacteria promotora del crecimiento registrada con la capacidad de fijar nitrógeno, lo cual tuvo incidencia en el incremento en la biomasa seca de las hojas (27% mayor que el control), tallo (26%) y de las raíces (60%). Así mismo, Bautista-Cruz y Martínez-Gallegos (2021), observaron que, en plantas de *A. potatorum*, la inoculación con bacterias fijadoras de nitrógeno de los géneros *Burkholderia*, *Flavobacterium* y *Paenibacillus*, incidieron en el crecimiento en un 322.2% en el volumen radicular, 48.6% del diámetro de la roseta, 127.2% del área foliar y 72.9% el contenido de azúcares totales (°Brix).

7.3.5.2 Calcio

El calcio es un macronutriente esencial en las plantas, que tiene un papel importante en la división y elongación celular. Además, es posible encontrarlo en las paredes celulares asociado con enlaces de pectina, este aspecto es importante porque ayuda a mantener la estructura de la planta, y a darle rigidez (Prasad y Singh, 2020). La rigidez es un factor importante considerado en la aclimatación de vitroplantas de agave, esta se refleja en el vigor y salud de las plantas, e influye en la adaptación de las mismas a las condiciones adversas de una plantación. En algunas plantas,

como en el agave, el calcio se presenta en forma de cristales insolubles de oxalato de calcio. Los cristales de oxalato de calcio son el tipo de biomineral más abundante presente en el peso seco de las plantas, encontrándose en una concentración de entre el 3-80%, estos compuestos conforman hasta el 90% del contenido total del calcio de las plantas (Mondragón *et al.*, 2022). Estos cristales funcionan como defensa contra herbivoría, soporte de tejidos, balance de iones (de potasio y sodio), disminución de ácido oxálico tóxico, y además se piensa que están relacionados con la evaporación del agua (León-Martínez y Ortiz-Hernández, 2022).

En el presente estudio, se determinó un aumento del 25.2% (35.63 ± 0.25 mg/g) en la concentración de calcio en las plantas inoculadas con la cepa C1-13, siendo esta significativamente mayor a los controles sin inocular. Aunado a esto, los tratamientos de AesM9-8 incrementó un 12% (31.86 ± 3.08 mg/g) y el consorcio ACJ-14 + C1-13 + G50-78 un 10.4% (31.43 ± 0.40 mg/g), estos últimos fueron significativamente similares al control con la solución nutritiva reducida (con un incremento del 11.1% en comparación a la fertilización completa, o 28.45 ± 0.02 mg/g) (Figura 35). Estas bacterias pueden estar relacionadas en el incremento del contenido de calcio en las plantas debido a su capacidad para solubilizar el calcio en el suelo en forma de carbonato de calcio y fosfato tricálcico. Además, el contenido de calcio en las plantas es probable que esté relacionado con el endurecimiento y rigidez en el tallo de las plántulas, debido a lo cual, la bacteria C1-13, tuvo la mayor influencia en el diámetro del tallo, la relevancia en el buen desarrollo del tallo, radica en que este parámetro es un factor primordial para la aclimatación. En contraparte, Jabborova *et al.* (2021) reportaron un incremento en el contenido de calcio del 41% en plántulas tratadas con riego normal y del 35% en plántulas en condiciones de estrés hídrico, ambos tratamientos inoculados con un consorcio compuesto de *B. japonicum* y *Pseudomonas putida*, en relación a los controles no inoculados, de manera que, incluso el calcio en el tratamiento implementado con el consorcio en condiciones de estrés se encontró en mayor cantidad en comparación a las plántulas no inoculadas en condiciones normales, por lo que el efecto de estas bacterias alivia el estrés hídrico.

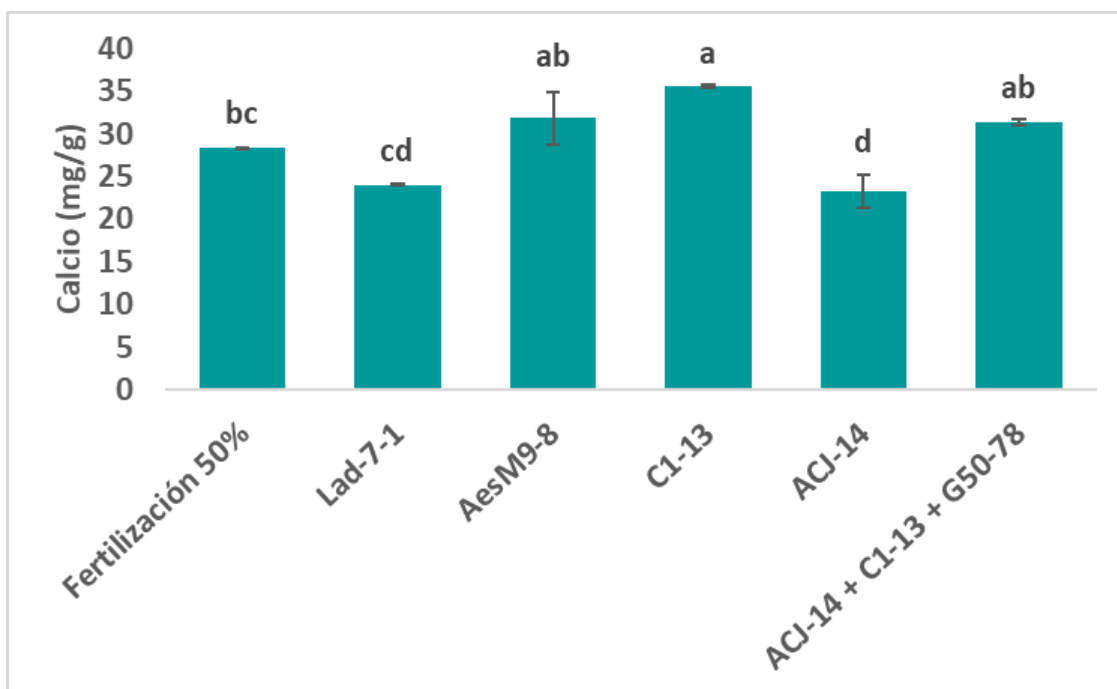


Figura 35. Efecto de las rizobacterias promotoras en el contenido de calcio de *A. cupreata*. Promedio $\pm$ DE. Las letras diferentes indican diferencias significativas Tukey $p < 0.05$ ($n=10$)

7.3.5.3 Fósforo

El fósforo, en conjunto con el nitrógeno, es uno de los macronutrientes más importantes en las plantas, actúa en diversas actividades como mantenimiento de la estructura de membrana, síntesis de biomoléculas, formación de moléculas de energía, división celular, modulación de la actividad enzimática desarrollo de raíces, tallo y fuerza del tallo (Malhotra *et al.*, 2018). Integrado a esto, Bechtaoui *et al.* (2021), mencionan que la deficiencia de fósforo tiene repercusiones negativas en la capacidad fotosintética y conductancia estomática en plantas de soya, trigo, maíz y frijol.

En las plántulas aclimatadas de *A. cupreata*, se registró un contenido de fósforo de 0.023 ± 0.003 mg/g en el tratamiento con la fertilización completa, mientras que, con la fertilización reducida, el contenido fue de 0.018 ± 0.003 mg/g. No obstante, se observó un incremento de fósforo, significativamente mayor en el tratamiento inoculado con el consorcio de bacterias ACJ-14 + C1-13 + G50-78, causando un aumento del 105% (0.037 ± 0.002 mg/g) en comparación del control con la fertilización reducida. Aunado a esto, el tratamiento con la inoculación de la cepa Lad-7-1 tuvo un efecto similar a la fertilización completa, siendo esta del 28.9% (0.023 ± 0.002 mg/g) (Figura 36). Este incremento, efecto de la inoculación con el

consorcio, tiene relación con la actividad de las bacterias para solubilizar fósforo. Con relación a lo obtenido, Bautista-Cruz *et al.* (2019), observaron un aumento del fósforo disponible para las plantas obtenido por el tratamiento con las bacterias *Pseudomonas luteola* + *Acinetobacter* sp. y *P. luteola* + *Enterobacter* sp., siendo este de alrededor de 0.015 g/kg para el primer consorcio, y de 0.010 g/kg para el segundo consorcio, el control registró una concentración de 0.006 g/kg, efecto reflejado en el crecimiento y desarrollo de plantas de *A. angustifolia*, Mientras que Jabborova *et al.* (2021) registran una mayor concentración de fósforo en plántulas de soya del 34% en condiciones normales y del 31% en condiciones de estrés hídrico, en los tratamientos inoculados con el consorcio de *B. japonicum* y *P. putida*, en relación a los tratamientos no inoculados, siendo que este último superó al control en condiciones normales, por lo tanto, la inoculación con estas bacterias, alivia los efectos por el estrés hídrico.

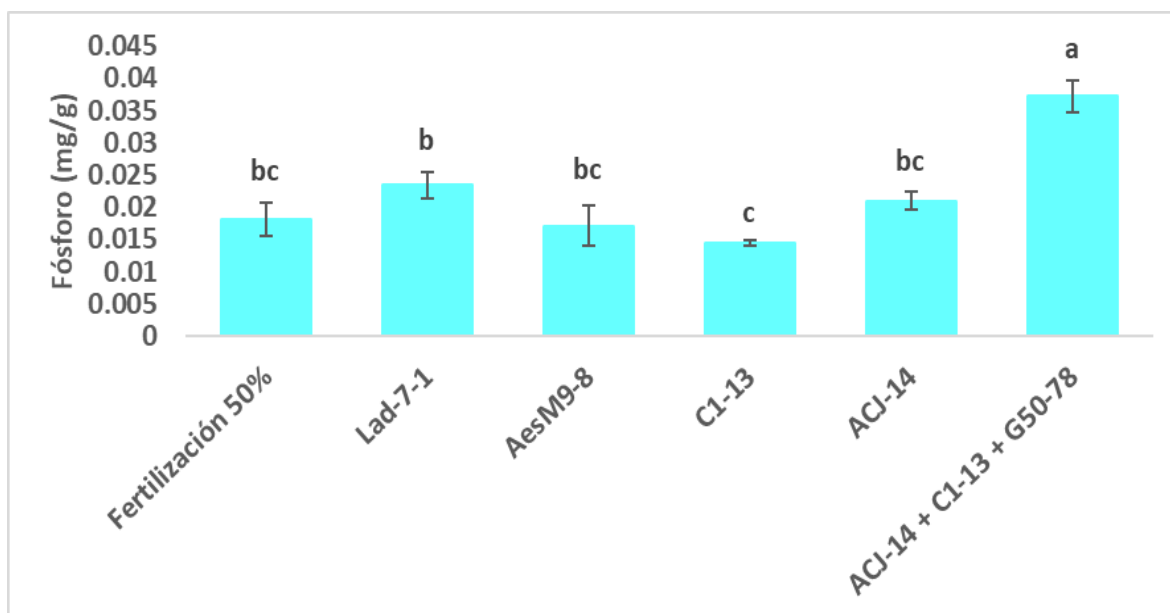


Figura 36. Efecto de las rizobacterias promotoras en el contenido de fósforo de *A. cupreata*. Promedio $\pm$ DE. Las letras diferentes indican diferencias significativas Tukey $p < 0.05$ ($n=10$).

7.4 Efecto de las rizobacterias en la sobrevivencia de plántulas de *Agave cupreata*, durante la fase de aclimatación

Una de las principales problemáticas de la micropropagación vegetal es la fase de la aclimatación, ya que las plántulas, al crecer en condiciones *in vitro*, no han desarrollado adecuadamente las estructuras necesarias para desenvolver sus funciones fisiológicas en un ambiente natural, por lo que hay una alta tasa de

mortalidad en esta fase, lo cual puede ocasionar grandes pérdidas económicas al implementar estas técnicas en gran escala (producción de cientos de miles de plantas al año). Debido a esto, es esencial promover el buen desarrollo de las vitroplantas, para así aumentar el porcentaje de sobrevivencia de las plántulas (Chandra *et al.*, 2010).

En este sentido, el deceso de las plántulas ocurrió desde el inicio de la aclimatación, hasta el cuarto mes, tiempo en que las plántulas iniciaban su adaptación en las condiciones *ex vitro*. En este tiempo, se observó diferencias significativas en relación al efecto de las inoculaciones bacterianas en contraste con las fertilizaciones sin inóculo aplicadas a los controles, mediante un análisis estadístico de chi cuadrada (X^2), con un valor de significancia de $\alpha=0.005$, además, se observó diferencias estadísticas significativas en cuanto a la inoculación con ACJ-14, cuando este se compara con la fertilización reducida, con un valor de significancia de $\alpha=0.02$. En este sentido, se registró una sobrevivencia del 60% de las plántulas con la fertilización completa, no obstante, esta aumentó al 80% con la fertilización reducida. Sin embargo, se logró el mayor porcentaje de sobrevivencia en el tratamiento implementado con ACJ-14, siendo esta del 100%. Por otro lado, también se alcanzó el 90% de sobrevivencia con los consorcios AcuM11-4 + AesM9-8 y ACJ-14 + C1-13 + G50-78 (Figura 37). La sobrevivencia registrada en el presente trabajo, fue mayor incluso que la alcanzada por Domínguez *et al.* (2008), quienes lograron obtener una sobrevivencia en la aclimatación de plántulas micropropagadas de *A. cupreata* del 53%, al trasplantarlas a un sustrato compuesto por suelo comercial para macetas y arena en una relación 1:1. Este incremento en la sobrevivencia promovido por los microorganismos promotores del crecimiento también se puede comparar con el trabajo de Krishna *et al.* (2005), ya que ellos observaron una sobrevivencia del 91% en la aclimatación de plántulas inoculadas con *Acaulospora scrobiculata* y el consorcio de *Glomus manihotis*, *Glomus mosseae* y *Gigaspora gigantea*. Uno de los factores importantes en la aclimatación, con influencia en la supervivencia de las plántulas, es el enraizamiento, ya que un buen desarrollo radicular se asocia con una mayor obtención tanto de nutrientes, como de agua en el sustrato donde se encuentran (Silva *et al.*, 2021). De esta forma, ACJ-14 y el consorcio ACJ-14 + C1-13 + G50-78 fueron algunos de los tratamientos con un mayor desarrollo en la longitud en las raíces al cuarto y séptimo mes de medición, además, estas inoculaciones tuvieron un efecto positivo en el contenido de carotenoides y fenoles, siendo compuestos que actúan en las plantas, aliviando los efectos causados en condiciones de estrés tanto biótico como abiótico. En este sentido, la gran relevancia del uso de estas bacterias con la intención de lograr una alta sobrevivencia de plantas de agave, puede ser replicada en la producción masiva comercial de la especie, obteniendo una productividad económicamente rentable con la industria de la micropropagación de la planta, además, se lograría

obtener una gran cantidad de plantas a partir de una única planta madre, que de otra forma se necesitaría de varias plantas madre para alcanzar la misma producción de plantas. Caamal-Velázquez *et al.* (2022) calcularon un costo de 0.16 dólares en la producción de plántulas de *A. potatorum* en medio semisólido, mientras que el precio fue de 0.09 dólares cuando estas se producían en TIB (biorreactor de inmersión temporal), equivalente a 2.73 y 1.53 pesos mexicanos, en este sentido, al producir de manera masiva 500,000 plántulas usando el biorreactor de inmersión temporal se necesitaría un presupuesto de 765,000 pesos, por lo que una mortalidad del 40% de las plántulas consistiría en una pérdida de 306,000 pesos, y una mortalidad del 20% implicaría una pérdida de 153,000 pesos mexicanos, que se han invertido en el proceso de micropropagación. Al producir plántulas micropropagadas de agave de manera masiva, es por lo tanto de vital importancia encontrar la manera más efectiva de aclimatar estas plántulas y disminuir su mortalidad, cuestión que, en este proyecto, se logró mediante la biotización de las vitroplantas en la fase de aclimatización.

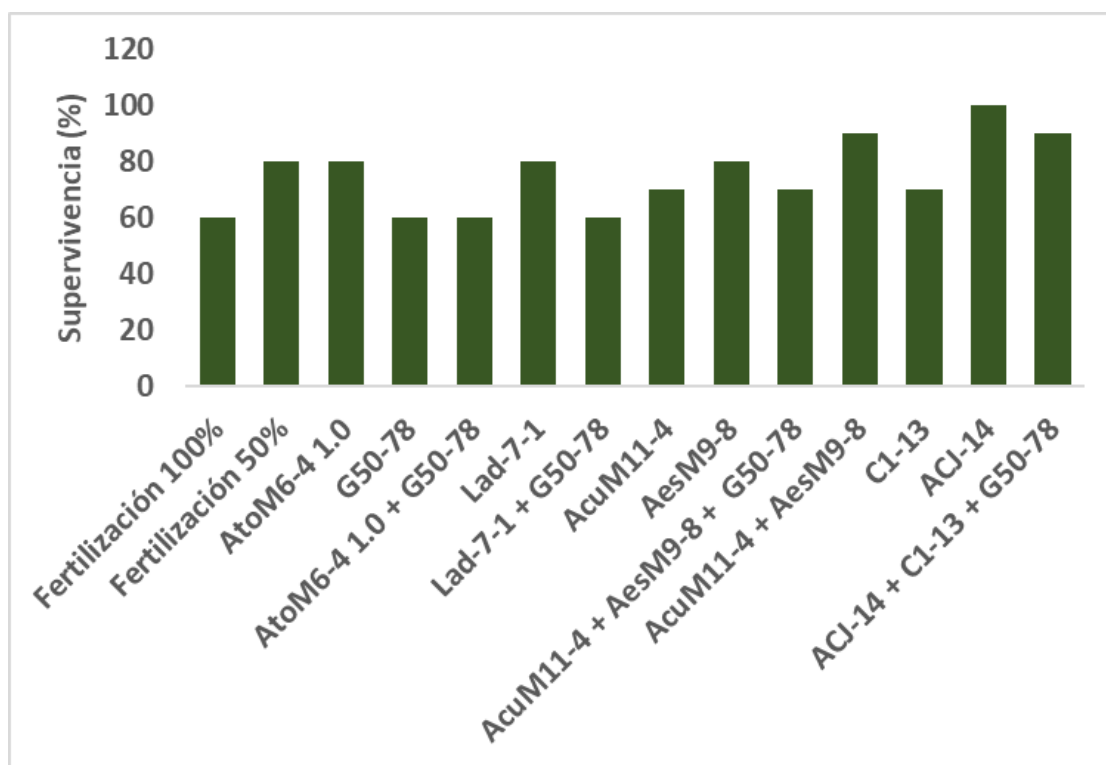


Figura 37. Porcentaje de supervivencia de plántulas aclimatadas de *A. cupreata* inoculadas con los diferentes tratamientos de rizobacterias y diferentes concentraciones de la solución nutritiva Steiner. Las barras indican el promedio (n=10)

7.5 Análisis conjunto de las variables analizadas

Se realizó un análisis de componentes principales (PCA), ya que este es un modelo estadístico multivariado que analiza las varianzas de una base de datos, considerando diversas variables cuantitativas dependientes e intercorrelacionadas. El objetivo principal de este modelo es la de extraer la información más representativa de los datos, para interpretarlas a partir de nuevas variables creadas con el fin de mostrar el patrón existente entre estas observaciones y las variables (Mishra *et al.*, 2017).

Los resultados del PCA (Figura 38), mostraron dos factores que explican una varianza acumulada del 66.36%, y, de acuerdo con los resultados obtenidos y las variables asociadas, se deduce que el factor 1 (34.17%) está determinado principalmente por parámetros bioquímicos y de nutrición, por otro lado, el factor 2 (32.19%) se encuentra determinado por parámetros foliares y referentes al potencial hídrico de las plantas. En este sentido, en el PCA, podemos observar que la supervivencia se encuentra ubicada en el cuadrante donde se encuentran los parámetros de nutrición y control del potencial hídrico, como lo es la estructura de la raíz, la densidad estomática y el grosor de la epidermis, lo cual concuerda con lo mencionado anteriormente, inicialmente las vitroplantas se encuentran creciendo en un medio rico en nutrientes y humedad, por lo tanto no desarrollan los caracteres adecuados para su óptimo desarrollo en el exterior, debido a lo cual se busca desarrollar esas características, que en conjunto a una nutrición adecuada, se logre una mayor sobrevivencia de las plántulas en proceso de aclimatación (Chandra, 2010 y Sánchez *et al.*, 2021). Se observa, además, una mayor influencia en esos parámetros por los tratamientos ACJ-14 + C1-13 + G50-78 y ACJ-14. La cepa AesM9-8 influyó más en el diámetro del tallo, característica considerada como uno de los principales parámetros de calidad de las plántulas; de acuerdo con PCA, en la etapa de aclimatación este parámetro tuvo una correlación negativa (-0.07) con la sobrevivencia, indicando la importancia de otras variables en este comportamiento, además, es probable que en esta fase, las plántulas hayan usado su energía en desarrollar otros parámetros como el desarrollo foliar, estomático y radicular, en lugar de guardar reservas, que se traduciría en el incremento del diámetro del tallo. Sin embargo, sería interesante analizar si, en una fase posterior, lo cual implica el trasplante de las plántulas a condiciones de campo, la correlación de estas dos variables se ve modificada, ya que es bien sabido que en el tallo (piña) se guardan las reservas necesarias para el desarrollo de nuevos tejidos (raíces y hojas), vitales en esta última etapa de adaptación en la ubicación en donde la planta completara su ciclo de vida. Por otro lado, en el cuadrante determinado por las variables foliares (número de hojas, diámetro de roseta, peso fresco, porcentaje de calcio y clorofila b), se encuentran relacionados los tratamientos Lad-7-1 y la

fertilización reducida, cuestiones que en agave se relacionan principalmente con el crecimiento de las plantas, y que, en la aclimatación, son importantes tras el posterior desarrollo de las raíces, epidermis y aparato estomático, sin embargo, estos tratamientos se pueden seleccionar para un proyecto posterior, con el fin de seguir incrementando el tamaño de estas.

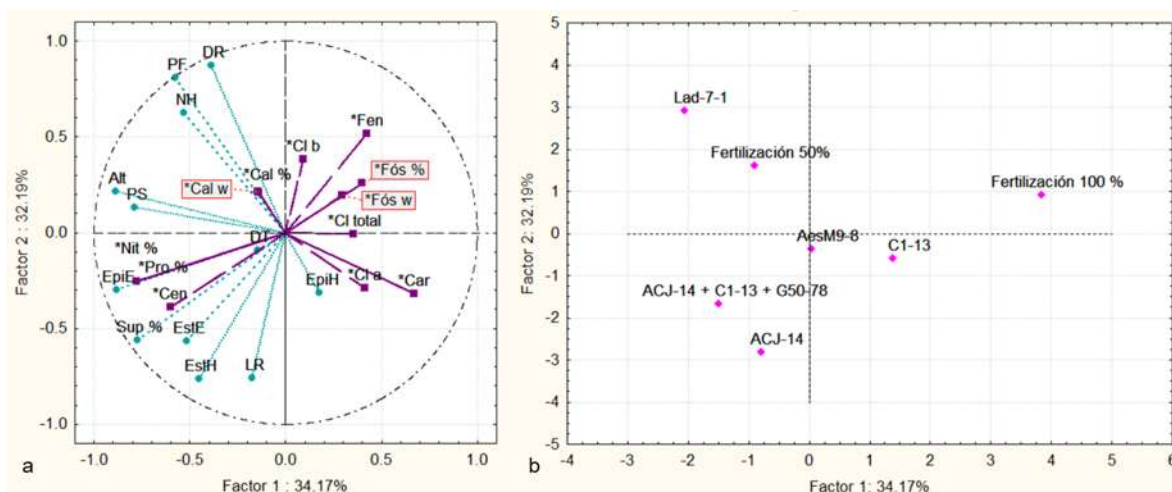


Figura 38. Análisis de componentes principales integrando las variables morfológicas y bioquímicas evaluadas en los tratamientos de bacterias y fertilización aplicado a las plántulas de agave. a) variables evaluadas, b) tratamientos aplicados. Claves: Sup % (porcentaje de supervivencia), DR (diámetro de roseta), DT (diámetro del tallo), PF (peso fresco), NH (número de hojas, Alt (altura), LR (longitud de la raíz) PS (peso seco), EpiE (grosor de la epidermis del envés), EpiH (grosor de la epidermis del haz), EstE (densidad estomática del envés), EstH (densidad estomática del haz), Cl b (clorofila b), Cl a (clorofila a), Cl total (clorofila total), Car (carotenoides), Fen (fenoles), Cen (porcentaje de cenizas) Pro % (porcentaje de proteína), Nit % (porcentaje de nitrógeno), Cal % (porcentaje calcio), Fós % (porcentaje de fósforo), Cal w (peso seco de calcio), Fós w (peso seco de fósforo).

Por otro lado, cabe resaltar que la fertilización completa se encuentra mayormente correlacionada con los parámetros bioquímicos, no obstante, no existe una relación positiva de esta con los parámetros relacionados con la sobrevivencia, por lo que se destaca la importancia de adecuar los requerimientos nutrimentales para cada una de las especies vegetales y para cada una de las circunstancias y fases en las que se desenvuelven.

Finalmente, con base en lo observado en los resultados obtenidos, referente al efecto de las rizobacterias en los parámetros morfológicos y bioquímicos, así como

en el análisis de componentes principales, no se observaron diferencias significativas en el efecto de las rizobacterias en los parámetros relacionados al crecimiento, con respecto a la fertilización al 50%, sin embargo, si se observó un incremento en estas mediciones, efecto de las inoculaciones bacterianas. Tomando en consideración que la fertilización aplicada es la recomendada para la especie, podría seguir disminuyéndose esta fertilización de manera que se obtenga un desarrollo similar de estas plantas, si se complementa esta nutrición con el efecto de las rizobacterias aplicadas. Sin embargo, uno de los principales objetivos de este estudio se encuentra determinado por incrementar la sobrevivencia de las plántulas durante de la fase de aclimatación, así como de los parámetros relacionados con esta sobrevivencia, por lo que, en este caso, es importante mencionar que se reportó un incremento significativo en el efecto de las bacterias con estos parámetros, así como la longitud radicular, la densidad estomática y el grosor de la epidermis, adicionalmente, se observó un efecto significativo del uso de las bacterias en el contenido de fenoles y carotenoides, así como del calcio y fósforo, estos no se encuentran relacionados con la sobrevivencia de las plántulas, sin embargo si juegan un papel importante en el control del estrés biótico y abiótico, y en la nutrición vegetal, respectivamente, los cuáles pueden tener un mayor impacto positivo en el posterior crecimiento y desarrollo de las plántulas en condiciones de campo.

8. CONCLUSIONES

Las rizobacterias Lad-7-1, C1-13, ACJ-14, AesM9-8 así como con el consorcio compuesto de C1-13 + ACJ-14 + G50-78 tienen potencial para su aplicación como promotoras del crecimiento en la fase de aclimatación de vitroplantas de *A. cupreata*, incrementando parámetros como la sobrevivencia, desarrollo radicular, densidad estomática, el grosor de la epidermis y absorción de fosfatos y calcio.

9. PERSPECTIVAS

Tomando en consideración los resultados observados en este estudio, resultaría interesante continuar con esta investigación, monitoreando el efecto de estas inoculaciones en las plántulas aclimatadas, al ser trasplantadas a una plantación comercial de agave en campo y completar su ciclo de vida; así como analizar el efecto de estas bacterias en otras fases de la micropropagación, como en la generación de brotes o raíces *in vitro* debido a su capacidad de producción de hormonas del crecimiento como las auxinas.

10. REFERENCIAS

- Aguilar J., D. y J. L. Rodríguez de la O. Micropropagación y aclimatación de maguey Pitzometl (*Agave marmorata* Roetzl) en la mixteca Poblana. *Revista Colombiana Biotecnológica*. 20 (2): 124-131. Doi: 10.15446/rev.colomb.biote.v20n2.77084
- Aguiire-Dugua, X., y L. E. Eguiarte. 2013. Genetic diversity, conservation and suitable use of wild *Agave cupreata* and *Agave potatorum* extracted for mezcal production in Mexico. *Journal of Arid Environments*. 90: 36-44. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaridenv.2012.10.018>
- Alducin-Martínez, C., K. Y. Ruíz M., O. Jiménez-Barrón, E. Aguirre-Planter, J. Gasca-Pineda, L. E. Eguiarte y R. A. Medellín. 2023. Uses, knowledge and extinction risk faced by *Agave* species in México. *Plants*. 12 (1): 124. Doi: <https://doi.org/10.3390/plants12010124>
- Andrade, J. L., E. de la Barrera, C. Reyes-García, M. F. Ricalde G. Vargas-Soto y J. C. Cervera. 2007. El metabolismo ácido de las crasuláceas: diversidad, fisiología y productividad. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. 81: 37-50. Doi: 10.17129/botsci.1764
- Arif, M. y K. P. Pauls. 2018. Properties of plant proteins. *In*: Chen, G., R. J. Weselake y S. D. Singer. 2018. *Plant bioproducts*. Springer Nature. Canada. 121-142. Doi: 10.1007/978-1-4939-8616-3_8
- Arreola G., M. del R. y E. Mendoza R. 2018. Beneficios del *Agave cupreata*. *Saber Más*. 37: 13-15.
- Aureoles-Rodríguez, F., J. L. Rodríguez-de la O, J. P. Legaria-Solano, J. Sahagún-Castellanos y M. G. Peña O. 2008. Propagación in vitro de "Maguey bruto" (*Agave inaequidens* Koch), una especie amenazada de interés económico. *Revista Chapingo, Serie Horticultura*. 14 (3): 263-269. Doi: 10.5154/r.rchsh.2007.11.050
- Avendaño-Arrazate, C. H., L. Iracheta-Donjuan, J. C. Godínez-Aguilar, P. López-Gómez, A. Barrios-Ayala. 2015. Caracterización morfológica de *Agave cupreata*, especie endémica de México. *Revista Internacional de Botánica Experimental Internacional*. 84(84): 148-162. Doi: 10.32604/phyton.2015.84.148
- Babenko, L. M., O. E. Smirnov, K. O. Romanenko, O. K. Trunova y I. V. Kosakivska. 2019. Phenolic compounds in plants: Biogenesis and functions. *Ukrainskii Biokhimicheskii Zhurnal*. 91(2): 5.18. Doi: 10.15407/ubj91.03.005
- Backer, R., J. S. Rokem, G. Ilangumaran, J. Lamont, D. Praslickova, E. Ricci, S. Subramanian y D. L. Smith. 2018. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria: Context,

mechanisms of action, and roadmap to commercialization of biostimulants for sustainable agriculture. *Frontiers Plant Science*. 9. Doi: <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01473>

Bahadur S., T., V. Sahai, A. Ali, M. Prasad, A. Yadav, P. Shrivastav, D. Goyal, P. Kumar D. 2020. Screening and evaluation of PGPR strains having multiple PGP traits from hilly terrain. *Journal of Applied Biology & Biotechnology*. 8(4): 38-44. Doi: 10.7324/jabb.2020.80406

Bhatia, S. y K. Sharma. 2015. Micropropagation. *In*: Bhatia, S., K. Sharma, R. Dahiya y T. Bera. 2015. Modern applications of plant biotechnology in pharmaceutical sciences. ELSEVIER. Países Bajos, Amsterdam. 361-368. Doi: doi:10.1016/B978-0-12-802221-4.00011-X

Balzaadúa-Muñoz, C., E- Ventura-Zapata, G. Salcedo-Morales, U. Maldonado A. y A. López G. 2008. Densidad estomatal y potencial hídrico en plantas de tomate (*Physalis ixocarpa* Brot.), propagadas por cultivo de meristemos. *Revista Chapingo Serie Horticultura*. 14(2): 147-150. Doi: 10.5154/r.rchsh.2006.01.003

Barrientos R., G., E. L. Esparza I., H. R. Segura P., O Talavera M., M. L. Sampedro R. E. Hernández C. 2019. Caracterización morfológica de *Agave angustifolia* y su conservación en Guerrero, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 10 (3): 655-668. Doi: 10.29312/remexca.v10i3.1554

Bautista-Castellanos, A. I., J. R. Enríquez-del Valle, V. A. Velasco-Velasco, G. Rodríguez-Ortiz. 2020. Enraizado de brotes *in vitro* y aclimatación de plantas de *Agave potatorum* Zucc. *Ecosistemas y recursos agropecuarios*. 7 (3): 1-13. Doi: 10.19136/era.a7n3.2618

Bautista-Cruz A. y V. Martínez-Gallegos. 2020. Promoción del crecimiento de *Agave potatorum* Zucc. por bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre. *Tierra Latinoamericana. Número Especial*. 38 (3): 555-567. Doi: 10.28940/terra.v38i3.647

Bautista-Cruz, A., B. Antonio-Revuelta, V. C. Martínez G., A. Báez-érez. 2019. Phosphate-solubilizing bacteria improve *Agave angustifolia* Haw. Growth under field conditions, *Journal of the Science of Food Agriculture*. 99 (14). DOI:10.1002/jsfa.9946

Bechtaoui, N., M. Kabir R., A. Raklami, K. Oufdou, M. Hafidi y A. Jemo. 2021. Phosphate-dependent regulation of growth and stresses management in plants. *Frontiers in Plant Science*. (12). Doi: <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.679916>

Ben S., H., H. Cherif-Silini, A. Chenari B., M Qader, A. Silini, B. Yahiaoui, F. N. Alenezei, L. Luptakova, M. Ali T., A. Vallat, T. Oszako, M. E. Rateb y L. Belbahri.

2019. Screening for *Fusarium* Antagonistic bacteria from contrasting niches designated the endophyte *Bacillus halotolerans* as plant warden against *Fusarium*. Frontiers Microbiology. 9. Doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03236>

Benedetto A., D., J. Tognetti. 2016. Técnicas de análisis de crecimiento de plantas: su aplicación a cultivos intensivos. Revista de Investigaciones Agropecuarias. 24 (3): 258-282

Benjumeda M., D. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal: Mecanismos y aplicaciones. Trabajo de fin de año. Grado en Farmacia. Universidad de Sevilla. Departamento de Microbiología y Parasitología. Facultad de Farmacia. Sevilla, España. 40 pp.

Bolívar-Anillo, H. J., M. L. Contreras-Zentella y L. G. Teherán-Sierra. 2016. Burkholderia tropica una bacteria con gran potencial para su uso en la agricultura TIP. 19 (2). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.recqb.2016.06.003>

Caamal-Velázquez, J. H., A. V. Pérez-de-León, J. C. Alamilla-Magaña, O. Tejeda-Sartorius y C. I. Chanatasig-Vaca. 2022. Cost análisis of *Agave potatorum* Zucc, produced *in vitro* by direct organogénesis. Agro productividad. 15 (10): 61-68. Doi: <https://doi.org/10.32854/agrop.v15i10.2228>

Caballero-Caballero, M., F. Chinas-Castillo, J. L. Montess B., R. Alavéz-Ramírez y M. E. Silva R. 2017. Effect on compressive and flexural strength of agave fiber reinforced adobes. Journal of Natural fibers. 15 (4): 575-585. Doi: 10.1080/15440478.2017.1349709

Caicedo-López, L. H., A. L. Villagómez A. y D. Sáenz de la O. 2021. Elicitores: implicaciones bioéticas para la agricultura y la salud humana. Revista Bioética. 29 (1). Doi: <https://doi.org/10.1590/1983-80422021291448>

Cantabela D., R. Dolcet-Sanjuan y N. Teixidó. 2022. Using plant growth-promoting microorganisms (PGPMs) to improve plant development under *in vitro* culture conditions. Planta. 255 (177). Doi: <https://doi.org/10.1007/s00425-022-03897-0>

Castillo, A. 2014. Propagación de plantas por cultivo *in vitro*: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. Las Brujas. INIA. INIA, Serie de Actividades de Difusión. 382. Uruguay. 8 pp.

Chandra, S., R. Bandopadhyay, V. Kumar y R. Chandra. 2010. Acclimatization of tissue cultured plantlets: from laboratory to land. Biotechnology Letters. 32 (9): 199-205. Doi: 10.1007/s10529-010-0290-0

Chávez-Díaz, I. F., L. X. Zeyala M., C. I. Cruz C., E. Rojas A., S. Ruíz R. y S. Santos V. 2020. Consideraciones sobre el uso de biofertilizantes como alternativa agrobiotecnológica sostenible para la seguridad alimentaria en México. *Revista Mexicana Ciencias Agrícolas*. 11 (6). 1423-1436. Doi: 10.29312/remexca.v11i6.2492

Cházaro B., M. de J., J. M. Rodríguez D., E. Tapia C. Y J. Gallardo V. 2020. Distribución geográfica del género *Agave* en el estado de Michoacán. *In*: Gallardo V., J., A. C. Gschaedler M., M de J. Cházaro B., J. M. Rodríguez D., E. Tapia C., J. H. Salado P., E. Villegas G., R. Medina O. y M. Vallejo P. 2020. La producción de mezcal en el estado de Michoacán. Segunda edición. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A. C. Jalisco, México. 153 pp

Chen, Y., X. Chen, F. Hu, H. Yang, L. Yue, R. N. Trigiano y Z. M. Cheng. 2014. Micropropagation of *Agave americana*. *HortScience*. 49 (3): 320-327. Doi: 10.21273/HORTSCI.49.3.320

Cohen, A. C., R. Botini, P. N. Piccoli. 2008. *Azospirillum brasilense* sp 245 produces ABA in chemically-defined culture medium and increases ABA content in *Arabidopsis* plants. *Plant Growth Regulation*. 54 (2): 97-103. Doi: 10.1007/s10725-007-9232-9

Coleman-Derr D., D. Desgarennes, C. Fonseca-García, S. Gross, S. Clingenpeel, T. Woyke, G. North, A. Visel, L. P. Partida-Martínez, S. G. Tringe. 2016. Plant compartment and biogeography affect microbiome composition in cultivated and native *Agave* species. *New Phytologist*. 209 (2): 798-811. Doi: 10.1111/nph.13697

Colunga-García M., P., I. Torres-García, A. Casas, C. J. Figueredo U., S. Rangel-Landa, A. Deldado-Lemus, O. Vargas, D. Cabrera-Toledo, D. Zizumbo-Villarreal, X. Aguirre-Dugua, L. E. Eguiarte y G. Carrillo-Galván. 2017. Los agaves y las prácticas mesoamericanas de aprovechamiento manejo y domesticación. *In*: Casas, A., J. Torres-Guevera y Parra F. 2017. Domesticación en el continente americano Vol 2. Investigación para el manejo sustentable de recursos genéticos en el nuevo mundo. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. 501 pp.

Consejo Mexicano Regulador de la Calidad del Mezcal (COMERCAM). 2023. Informe estadístico. Mezcal. México. 20 pp.

Crespo G., M. R., D. R. González E., R. Rodríguez M., J. A. Ruiz C. y N. Durán P. 2018. Caracterización química y física del bagazo de agave tequilero compostado con biosólidos de vinaza como componente de sustratos para cultivos en

contenedor. Revista Internacional de Contaminación Ambiental. 34 (3). Doi: <https://doi.org/10.20937/rica.2018.34.03.01>

Cruz G., H., G. V. Campos A., J. R. Enríquez-Del Valle, V. A. Velasco V. y G. Rodríguez O. 2017. Senescencia foliar en plantas micropropagadas de *Agave americana* durante su aclimatación. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. 8(2): 381-391. Doi: 10.29312/remexca.v8i2.58

Cruz G., H., J. R. Enríquez-del Valle, V. A. Velasco V., J. Ruíz L., G. V. Campos A., D. E. Aquino G. 2013. Nutrimientos y carbohidratos en plantas de *Agave angustifolia* Haw. y *Agave karwinskii* Zucc. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. 4 (6): 1161-1173. Doi: 10.29312/remexca.v0i6.1280

Dar, A., Z. Ahmad Z., M. Iqbal, A. Mehmood, A. J. Azhar H., Bushra, M. Ahmad. 2021. Efficay of rhizobacterial exopolysaccharides in improving plant growth, physiology, and soil properties. Environmental Monitoring and Assessment 193:515. Doi: <https://doi.org/10.1007/s10661-021-09286-6>

Davis, S. C. 2022. *Agave americana*: Characteristics and potential breeding priorities. Plants. 11 (17). Doi: <https://doi.org/10.3390/plants11172305>

De la Torres-Ruíz N., V. M. Ruíz-Valdiviezo, C. I. Rincón-Molina, M. Rodríguez-Mendiola, C. Arias-Castro, F. A. Gutiérrez-Miceli, H. Palomeque-Dominguez, R. Rincón-Rosales. 2016. Effect of plant growth-promoting bacteria on the growth and fructan production of *Agave americana* L. Environmental Microbiology. 47 (3): 587-596. Doi: 10.1016/j.bjm.2016.04.010

Del Puerto R., A. M., S. Suárez T., D. E. Palacio E. 2014. Efectos de los plaguicidas sobre el ambiente y la salud. Revista Cubana de Higiene y Epidemiología. 52 (3): 372-387.

Desgarenes, D., E. Garrido, M. J. Torres-Gomez, J. J. Peña-Cabriales, L. P. Partida-Martínez. 2014. Diazotrophic potential among bacterial communities associated with wild and cultivated *Agave* species. FEMS Microbiol. Ecol. 90 (3): 844-857. Doi: 10.1111/1574-6941.12438

Domínguez, R. M., A. G. Alpuche S., N. L. Vasco M. y E. P. Molphe B. 2008. Efecto de citocininas en la propagación *in vitro* de agaves mexicanos. Revista Fitotecnia Mexicana. 31 (4): 317-322. Doi: 10.35196/rfm.2008.4.317

Domínguez, R. M. Salvador, M. de la L. González. J., C. Rosales G., C. Quiñones V., S. Delgadillo D. de L., S. J. Mireles O. E. Pérez M. B. 2008. El cultivo *in vitro* como herramienta para el aprovechamiento, mejoramiento y conservación de especies del género *Agave*. Investigación y Ciencia. 41 (16): 53-62.

Donnelly, D., y L. Tisdall. 1992. Acclimatization strategies for micropropagated plants. In: Ahuja, M. A. 1992. Micropropagation of woody plant. Kluwer Academic. 153-163 pp.

Dubois, M, K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, F. Smith. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal Chem. 28: 350-356.

Eguiarte, L. E. y V. Souza. 2007. Historia natural del *Agave* y sus parientes: Evolución y ecología. In: Colunga-García M., P., A- Larqué S., L. E. Eguiarte y D. Zizumbo-Villarreal. 2007. En lo ancestral hay futuro: del tequila, los mezcales y otros agaves. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. Yucatán, México. 402 pp.

El Habbasha S. F. y F. M. Ibrahim. 2015. Calcium: Physiological function, deficiency and absorption. International Journal of ChemTech Research. 8(12): 196-202.

Enríquez-del Valle, J.R., I Cruz-Valdez y G. Carrillo-Castañeda. 2012. Acclimatization of *Agave angustifolia* Haw. vitroplants in inert substrates and fertigated with different nutrimental dose. Acta Horticulturae. (947): 101-104 Doi: doi:10.17660/ActaHortic.2012.947.10

Enríquez-del Valle, J. R., S. E. Alcará V., G. R. Ortiz, M. E. Miguel L. y C. M. Vázquez. 2016. Fertilización en vivero a plantas de *Agave potatorum* Zucc micropropagadas-aclimatizadas. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. 7 (5): 1167-11777. Doi: 10.29312/remexca.v7i5.240

Espinosa B., L. A. 2015. Generalidades e importancia de los agaves en México. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C. 7: 161-164.

Espinosa P., B., A. Moreno R., P. Cano R., V. de P. Álvarez R., J. Sáenz M., H. Sánchez G., G. González R. 2017. Inoculación de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal en tomate (*Solanum lycopersicum* L.) cv. afrodita en invernadero. Terra Latinoamericana. 35: 169-178.

Estrada-Maya, A. y E. Bernd. 2021. Biogás y bioetanol a partir de bagazo de agave sometido a explosión de vapor e hidrólisis enzimática. Ingeniería Investigación y Tecnología. 23 (2): 1-10. Doi: <https://doi.org/10.22201/fi.25940732e.2022.23.2.009>

Fonseca V., M. 2021. Evaluación financiera de producción de agave y mezcal: caso de Caltepec, Puebla. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. 12 (2): 263-273. Doi: 10.29312/remexca.v12i2.2583

Francisco N., J. J., A. R. Jiménez-Aparicio, A. De Jesús-Sánchez, M. L. Arenas-Ocampo, E. Ventura-Zapata y S. Evangelista-Lozano. 2011. Estudio de la morfología y aclimatación de plantas de *Laelia eyermaniana* RCHB. f. generadas *in vitro*. Polibotánica. 32: 107-117.

Gallardo V., J. 2020. La producción de mezcal en el estado de Michoacán. *In*: Gallardo V., J., A. C. Gschaedler M., M de J. Cházaro B., J. M. Rodríguez D., E. Tapia C., J. H. Salado P., E. Villegas G., R. Medina O. y M. Vallejo P. 2020. La producción de mezcal en el estado de Michoacán. Segunda edición. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A. C. Jalisco, México. 153 pp

Gallart, M., C. Paungfoo-Lonhienne, A. Gonzalez y S. J. Treuman. 2021. Nitrogen source influences the effect of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) on *Macadamia integrifolia*. *Agronomy*. 11 (6): 1064. Doi: <https://doi.org/10.3390/agronomy11061064>

García-Mendoza., A. J. 2007. Los agaves de México. *Ciencias*. 87: 14-23.

García-Mendoza, A. J. 2011. Fascículo 88. Agavaceae. Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. 95 pp.

García-Mendoza, A. J., Cházaro B., M. J., Nieto S., J., Sánchez T., L. F. Tapia C., E., Gómez L., J. F., Tamayo O., M., Narváez Z., J. A., Rodríguez G., B. Palomino H., G. A., Martínez R., J., Martínez R., J. C., Quiñones A., E. E., Rincón E., G., Beltrán G., M. J., Quí Z., J. A., Guzmán M., R., Mercado F., Y., Ragazzo S., J. A., Calderón S., M., Gutiérrez M., A. 2017. *Agave*. *In*: Gschaedler M., A. C., Villarreal H., S., Gutiérrez M., A., Ortiz B., R. I., Moreno T., C., Ruben L., O., Larralde C., P. E., Contreras R., Dávila V., S. M., y Gallardo V., J. 2017. Panorama del aprovechamiento de los agaves en México. Red Temática Mexicana Aprovechamiento Integral Sustentable y Biotecnología de los Agaves. Jalisco, México. 300 pp.

García-Mendoza, A. J., I. S. Franco M., D. Sandoval G. 2019. Cuatro especies nuevas de *Agave* (Asparagaceae, Agavoideae) del sur de México. *Acta Botánica Mexicana*. 126: e1461. Doi: 10.21829/abm126.2019.1461

García M., P. M. 2004. Reproducción y germinación de *Agave cupreata* Trel. & Berger (Agavaceae) en la localidad de Ayahualco, Guerrero. Tesis para obtener el grado de Licenciatura en Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México. 78 pp.

Gilbert S., J. Xu, K. Acosta, A. Poulev, S. Lebeis, E. Lam. 2018. Bacterial production of indole related compounds reveals their role in association between duckweeds and endophytes. *Frontiers in Chemistry*. 6(265). Doi: 10.3389/fchem.2018.00265

Giraldo-Cañas, D. 2019. Una nueva especie de *Agave* (Asparagaceae) de Colombia y una clave taxonómica para las especies sudamericanas. *Caldasia*. 39 (1): 33-49. Doi: <https://dx.doi.org/10.15446/caldasia.v39n1.63318>

Gobierno de México. 2018. Michoacán ocupa el tercer lugar a nivel nacional en producción de agave. <https://www.gob.mx/agricultura/michoacan/articulos/michoacan-ocupa-el-tercer-lugar-a-nivel-nacional-en-produccion-de-agave?idiom=es#:~:text=El%20estado%20de%20Michoac%C3%A1n%20cuenta%20con%20tres%20mil,Rural%2C%20Pesca%20y%20Alimentaci%C3%B3n%20%28SAGARPA%29%20en%20el%20Estado>. Revisado: 15 de noviembre del 2023

González-López, J. R., J. F. Ramos-Lara, A. Zaldivar-Cadena, L. Chávez-Guerrero, R. X. Magallanes-Rivera y O. Burciaga-Díaz. 2014. Small addition effect of agave biomass ashes in cement mortars. *Fuel Processing Technology*. (133): 35-42. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fuproc.2014.12.041>

González R., R. M., A. Iglesias, J. C. Lorenzo y B. Dibut. 2012. Selección de cepas de *Azotobacter chroococcum* para su aplicación en la aclimatización de plantas *in vitro* de piña cv. "Cayena lisa". *Biotecnología Vegetal*. 12 (3): 157-164

Gschaedler M., A. C. 2017. Panorama del aprovechamiento de los agaves en México. Centro de Investigación y Asistencia de Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A. C. Guadalajara, Jalisco. 300 pp.

Guzmán F., J. 2018. Fertilizantes químicos y biofertilizantes en México. Centro de Estudios para el Desarrollo Rural Sustentable y la Soberanía Alimentaria. México. 34 pp.

Haider, B. A., H. Ali, B. Yücesan, S. Saeed, K. Rehman, M. Ali K. 2016. Evaluation of biochemical markers during somatic embryogenesis in *Silybum marianum* L. 3 *Biotech*. 6(1):71. Doi: 10.1007/s13205-016-0366-1

Hakim S., M. A., S. Nurul K., S. Suhandono, S. Viridi, T. Kesuma. 2013. Measuring leaf chlorophyll concentration from its color: a way in monitoring environment change to plantations. *Physics. Bio-ph*. DOI:10.1063/1.4820322

Huassasquiche S., L., P. Moreno D., J. Jiménez D. 2020. Caracterización y evaluación del potencial PGPR de la microflora asociada al cultivo de Tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet). *Ecología Aplicada*. 19 (2): 65-76. Doi: 10.21704/rea.v19i2.1557

Huezcas-Garrido, L., E. Alanís-García, J. A. Ariza-García y Q. Y. Zafra-Rojas. 2022. Subproductos de interés nutricional y funcional de *Agave salmiana*. Revista Chilena de Nutrición. 49 (2). Doi: <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182022000200250>

Illsley G., C. 2008. Informe final del proyecto ES004. Manejo campesino sustentable del maguey papalote del Chilapan. Fase II. Grupo de Estudios Ambientales A. C. México, D.F. 49 pp.

Jabborova D., A. Kannepalli, K. Davranov, A. Narimanov, Y. Enakiev, A. Syed, A. M. Elgorban, A. H. Bahkali, S. Wirth, R. Z. Sayyed y A. Gafur. 2021. Co-inoculation of rhizobacteria promotes growth, yield, and nutrient contents in soybean and improves soil enzymes and nutrients under drought conditions. Scientific reports. 11 (22081). Doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-01337-9>

Jahan S., L., N. Ahmed W., G. Mustafa L., A. Hafeez L., G. Mustafa B., K. Hussain T., T. Ahmed B., S. Ali W., A. Ahmed L. 2016. Role of nitrogen for plant growth and development: a review. Advances in environmental biology. 10(9): 209-218.

Jones, A. M., Y. Zhou, M. A. Held, S. C. Davis. 2020. Tissue composition of *Agave americana* L. Yields greater carbohydrates from enzymatic hydrolysis than advanced bioenergy crops. Frontiers in Plant Sciences. 11: 654. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00654>

Kafkafi, U. y S. Kant. 2005. Fertigation. In: Hillel, D. 2005. Encyclopedia of soils in the environment. Elsevier. 1-9 pp. Doi: <https://doi.org/10.1016/B0-12-348530-4/00227-7>

Khan, N., A. M. D. Bano, M. A. Rahman, J. Guo, Z. Kang y M. A. Babar. 2019. Comparative physiological and metabolic analysis reveals a complex mechanism involved in drought tolerance in Chickpea (*Cicer arietinum* L.) induced by PGPR y PGRs. Scientific Reports. 9 (2097): 1-19. Doi: (2019) 9:2097 | <https://doi.org/10.1038/s41598-019-38702-8>

Khan, N., A. M. D. Bano y A. Babar. 2020. Impacts of plants growth promoters and plant growth regulators on rainfed agriculture. PLOS ONE. 15(5): e0232926. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232926>

Khasawneh, F. E., E. C. Sample, E. J. Kamprath. 1980. The role of phosphorus in agricultura. ASA. CSSA y SSSA Books. Wisconsin USA. 918 pp.

Kirchmayr, M. R., M. Arellano P., M. Estarrón E., J. Gallardo V., A. C. Gschaedler M., J. E. López R., A. Navarro H., R. Prado R. y E. Ramírez R. 2014. Manual para la estandarización de los procesos de producción del mezcal guerrerense. Centro

de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C. Jalisco, México. 198 pp

Kohorn, B. D. 2015. Cell wall-associated kinases and pectin perception. *Journal of experimental botany*. 67 (2): 489-494. Doi: <https://doi.org/10.1093/jxb/erv467>

Krishna, H., S. K. Singh, R.R. Sharma, R. N. Khawale, M. Grover, V. B. Patel. 2005. Biochemical changes in micropropagated grape (*Vitis vinífera* L.) plantlets due to arbuscular-mycorrhizal fungi (AMF) inoculation during *ex vitro* acclimatization. *Scientia Horticulturae*. 106: 554-567. Doi: [doi:10.1016/j.scienta.2005.05.009](https://doi.org/10.1016/j.scienta.2005.05.009)

Kulus, D. 2014. Micropropagation of selected *Agave* species. *PhD Interdisciplinary Journal*. 1: 75-84. Doi: [10.13140/2.1.1482.6565](https://doi.org/10.13140/2.1.1482.6565)

Kumar, M., V. Prakash G., S. Pandey A. Gupta, M. Kumar P., A. Bihari B., S. Jenkins y K. H. M. Siddique. 2021. Plant-Growth-Promotin Rhizobacteria emerging as an effective bioinoculant to improve the growth, production and stress tolerance of vegetable crops. *International Journal of Molecular Sciences*. 22 (22): 12245. Doi: <https://doi.org/10.3390/ijms222212245>

Lara, C., L. M. Esquivel A., J. L. Negrete P. 2011. Bacterias nativas solubilizadores de fosfatos para incrementar los cultivos en el departamento de Córdoba-Colombia. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*. 9 (2): 114-120.

Lara M., C., L. E. Oviedo Z., C. A. Bentacur H. 2011. Bacterias nativas con potencial en la producción de ácido indolacético para mejorar los pastos. *Zootecnia Trop*. 29 (2): 187-194.

Larson J. y R. Ruíz. 2006. Mezcales y diversidad: *Agave*. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. 1 (91): 74.

León-Martínez, F. M., Y. D. Ortiz-Hernández. 2022. Microscopical observations of cristal deposits on the epidermis of leaves of *Agave potatorum*. *Micron*. (154). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.micron.2021.103201>

López, C. F. L. 2022. Los destilados de *Agave* en México: Una exploración desde la economía ecológica radical. *Revista Iberoamericana de Economía Ecológica*. 35 (3): 21-38

López, M., R. Martínez V., M. Brossard F., M. Toro. 2010. Capacidad de fijación de nitrógeno atmosférico de cepas nativas de agroecosistemas venezolanos. *Agronomía Trop*. 60 (4): 355-361.

Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*. 193 (1): 265-275. Doi: 10.1016/S0021-9258(19)52451-6

Malhotra, H., Vandana, S. Sharma y R. Pandey. 2018. Chapter 7. Phosphorus nutrition: Plant growth in response to deficiency and excess. In: *Plant nutrients and abiotic stress tolerance*. 171-190. Doi: 10.1007/978-981-10-9044-8_7

Martínez-Castro, L. E. A. Martínez-Palacios, N. M. Sánchez V., P. Lobitte, C. R. Nápoles A., O. Martínez P., J. Villegas, J. G. Martínez A., J. Golubox. 2015. Poblaciones silvestres de Maguey Chino (*Agave cupreata*) en el estado de Michoacán. In: Martínez-Palacios, A., J. L. Morales-García y S. Guillén Rodríguez. 2015. Aspectos sobre el manejo y conservación de agaves mezcaleros en Michoacán. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Consejo Estatal de Ciencia, Tecnología e Innovación. México. 167 pp.

Martínez-Palacios A., J. M. Gómez-Sierra, C. Sáenz-Romero, N. Pérez-Nasser y N. Sánchez-Vargas. 2011. Genetic diversity of *Agave cupreata* Trell. & Berger. Consideraciones for its conservation. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 34 (3): 159-165). Doi: 10.35196/rfm.2011.3.159

Mattos J., D., D. M. Kadyampakeni, A. Quiñones O., R. Marcelli B., K. T. Morgan y J. A. Quaggio. 2022. Chapter 15: Soil and nutrition interactions In: Talon M., M. Caruso y F. G. Gmitter. 2022. The genus *Citrus*. Woodhead Publishing. 311-331 pp. Doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812163-4.00015-2>

Mau, S., K. Vega, M. Sánchez. Aislamiento de bacterias del suelo y su potencial utilización en sistemas de tratamiento de aguas residuales. *Revista de Ciencias Ambientales*. 42 (1): 45-52. Doi: 10.15359/rca.42-2.4

Mellado-Mojica, E. y M. G. López. 2015. Identification, classification and discrimination of agave syrups from natural sweetener by infrared spectroscopy and HPAEC-PAD. *Food Chemistry*. 167 (15): 349-357. Doi: 10.1016/j.foodchem.2014.06.111

McKean S. J. 1993. Manual de análisis de suelos y tejido vegetal. Una guía teórica y práctica de metodologías. Centro Internacional de Agricultura Tropical-CIAT. 103 pp.

McNear Jr., D. H. 2013. The rhizosphere – Roots, soil and everything in between. *Nature Education Knowledge*. 4(3)

Michelena G., G. Almeida, B. Altuna, F. Eng. 2005. Efecto inhibitor del ácido jasmónico sobre el crecimiento de bacterias y hongos. ICIDCA. 3: 3-7.

Mielenz R., J., M. Rodríguez J., O. A. Thompson, X. Yang y H. Yin. 2015. Development of *Agave* as dedicated biomass source: production of biofuels from whole plants. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*. 8 (79). Doi: <https://doi.org/10.1186/s13068-015-0261-8>

Mondragón, M., L. E. Elizalde y V. Rejón. 2022. Biominerals in the leaves of *Agave karwinskii* Zucc. *Results in Chemistry*. 4 (100309). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.rechem.2022.100309>

Monja-Mio, K. M., F. B. Pool, G. Herrera H., M. Esqueda V. y M. L. Robert. 2015. Development of the estomatal complex and leaf surface of *Agave angustifolia* Haw. "Bacanora" plantlets during *in vitro* to *ex vitro* transition process. *Scientia Horticulturae* 189: 32-40. Doi:10.1016/j.scienta.2015.03.032

Morales-Maldonado, E. R., M. Gutiérrez-Rojas, R. J., Holguin-Peña, D. Ruíz-Juárez, J. L. Vega-Chávez y A. C. Reyes-Godoy. 2022. Effect of nitrogen, phosphorus y potassium on regional organic substrates in *Agave salmiana* production in Huichapan, Hidalgo, México. *Journal of the profesional association for cactus development*. 24: 203-219. Doi: <https://doi.org/10.56890/jpacd.v24i.511>

Moreno-Conn L. M., M. López-Casallas y F. M. Cruz B. 2021. Solubilización de fosfatos por bacterias del género *Burkholderia* aisladas de oxisoles de la altillanura colombiana. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*. 22(2): e1897. DOI: https://doi.org/10.21930/rcta.vol22_num2_art:189

Montoya-Martínez, A. C., G. Rincón-Enríquez, P. Lobit, L. López-Pérez y E. Quiñones-Aguilar. 2019. Native arbuscular mycorrhizal fungi from the rhizosphere of *Agave cupreata* and their effect on *Agave tequilana* growth. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 42(4): 429-438. Doi: 10.35196/rfm.2019.4.429-438

Nápoles A., C. R., L. E. Martínez C., L. Ambriz C., S. Guillén R., I. Torres y E. Santillán. 2015. Proceso de elaboración del mezcal artesanal en Michoacán. *In*: Martínez-Palacios, A., J. L. Morales-García y S. Guillén R. 2015. Aspectos sobre manejo y conservación de agaves mezcaleros en Michoacán. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Consejo Estatal de Ciencia, Tecnología e Innovación de Michoacán. Michoacán, México. 176 pp

Nelson, C. J. y H. Millar. 2015. Protein turnover in plant biology. *Nature Plants*. 1 (15017): 1-7. Doi: 10.1038/NPLANTS.2015.17

Ocaña-Nava, D., A. García-Mendoza y J. Larson. 2007. Modelación supervisada de la distribución de magueyes mezcaleros en México y sus posibles aplicaciones. *In*: Colunga-García M., P., A- Larqué S., L. E. Eguiarte y D. Zizumbo-Villarreal. 2007. En lo ancestral hay futuro: del tequila, los mezcales y otros agaves. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. Yucatán, México. 402 pp.

Olmos S., G. Luciani y E. Galdeano. 2010. Micropropagación. *In*: Levitus G., V. Echenique, C. Rubinstein, E. Hopp, L. Mroginski. 2010. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II.

Olvera C. C., A. Ávila F., G. R. Bustillo A., A. López-Munguía. 2015. Processing of fructans and oligosaccharides from *Agave* plants. *In*: Preedy, V. 2015. Processing and impact on active components in food. Academic Press. London, Inglaterra. 724 pp. Doi: 10.1016/B978-0-12-404699-3.00015-9

Pace, L., M. Pellegrini, S. Palmieri, R. Rocchi, L. Lippa y M. D. Gallo. 2020. Plant growth-promoting rhizobacteria for in vitro and ex vitro performance enhancement of Apennines' Genepi (*Artemisia umbelliformis* subsp. *eriantha*), an endangered phytotherapeutic plant. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*. Doi: <https://doi.org/10.1007/s11627-019-10035-1>

Paguay, M., L. E. A. Vasco C. 2013. Tesis para título de ingeniero en Biotecnología de los Recursos Naturales. Aislamiento de bacterias solubilizadoras de calcio de la rizosfera de cultivos de alcachofa (*Cynara scolymus*) ubicados en Lao-Latacunga-Cotopaxi. Universidad Plitécnica Salesiana Sede Quito. 88 pp.

Pareek S., N. Alok S., S. Sharma, V. Kumar., T. Agarwal, G. A. Gonzalez-Aguilar. 2017. Chlorophylls: Chemistry and biological functions. *Fruit and Vegetable Phytochemicals*. 269-284. Doi:10.1002/9781119158042.ch14

Pérez de L., A. V., J. H. Caamal V., J. C. Alamilla M., M. A. Criollo C., R. Garruña H. 2020. Alternativas innovadoras en la micropropagación de agaves mezcaleros. *Temas de Ciencias y Tecnología*. 24 (71): 41-48.

Pérez-López, A., A. Kumar-Singh, E. Castro-Camus y J. Simpson. Insights into the anatomy and physiology of water and carbohydrate storage in leaves of three *Agave* species. *In*: Gutiérrez M. A., B. Rodríguez G., M. Estarrón E., A. C. Gschaedler M., M. R. Kirchmayr, R. Moreno T., P. Lappe, R. M. Camacho R., R. I. Ortiz B., M. G. Aguilar U., O. Aguilar J., J. Gallardo V., J. de J. Hernández L. y E. Sánchez O. 2019. Integral and sustainable use of *Agave*. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C. Jalisco, México. 201 pp.

Pérez H., E., M. del C. Chávez P., J. C. González H. 2016. Revisión del agave y el mezcal. *Revista Colombiana de Biotecnología* 18 (1): 148-164. Doi: 10.15446/rev.colomb.biote.v18n1.49552

Pérez H., Y., M. Sosa D. C., L. Fuentes A., Y. Rubio F., A. L. Valdivi A., J Pérez R. 2016. Caracterización bioquímica e histológica de plantas aclimatizadas *in vitro* de *Agave fourcroydes* Lem. *Biotecnología Vegetal*. 16(4): 223-230

Pérez-y-Terrón, R., T. S. González-Montfort, J. Muñoz-Rojas. 2014. Antagonismo microbiano asociado a cepas bacterianas provenientes de jitomate (*Lycopersicum esculentum* Mill) y maíz (*Zea Mays*). *Revista Iberoamericana de Ciencias*. 1 (3): 53-60.

Pimienta-Barrios E., J. Zañudo-Hernández y J. García-Galindo. 2006. Fotosíntesis estacional en plantas jóvenes de *Agave tequilana*. *Agrociencia*. 4 (6): 699-709

Pinto G., S. Silva, J. Loureiro, A. Costa, M. C. Días, C. Araujo, L. Neves y C. Santos. 2011. Acclimatization of secondary somatic embryos derived plants of *Eucalyptus globulus* Labill.: an structural apprach. 25 (3): 383-392. Doi: doi:10.1007/s00468-010-0513-y

Porta, H., G. Jiménez-Nopala. 2019. Papel de las hormonas vegetales en la regulación de la autofagia en plantas. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*. 22: 1-22. Doi: 10.22201/fesz.23958723e.2018.0.160

Prasad R. y Y. Singh S. 2020. Calcium as a plant nutrient. *International Journal of Bio-resource and stress management*. 11(5): i-iii. Doi: HTTPS://DOI.ORG/10.23910/1.2020.2075a

Puente-Garza, C. A., A. Gutiérrez-Mora y S., García-Lara. 2015. Micropropagation of *Agave salmiana*: Means to production of antioxidant and bioactive principles. *Frontiers in Plant Science*. 5 (1026): 1-9. Doi: 10.3389/fpls.2015.01026

Qi, Q. G., P. A. Rose, G. D. Abrams, D. C. Taylor, S. R. Abrams, A. J. Cutler. 1998. Absciscic acid 8'-Hydroxylase is a cytochrome P450 monooxygenasa. *Plant Physiology*. 118 (3): 849-860. Doi: https://doi.org/10.1104/pp.118.3.849

Quiñones-Aguilar E. E., A. C. Montoya-Martínez, G. Rincón-Enríquez, P. Lobit y L. López-Pérez. 2016. Effectiveness of arbuscular mycorrhizal consortia on the growth of *Agave inaequidens*. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*. 16 (4): 1052-1064. Doi: 10.4067/S0718-95162016005000077

Ramírez-Tobías, H. M., C. B. Peña-Valdivia y J. R. Aguirre. 2014. Respuestas bioquímico-fisiológicas de especies de *Agave* a la restricción de humedad. *Botanical sciences*. 92 (1): 131-139. Doi: 10.17129/botsci.156

Ramos, R. A. S., R. Mendoza V., V. Robledo T., A Hernández P. 2022. Efecto de rizobacterias solubilizadoras de calcio en caracteres agronómicos y minerales de *Tagetes erecta*. *Biotecnia*. 24(2). Doi: <https://doi.org/10.18633/biotecnia.v24i2.1621>

Regalado, E. R., C. I. Godínez-Hernández, J. R Aguirre R., R. M. Camacho R., B. I. Juárez F. 2021. Caracterización de fructanos de tallos de *Agave salmiana* Otto ex Salm Dyck y *A. tequilana* F.A.C. Weber en madurez fisiológica plena. *Botanical Sciences*. 99 (2): 388-397. Doi: <https://doi.org/10.17129/botsci.2641>

Reynoso-Santos, R., A. J., García M. 2012. Identificación taxonómica de agaves (*Agave* spp.) Utilizados para la elaboración del licor comiteco en Chiapas, México. *In: Rojas R., A. Identificación taxonómica de agaves (Agave spp.) utilizados para la elaboración del licor comiteco en Chiapas, México. Colegio de Postgraduados. Guadalajara, Jalisco. 44 pp.*

Riglet, L., S. Gatti y E. Moyroud. 2021. Sculpting the Surface: Structural patterning of plant epidermis. *iScience*. 24 (11): 103346. Doi: 10.1016/j.isci.2021.103346

Romero-Arenas, O., M. A. Damian H., J. A. Rivera T., F. Aldana, C. Parraguirre Lezama. 2015. A1-191 Evaluación de *Trichoderma* spp., en asociación con *Agave cupreata* y *Juniperus deppeana* en suelos del municipio San Juan Tzicatlacoyan, Puebla, México. *Memorias del Congreso Latinoamericano de Agroecología*. 1-6 pp.

Ruíz, S. F. L., J. A. Ruiz V., J. A. Hernández B., R. García J., A. Valadez V. 2019. Extracción y cuantificación de clorofila en hojas comestibles del estado de Tabasco. *Investigación y Desarrollo en Ciencias y Tecnología de Alimentos*. 4: 891-896.

Saint-Denis, T., y J. Goupy. 2004. Optimization of a nitrogen analyser based on the Dumas method. *Analytica Chimica Acta*. 515 (1): 191-198. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2003.10.090>

Sánchez A., Z. Coronel-Lara, A. Gutiérrez, G. Vargas, M. L. Coronado, M Esqueda. 2020. Aclimatación y trasplante de vitroplantas de *Agave angustifolia* Haw. en condiciones silvestres. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 11(7): 1593-1605. Doi: 10.29312/remexca.v11i7.2403

Sánchez S., M., A. Bautista-Cruz, V. Martínez-Gallegos. 2021. Fosfobacterias promueven la emergencia y el crecimiento de agaves silvestres. *Ciencias de la Salud, Biológicas y Químicas*. 17 (6): 1-9. Doi: 10.22201/enesl.20078064e.2018.17.63408

Scattareggia, J. P. 2016. Aislamiento y selección de bacterias solubilizadoras de fósforo de un suelo cultivado con tomate para industria (*Solanum lycopersicum* L.). Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Cuyo. Argentina. 57 pp.

Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 2017. Planeación Agrícola Nacional 2017-2030. *Agave tequilero y mezcalero mexicano*. SAGARPA. 15 pp

Secretaría de Economía. 2022. NXM-F-607-NORMEX-2020, Alimentos-Determinación de cenizas en alimentos-Método de prueba (Cancela la NMX-F-607-NORMEX-2013). Ciudad de México

Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. 2002. Norma Oficial Mexicana NOM-021-RECNAT-2000, Que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. Estudios, muestreo y análisis. Ciudad de México. <http://www.ordenjuridico.gob.mx/Documentos/Federal/wo69255.pdf>

Shahzad, R., A. Latif K., A. Bilal, M. Waqas, S.-M. Kang, I.-J. Lee. 2017. Inoculation of abscisic acid-producing endophytic bacteria enhances salinity stress tolerance in *Oryza sativa*. *Environmental and Experimental Botany*. 136: 68-77. Doi: 10.1016/j.envexpbot.2017.01.010

Shiwani, K., D. Sharma y A. Kumar. 2022. Improvement of plant survival and expediting acclimatization process. *In: Gupta, S. y P. Chaturvedi. 2022. Commercial scale tissue culture for horticulture and plantation crops*. Springer. Singapur. 277-290. Doi: 10.1007/978-981-19-0055-6_12

Servicio de Información Agroalimentaria y pesquera (SIAP). 2022. <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/> Consultado el 15 de noviembre del 2023

Silva L., M., T. E. Furtado P., A. Rabelo C., A. Rubio N., F. Guimarães S., P. J. R. Gonçalves S. y P. Fabiane M. 2021. Acclimatization of *Pouteria gardeneriana* Radlk micropropagated plantlets: Role for *in vitro* rooting and plant growth-promoting bacteria. *Current Plant Biology*. Vol. 27. <https://doi.org/10.1016/j.cpb.2021.100209>.

Somers, E., J. Vanderleyden, M. Srinivasan. 2004. Rhizosphere bacterial signalling: A love parade beneath our feet. *Critical Reviews in Microbiology*. 30 (4): 205-240. Doi: 10.1080/10408410490468786

Sosa-del Castillo, M., S. Alemán G., Y. Pérez H. E. Abreu C., D. Sosa-Del Castillo y G. González O. 2014. Caracterización de la lámina foliar de plantas de *Agave fourcroydes* Lem. Obtenidas por propagación asexual. *Biotecnología vegetal*. 14 (1).

- Soumare, A., A. G. Diédhiou, N. Kumar A., L. K. T. Al-Ani, M. Ngom, S. Fall, M-Hafidi, Y. Ouhdouch, L. Kouisni y M. O. Sy. 2021. Potential role and utilization of plant growth promoting microbes in plant tissue culture. *Frontiers. Microbiology*. 12: 649878. Doi: 10.3389/fmicb.2021.649878
- Squeo, F. A., M. F. León. 2007. Capítulo III. Transpiración. *In*: Squeo, F. A., L. Cardemil. 2007. Ediciones Universidad de La Serena. La Serena, Chile. Pp: 67-87.
- Sumanta, N. C. Imranul H., J. Nishika y R. Suprakash. 2014. Spectrophotometric análisis of chlorophylls and carotenoids from commonly grown fern species by using various extracting solvents. *Research Journal of Chemical Sciences*. 4(9): 63-69. Doi: 10.1055/s-0033-1340072
- Swain, T., W. E. Hillis. 1959. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I. The quantitative analysis of phenolic constituents. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 10: 63-68. Doi: 10.1002/jsfa.2740100110
- Takashi, M. 2019. Carotenoids as natural functional pigments. *Journal of Natural Medicines*. 74(5). Doi: <https://doi.org/10.1007/s11418-019-01364-x>
- Tamayo-Ordóñez, M. C., L. C. Rodríguez-Zapata, J. A. Narváez-Zapata, Y. J. Tamayo-Ordóñez, B. A. Ayil-Gutiérrez, F. Barredo-Pool y L. F. Sánchez-Teyer. 2016. Morphological features of different polyploids for adaptation and molecular characterization of CC-NBS-LRR and LEA genes families in *Agave* L. *Journal of Plant Physiology*. 195: 80-94. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jplph.2016.03.009>
- Téllez T., A. G., J. A. Jiménez R., O. González C., W. R. Juárez P., A. Martínez M. y V. M. Chávez A. 2023. Cultivo *in vitro* de *Agave potatorum*, especie amenazada endémica de México. *Botanical Sciences*. 101 (3): 883-894. Doi: 10.17129/botsci.3279
- Téllez V., C. A. 2009. La incursión del agave tequilero en el paisaje michoacano. La desnaturalización como causa económica. *In*: Téllez V., C. A., y M. A. García S. 2009. Estudios Michoacanos XIII. El Colegio de Michoacán. Michoacán, México. 258 pp
- Tewari, D., Y. C. Tripathi y N. Anjum. 2014. *Agave sisalana*: A plant with high chemical diversity and medicinal importance. *World Journal of Pharmaceutical Research*. 3 (8): 238-249
- Thambugala, K. M., D. A. Daranagama, A. J. L. Phillips, S. D. Kannangara y I. Promputtha. 2020. Fungi vs fungi biocontrol: an overview of fungal antagonists applied against fungal plant pathogens. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 10. Doi: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.604923>

Timofeeva, A., M. Galyamova, S. Sedykh. 2022. Prospects for using phosphate-solubilizing microorganisms as natural fertilizers in agricultura. *Plants*. 11(16). <https://doi.org/10.3390/plants11162119>

Torres-García, I. 2015. Distribución, aprovechamiento y manejo del maguey alto en el estado de Michoacán, aportes para encaminar su sustentabilidad. *In*: Martínez-Palacios, A., J. L. Morales G. y S. Guillén R. 2015. Aspectos sobre manejo y conservación de agaves mezcaleros en Michoacán. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Consejo Estatal de Ciencia, Tecnología e Innovación de Michoacán. Michoacán, México. 176 pp.

Torres-García, I. y A. M. Delgado L. 2019. Diversidad de agaves: usos y riesgos en su aprovechamiento. *In*: Cruz A., A. 2019. La biodiversidad en Michoacán. Estudio de estado 2. Volumen III. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México. 371 pp.

Torres-García, I., F. J. Rendón-Sandoval, J. Blancas, A. Casas y A. I. Moreno-Calles. 2019. The genus *Agave* in agroforestry systems of México. *Botanical Sciences*. 97 (3): 261-288. Doi: 10.17129/botsci.2202

Trinidad-Cruz, J. R., E. E. Quiñones-Aguilar, G. Rincón-Enríquez. 2017. Mycorrhization of *Agave cupreata*: Biocontrol of *Fusarium oxysporum* and plant growth promotion. *Revista Mexicana de FITOPATOLOGÍA*. 2 (35): 151-169. Doi: 10.18781/R.MEX.FIT.1607-5

Velasco-Jiménez, A., G. Acevedo-Hernández, R. Clarenc A. y A. Rodríguez-Sahagún. 2020. Bacterias rizosféricas con beneficios potenciales en la agricultura. *Terra Latinoamericana*. 38 (2). Doi: <https://doi.org/10.28940/terra.v38i2.470>

Vessey, J. K. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*. 255: 571-586. Doi: 10.1023/a:1026037216893

Yuan Y., J., W. Hao T. y C. Wei J. 2022. Nitrogen in plants: from nutrition to modulation of abiotic stress adaptation. *Stress Biology*. 2(4). Doi: <https://doi.org/10.1007/s44154-021-00030-1>

Zárate-Martínez, W., S. González-Morales, F. Ramírez-Godina, A. Robledo-Olivo, A. Juárez-Maldonado. 2021. Efecto de los ácidos fenólicos en el sistema antioxidante de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* Mill.). *Agronomía Mesoamericana*. 32 (3): 854-868. Doi: <https://doi.org/10.15517/am.v32i3.45101>

Zayed, O., O. A. Hewedy, A. Abdelmoteleb, M. Ali, M. S. G. Youssef y A. F. Roumia, D. Seymour y Z.-C. Yuan. 2023. Nitrogen journey in plants: from uptake to

metabolism to stress response and microbe interaction. *Biomolecules*. 13: 1443. Doi: 10.20944/preprints202308.1575.v1

Ziv, M. 1995. In vitro acclimatization. *In*: Aitken-Christie, J. T. Kozai y M. A. L. Smith. Automation and environmental control in plant tissue culture. Springer. 493-516. Doi: https://doi.org/10.1007/978-94-015-8461-6_20

Zúñiga-Estrada, L. 2013. Nutrición de *Agave tequilana* y manejo de los fertilizantes en un sistema de producción intensiva (riego por goteo). Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. México. 46 pp

Zúñiga-Estrada, L., 1. Rosales R., M. de J. Yáñez-Morales y C. Jacques-Hernández. 2018. Características y productividad de una planta MAC, *Agave tequilana* desarrollada con fertigación en Tamaulipas, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 9 (3): 553-564, Doi: 10.29312/remexca.v9i3.1214