

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN DE CARRERAS AGRONÓMICAS



PRODUCCIÓN IN VITRO DE NOA *Agave victoriae-reginae* T. Moore

POR

JULIO CESAR ANGELES VALENTÍN

TESIS

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

INGENIERO AGRÓNOMO

TORREÓN, COAHUILA

FEBRERO DEL 2006

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
UNIDAD LAGUNA**

PRODUCCIÓN IN VITRO DE NOA *Agave victoriae-reginae* T. Moore

TESIS

PRESENTADA POR:

JULIO CESAR ANGELES VALENTÍN

**QUE SE SOMETE A LA CONSIDERACIÓN DEL H. JURADO
EXAMINADOR, COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL
TÍTULO DE:**

INGENIERO AGRÓNOMO

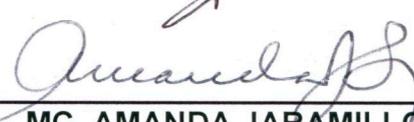
COMITÉ EVALUADOR

PRESIDENTE:



M.C. HÉCTOR MONTAÑO RODRÍGUEZ

VOCAL:



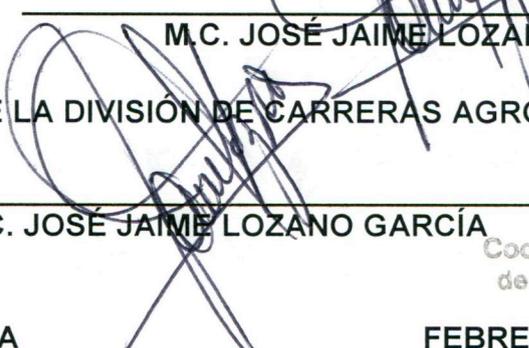
MC. AMANDA JARAMILLO SANTOS

VOCAL:



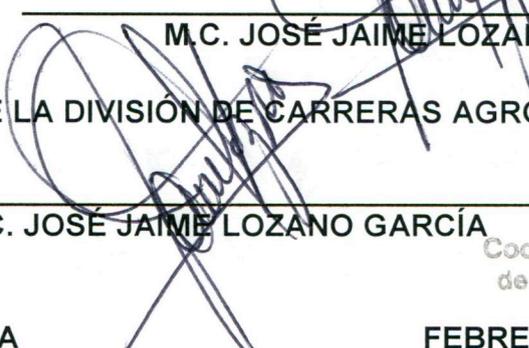
BIOL. MARIA DE JESUS RIVERA GONZÁLEZ

VOCAL SUPLENTE:



M.C. JOSÉ JAIME LOZANO GARCÍA

COORDINADOR DE LA DIVISIÓN DE CARRERAS AGRONÓMICAS



M.C. JOSÉ JAIME LOZANO GARCÍA



Coordinación de la División
de Carreras Agronómicas

TORREÓN, COAHUILA

FEBRERO DEL 2006

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
UNIDAD LAGUNA**

PRODUCCIÓN IN VITRO DE NOA *Agave victoriae-reginae* T. Moore

TESIS

ELABORADA POR:

JULIO CESAR ANGELES VALENTÍN

**BAJO LA SUPERVISIÓN DEL COMITÉ DE ASESORÍA Y APROBADA
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR AL GRADO DE:**

INGENIERO AGRÓNOMO

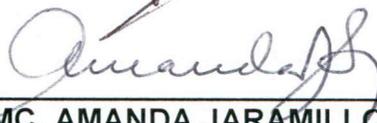
COMITÉ ASESOR

ASESOR PRINCIPAL:



M.C. HÉCTOR MONTAÑO RODRÍGUEZ

ASESOR:



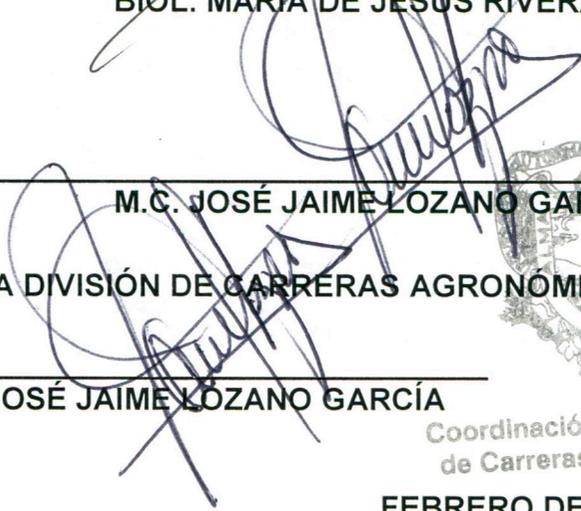
MC. AMANDA JARAMILLO SANTOS

ASESOR:



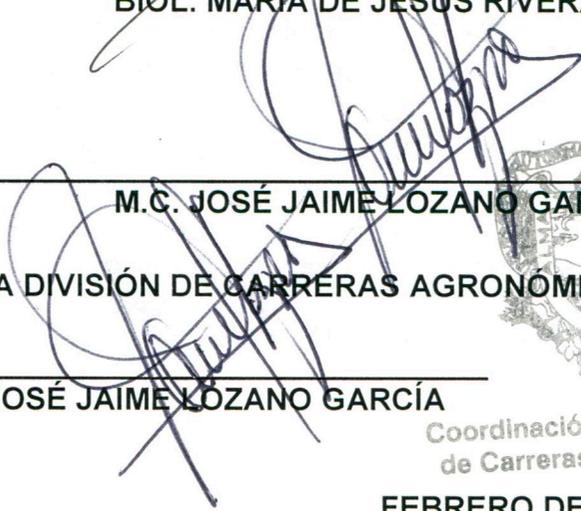
BIOL. MARIA DE JESUS RIVERA GONZÁLEZ

ASESOR:



M.C. JOSÉ JAIME LOZANO GARCÍA

COORDINADOR DE LA DIVISIÓN DE CARRERAS AGRONÓMICAS



M.C. JOSÉ JAIME LOZANO GARCÍA



Coordinación de la División
de Carreras Agronómicas

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS.....	i
DEDICATORIAS.....	ii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Planteamiento del problema.....	2
1.2. Justificación.....	3
1.3. Objetivos.....	4
II. MARCO TEORICO.....	5
2.1. Origen y distribución de la Noa (<i>Agave victoriae-reginae</i> T. Moore).....	5
2.2. Estudios sobre el tamaño poblacional de la Noa (<i>Agave victoriae-reginae</i> T. Moore).....	8
2.3. Características Botánicas y Taxonómicas de la Noa (<i>Agave victoriae-reginae</i> T. Moore).....	10
2.3.1. Hábitos reproductivos de <i>Agave victoriae-reginae</i> T. Moore.....	13
2.4. Estudios sobre conservación de Noa (<i>A. victoriae-reginae</i> T. Moore).....	13
2.5. Técnicas de cultivos de tejidos empleados en la propagación <i>in Vitro</i> en el genero <i>Agave</i>	15
2.6. Aspectos generales de la germinación.....	16
2.7. Letargo, Latencia y dormancia de la semilla.....	19
2.7.1. Factores que causan el Letargo en la semilla.....	20
2.7.2. Tratamientos para superar la latencia en semillas.....	22
2.7.3. Control de enfermedades de semillas germinadas.....	25
2.8. Aspectos germinativos y desarrollo <i>in Vitro</i> de Noa (<i>Agave victoriae-reginae</i> T. Moore).....	26
2.8.1. Porcentaje de germinación.....	26
2.8.2. Días de emergencia de la hoja cotiledonar.....	27
2.8.3. Días de aparición de la 1ª hoja verdadera.....	28
2.8.4. Organogénesis y embriogénesis somática.....	28
2.8.4.1. Embriogénesis somática.....	29
2.8.4.2. Perspectivas del uso de la embriogenesis en la propagación de especies en peligro de extinción.....	30
2.8.4.3. Organogénesis.....	31
2.8.4.4. Perspectivas de la aplicación de la organogénesis en la propagación de especies en peligro de extinción.....	32
2.8.5. Función de los reguladores de crecimiento en el cultivo de tejidos.....	32
2.8.5.1. Auxinas.....	33
2.8.5.2. Citocininas.....	34
2.8.5.3. Giberelinas.....	34
2.8.5.4. Otros reguladores.....	35

2.8.6.	Función de las vitaminas en el cultivo de tejidos.....	36
III.	MATERIALES Y METODOS.....	37
3.1.	Ubicación geográfica del experimento.....	37
3.2.	Estructura física.....	37
3.3.	Metodología.....	37
3.3.1.	Material vegetal empleado.....	37
3.3.2.	Etapa de germinación de semillas de <i>A. victoriae-reginae</i> T. Moore.....	37
3.3.2.1.	Preparación del medio de cultivo.....	37
3.3.2.2.	Procedimiento de siembra.....	38
3.3.3.	Etapa de inducción de brotes de plántulas desarrolladas de Noa (<i>A. victoriae-reginae</i> T. Moore.....)	39
3.3.3.1.	Procedimiento de trasplante o repicado.....	39
3.4.	Variables Evaluadas.....	40
3.5.	Tratamientos.....	40
3.6.	Siembra.....	41
3.7.	Repicado o Trasplante.....	41
3.8.	Diseño experimental.....	41
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	42
4.1.	Porcentaje de germinación.....	42
4.2.	Días de emergencia de la hoja cotiledonar.....	44
4.3.	Días de aparición de la 1ª hoja verdadera.....	46
4.4.	Formación de brotes adventicios.....	49
4.5.	Formación de callo.....	50
V.	CONCLUSIONES.....	53
5.1.	Porcentaje de germinación.....	53
5.2.	Emergencia de la hoja cotiledonar.....	53
5.3.	Aparición de la 1ª hoja verdadera.....	53
5.4.	Formación de brotes adventicios.....	54
5.5.	Formación de callo.....	54
5.6.	Recomendaciones.....	55
VI.	BIBLIOGRAFIA.....	56

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO	TÍTULO	PÁGINA
1.	Técnicas de cultivos de tejidos empleados genero <i>Agave</i>	17
2.	Resultados para el porcentaje de germinación de semillas de Noa (<i>A. victoriae-reginae</i> T. Moore) germinadas en medio de cultivo MS, con datos analizados individualmente, correspondiente a los tratamiento 1 y 2.....	42
3.	Análisis de varianza para el porcentaje de germinación de semillas de Noa (<i>A. victoriae-reginae</i> T. Moore) en medio de cultivo MS, con datos ordenados en un cuadro completamente al azar.....	43
4.	Comparación de medias para el porcentaje de germinación de semillas de Noa (<i>A. victoriae-reginae</i> T. Moore) germinadas en medio de cultivo MS, ordenado en un cuadro completamente al azar.....	44
5.	Resultados para los días que tarda en emerger la hoja cotiledonar de semillas de Noa (<i>A. victoriae-reginae</i> T. Moore) germinadas en medio de cultivo MS, con datos correspondientes a los tratamientos 1 y 2.....	44
6.	Análisis de varianza para los días que tarda en emerger la hoja cotiledonar de semillas de Noa (<i>A. victoriae-reginae</i> T. Moore) germinadas en medio de cultivo MS, ordenado en un cuadro completamente al azar.....	45
7.	Comparación de medias para los días que tarda en emerger la hoja cotiledonar de semillas de Noa (<i>A. victoriae-reginae</i> T. Moore) germinadas en medio de cultivo MS, ordenado en un cuadro completamente al azar.....	46

8.	Resultados respectivos para los días de aparición de la 1ª hoja verdadera en semillas de Noa (<i>A. victoriae-reginae</i> T. Moore) germinadas en medio de cultivo MS, con datos correspondientes para los tratamientos 1 y 2.....	46
9.	Análisis de varianza respectivo a los días en que aparece la 1ª hoja verdadera en semillas de Noa (<i>A. victoriae-reginae</i> T. Moore) germinadas en medio de cultivo MS, con datos ordenados en un cuadro completamente al azar.....	48
10.	Comparación de medias para los días en que aparece 1ª hoja verdadera en semillas de Noa (<i>A. victoriae-reginae</i> T. Moore) germinadas en medio de cultivo MS, con datos ordenados en un cuadro completamente al azar.....	48
11.	Resultados respectivos para la formación de brotes adventicios en plantas de Noa (<i>A. victoriae-reginae</i> T. Moore) desarrolladas en medio de cultivo MS modificado por Robert, con datos analizados, correspondientes para el tratamiento 1 y 2.....	49
12.	Resultados respectivos para la formación de callos en plantas de Noa (<i>A. victoriae-reginae</i> T. Moore) desarrolladas en medio de cultivo MS modificado por Robert, con datos analizados, correspondientes para el tratamiento 1 y 2.....	50

ÍNDICE DE FIGURAS	PÁGINA
Figura 1. Ubicación geográfica de las poblaciones de Noa (<i>Agave victoriae-reginae</i> T. Moore), limitada a los estados de Coahuila, Durango, Nuevo León, y escasamente Zacatecas.....	6
Figura 2. Planta de Noa (<i>Agave victoria-reginae</i> T. Moore) en su hábitat.....	13
Figura 3. Inflorescencia de Noa (<i>Agave victoria-reginae</i> T. Moore).....	13
Figura 4. Porcentaje de germinación de Noa (<i>A. victoriae-reginae</i> T. Moore).....	43
Figura 5. Días promedio de emergencia de la hoja cotiledonar de semillas de Noa <i>A. victoriae-reginae</i> T. Moore).....	45
Figura 6. Días de aparición de la 1ª hoja verdadera de Noa (<i>A. victoriae-reginae</i> T. Moore).....	47
Figura 7. Formación de brotes adventicios de plantas de Noa (<i>A. victoriae-reginae</i> T. Moore).....	49
Figura 8. Formación de callos de plantas de Noa (<i>A. victoriae-reginae</i> T. Moore).....	51

ÍNDICE DE ANEXOS	PÁGINA
Anexo A Preparación de Soluciones del medio M.S. modificado por Robert).....	60
Anexo B Asepsia de material.....	64
Anexo C Preparación del medio de cultivo (1 litro).....	69

AGRADECIMIENTOS

A DIOS: Por ser el ejemplo que me da motivos y razones día a día para poder vivir, ejemplo de sacrificio y de lucha, a ti señor doy gracias por permitirme estar en este mundo tan maravilloso.

A MIS PADRES: Miguel Ángeles Pérez y María Félix Valentín Rosas Por haberme brindado la dicha de la existencia. De igual manera al Sr. Luciano Mendoza Cortes por el gran apoyo que fue para mi y para mi familia en la ausencia de mi padre, el fue un gran ejemplo.

A MIS HERMANOS: Por ser los mejores amigos del mundo, y a sus sabios consejos, amistad y cariño gracias por todo.

A mi **ALMA TERRA MATER**, por darme la oportunidad de formarme como profesionista y el de poder convivir con mis compañeros "buitres".

Al MC. Héctor Montaña Rodríguez Por la confianza puesta en mi en la realización de este trabajo y compartir mis logros y mis esfuerzos con el.

A la MC. Amanda Jaramillo Santos, por su valioso apoyo en la realización de esta investigación, y brindarme su tiempo, confianza y dedicación en la realización de la misma.

A la Biol. Maria de Jesús Rivera G., por su apoyo y paciencia en la realización de este trabajo que sin su apoyo no hubiera sido posible su culminación.

A mis compañeros de Generación: Mario, Jorge Luis, Filiberto, Horacio, Cesar, Juan, Andrés y Emiliano gracias por brindarme su valiosa amistad, mis mejores deseos para todos ustedes y que tengan éxito siempre.

A mis amigos y compañeros: Miguel, Minerva, Jimarez, May, Fray, Ramón, Elba, Elizabeth, Leo, Hector, por su gran amistad, y que en los momentos difíciles de mi vida siempre me demostraron que podía contar con ustedes.

A todos los Académicos y Administrativos de la Universidad por su gran apoyo e instrucción a lo largo de mi estancia educativa.

DEDICATORIAS

PARA MI HIJO: Raulito, por ser el motor que me da vida, y que así como el crece, mi amor por el será de la misma manera.

A MI ESPOSA: Inés Mendoza, para ti mi cielo que siempre has sido mi mejor apoyo, y que hemos compartido la gran dicha de ser padres de un hijo tan maravilloso fruto de nuestro gran amor, quien lo diría, pero lo importante es que TE AMO.

A MIS PADRES: Sr. Luciano Mendoza Cortes y Maria Félix Valentín Rosas, Por inculcarme todos los valores éticos y morales, gracias por todos los sacrificios y desvelos que pasaron, para que yo su último hijo lograra su sueño, gracias madre por darme la oportunidad de vivir en tu vientre y brindarme el amor que solo tu puedes dar, gracias por estar siempre conmigo, mi eterno amor es para ustedes.

A MIS ABUELITOS: Manuela +, Emiliano +, Guadalupe + y Enrique +, por hacer de mi infancia el niño mas afortunado, por compartir sus sabios consejos, y que desde el día en que se tuvieron que ir me han hecho tanta falta, pero donde quiera que se encuentren quiero que sepan que siempre han estado en mi corazón, y que sé con seguridad que algún día estaremos nuevamente juntos, que Dios los bendiga y los guarde en su gloria.

A MIS HERMANOS: Arturo y Miguel, por el valioso apoyo moral y económico que me brindaron. El cual sin ustedes no hubiera sido posible la culminación de mis estudios profesionales, pero mas que esto quiero decirles que los Quiero.

A MIS PRIMOS: David, Cesar, Juanita, Nallely, Isabel, Analis, Samantha, Yosimar y Edwin, Por estar siempre a mi lado apoyándome en las buenas y en las malas, y compartiendo todos aquellos momentos de alegría y sobre todo su valiosa amistad.

A MIS TIOS: Faustino, Flora, Juan, Benigna, Mauricio, Luisa; por sus sabios consejos, amistad, que dios los bendiga a ustedes y a su familia siempre.

A LA FAMILIA MENDOZA: Por todos aquellos momentos de convivencia, risas y alegrías, y sobre todo por haberme permitido ser parte de su familia.

I. INTRODUCCIÓN

Las técnicas de cultivo de tejidos ofrecen la posibilidad de multiplicar masivamente a aquellos genotipos valiosos, que pueden ser utilizados tanto para el establecimiento de plantaciones clonales como para la recuperación de zonas devastadas, cuyo uso fue sustituido por la inconsciente modernización de las áreas naturales, en sitios de urbanismo poblacional e industrial.

Algunas especies del genero *Agave* han respondido a la propagación *in Vitro* ya sea por medio de embriogénesis somática u organogénesis, tal ha sido el caso de *A. fourcroydes*; *A. tequilana*, Weber; *A. atrovirens*.

El objetivo de este trabajo es establecer una metodología de propagación *in Vitro* de Noa (*A. victoriae-reginae* T. Moore) que permita mejorar su producción, rescate y conservación, que sirva de base para estudios futuros en biotecnología forestal para zonas áridas.

La distribución de la especie en la Comarca Lagunera es poco conocida, se tienen reportes muy escuetos de algunas regiones muy específicas y se han reportado poblaciones muy pequeñas.

El determinar regiones que sean los bancos de germoplasma permitirá la multiplicación de esta especie y con ello evitar el saqueo de la especie por el hombre.

La presente investigación pretende lograr a corto plazo la producción de Noa *Agave victoriae-reginae* T. Moore, utilizando elementos biotecnológicos como el cultivo de tejidos bajo la técnica M.S. (Murashige y Skoog) modificado por Robert. La finalidad de la investigación es buscar alternativas que coadyuven a la reintegración de esta especie amenazada a los sitios de origen, o bien a reservas naturales, con el propósito de perpetuar la especie cuya distribución es limitada, y se considera en peligro de extinción en México.

1.1 Planteamiento del problema.

Existen elementos naturales (flora), delicados o susceptibles que justifican plenamente la protección estricta, ya que es imposible mantener su viabilidad de otra manera, pero que pueden coexistir de manera estrecha con la producción, hay formas de aprovechamiento de los recursos biológicos de manera diversificada y sostenible.

La falta de aprovechamiento de los recursos naturales en los desiertos del centro norte de México es patente, solamente los procesos agrícolas y ganaderos son aplicados y requieren de gran inversión económica.

La explotación y aprovechamiento de recursos forestales no maderables es escasa o nula, es por eso, que se plantea el aprovechamiento racional de diversos recursos como las agavaceas, cactáceas, leguminosas, crasuláceas como plantas de ornato por medio de una producción por semilla y por cultivo de tejidos.

Esto es una alternativa para tener ingresos económicos en las comunidades rurales de la Comarca Lagunera, la posibilidad de aprovechar los recursos que tienen a su alrededor y que no son apreciados como recursos naturales explotables.

En México hay interrelación entre la conservación de los recursos naturales (biodiversidad) y la producción, que ha tenido mucho éxito y es el ecoturismo.

En el aspecto de la explotación de recursos bióticos naturales a través de la producción en la región norte del país (zonas desérticas), no ha tenido los dividendos esperados en proyectos como el orégano, candelilla, lechuguilla, o guayule, que no han resuelto los problemas económicos de las comunidades.

Es necesario buscar nuevas alternativas de recursos bióticos, la producción de especies de plantas que puedan manejarse fácilmente y que tengan demanda de mercado, que no sean de temporada y que su producción sea continua.

1.2. Justificación.

La noa (*Agave victoriae-reginae* T. Moore) es considerada una especie en peligro de extinción, la región de la Comarca Lagunera tenía a principios del siglo XX una extensa población de esta especie y fue desapareciendo por el exceso de su explotación, la demanda de ella como alimento fue el principal uso del recurso.

La especie se considera como endémica de la región centro norte del país y su distribución se delimita a tres estados; Coahuila, Durango y Nuevo León.

El hábitat tan especial de la especie con una pendiente geomorfológica de 60 a 90 grados y su sustrato calcáreo en las hendiduras de las rocas, la aleja de predadores naturales, ya que es una especie carnosa, suave, con una espina.

Además el ciclo de vida o de reproducción es muy amplio, algunos autores hablan de 15 a 20 años para llegar a su madurez sexual y su reproducción es única.

México es considerado uno de los países con mayor diversidad de especies silvestres, privilegio que comparte con naciones de América latina, África y Asia. Sin embargo la biodiversidad es un factor que depende de otros factores que conllevan a la modificación y destrucción del hábitat, debido a la necesidad de utilizar nuevas áreas dedicadas a la producción agropecuaria, extracción minera, la urbanización, el desarrollo y la recolección de plantas y semillas de especies silvestres (Orozco, 1995).

La desaparición de especies silvestres avanza a un ritmo acelerado día a día, exigiendo la aplicación de acciones globales, regionales, y locales para

disminuir el impacto de las actividades humanas sobre el ecosistema (García, Mendoza, 1995).

Es necesario implementar acciones que vayan encaminadas en la aplicación de programas de desarrollo y estrategias para la conservación de la biodiversidad del país (Mistretta, 2002). El rescate de especies de interés comercial es una de las líneas prioritarias de la biotecnología como herramienta básica para apoyar a la perpetuación de especies endémicas en el norte de México, y de esta forma elevar la tasa de multiplicación, para poder colaborar en los programas de conservación de áreas con grandes problemas de deforestación, e integrarlas al desarrollo del país como una fuente de equilibrio del ecosistema natural (Nóbel, 1985).

La noa (*Agave victoriae-reginae* T. Moore) tiene un gran interés comercial en el estado de Coahuila por ser una especie ornamental en peligro de extinción, al igual que muchas otras amenazadas por la irracionalidad del hombre (Eguiarte *et. al*, 2001).

Las regiones de los desiertos del Norte de México, se caracterizan por su gran diversidad de especies y endemismos de plantas perennes, las cuales abarcan a la Familia *Agavaceae*. Estas representan un componente ecológicamente importante de estos ecosistemas. El 75% (198) de las especies de *Agave* se encuentran en México, el 55% son endémicas y muchas de ellas se encuentran en peligro de extinción (Eguiarte *et. al*, 2001).

1.3. Objetivos.

Producción *in Vitro* de Noa (*Agave victoriae-reginae* T. Moore) por medio de semilla en medio de cultivo M.S. (Murashige y Skoog) modificado por Robert.

Determinar si existe influencia del remojo de la semilla, que aumente el porcentaje de germinación y disminuya el tiempo de la misma.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Origen y distribución de la Noa (*Agave victoriae-reginae* T. Moore).

La Noa (*Agave victoriae-reginae* T. Moore), nombrada así por Thomas Moore en el año de 1875, cuyo nombre fue asignado en honor a la Reina Victoria de Inglaterra y tiene su centro de origen en México, debido a que aquí se encuentran distribuidas la mayoría de especies de este género, su distribución geográfica natural se extiende al norte hasta el suroeste de los Estados Unidos de Norte América y al sur hasta Nicaragua (Gentry, 1982).

La Noa (*Agave victoriae-reginae* T. Moore) (Agavaceae) es una especie endémica de México, en peligro de extinción, localizada en los estados de Coahuila, Durango y Nuevo León, entre los 100° y 104° longitud oeste y 25° y 27° latitud norte (Figura 1), en localidades muy específicas debido a que crece en afloramientos de carbonato de calcio sobre paredes verticales.

El factor principal que ha alterado las poblaciones silvestres de Noa (*A. victoriae-reginae* T. Moore) es la colecta de plantas con fines comerciales por ser una especie de tipo ornamental, que alcanzan altos valores en el mercado nacional e internacional.

Por su endemismo y su crítica situación ha sido catalogada en peligro de extinción por las autoridades del país (Gentry, 1982).

Población No. 1. (Cañón Huasteco, entre Nuevo León y Coahuila). A lo largo de 35 Km del cañón Huasteco se encuentra distribuida la Noa *A. victoriae-reginae* T Moore, establecida en su parte alta, en los afloramientos de carbonato de calcio. Por tales dimensiones esta población es considerada la más grande.

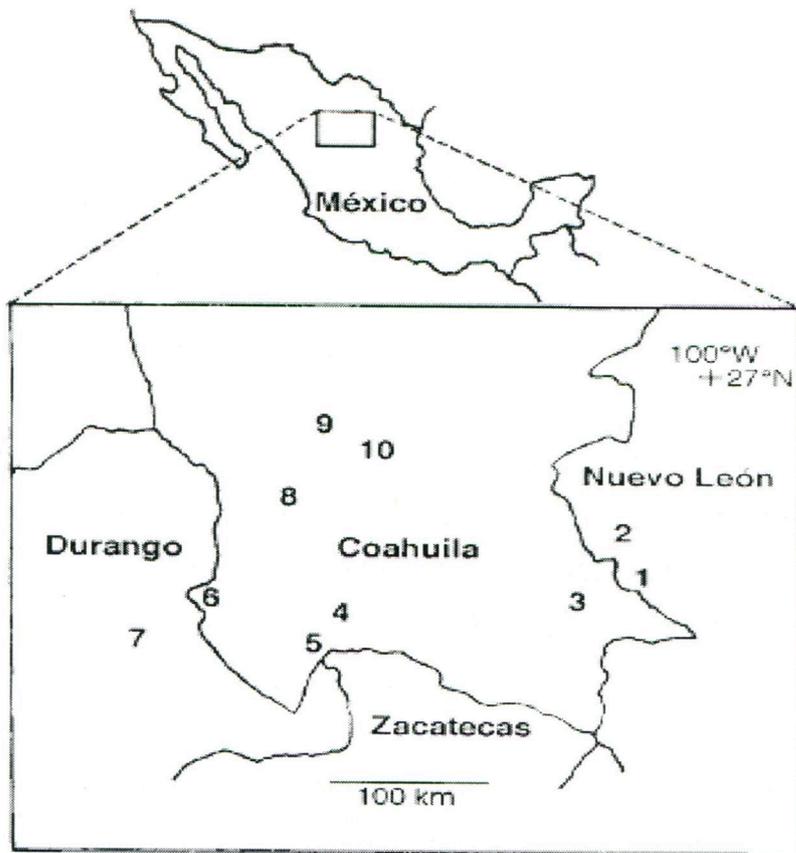


Figura 1. Ubicación geográfica de las poblaciones de Noa (*Agave victoriae-reginae* T. Moore), limitada a los estados de Coahuila, Durango, Nuevo León, y escasamente Zacatecas.

Población No. 2. (Mina, Nuevo León). Ubicada en el extremo E, Km 38 en la carretera Monterrey-Monclova, junto al poblado La Mina. Es una pequeña Sierra de aproximadamente 4 Km de largo, con afloramiento de roca de carbonato de calcio a lo largo de ésta, lo que permite el establecimiento de la planta en estudio.

Población No. 3 (Loma Landeros y Loma Alta, Coahuila.). Al E y NE de la ciudad de Saltillo, forma parte del valle con suelo accidentado. Es para este estudio la localidad con distribución de plantas de *A. victoriae-reginae* sobre lomeríos con suelos muy erosionados, constituido por fragmentos de rocas de carbonato de calcio y rocas de canto rodado, vegetación rosetófila constituida principalmente de *Agave lechuguilla*. Se localizan 5 estaciones de pocos individuos cada una, la mayor de ellas presenta una superficie aproximada de 1,200 m².

Población No. 4 (Sierra de Parras, Coahuila.) En la Sierra de Parras, se localiza un pequeño Cañón donde se distribuye el agave en estudio, se informa que a lo largo de la sierra existen 3 localidades. El tamaño de esta población es de aproximadamente 500 m². Localizada en una cara del cañón con orientación hacia el NE. Esta población presenta una separación física de más de 40 Km con la población No. 5 (Sierra el Mármol), dividida por una gran planicie denominada Bajío Los Llanos.

Población No. 5 (Ahuichila, entre Coahuila y Zacatecas). Localizada al Sur de Viesca, Coahuila. Hacia el poblado de Ahuichila, existe la Sierra el Mármol con aproximadamente 5 Km de afloramiento de paredes de carbonato de calcio donde se localiza, es la población más al Sur, ubicada entre los límites de los estados de Coahuila, Durango y Zacatecas.

Población No. 6 (Sierra de las Noas, Coahuila.). Crece a lo largo de 1.5 Km, sobre afloramiento de paredes de roca de carbonato de calcio en un pequeño cañón. La población más cercana es la No 7 y existe una distancia entre ambas de un poco más de 5 Km.

Población No. 7 (Sierra el Mulato-Cañón de Fernández., Durango.). Es la segunda población más grande, la presencia de plantas de agave se ubica a lo largo de 16 Km, sobre paredes de carbonato de calcio. Es la población más al Oeste de las que aquí se reportan, ubicada en el estado de Durango.

Población No. 8 (Sierra las Delicias, Coahuila.). Crece en paredes de carbonato de calcio, que aflora a lo largo de 4 Km de la Sierra con el nombre Delicias.

Población No. 9 (Sierra la Fragua, Coahuila.). Crece en un pequeño cañón, aproximadamente 200 m de longitud al igual que en los casos anteriores, crece sobre paredes con afloramientos de carbonato de calcio.

Población No. 10 (Sierra el Granizo, Coahuila.). Crecen en un pequeño cañón, en el cual aflora 1 Km de paredes de carbonato de calcio, las paredes de baja altura (10 m de altura). Es la ubicación más al N hasta el momento reportada para esta investigación.

Otras localidades, en Coahuila. Por varias fuentes se informa de la presencia de plantas en una pequeña localidad de la Sierra de la Paila, se tienen reportes por los habitantes de la zona, que existe una pequeña distribución al Sur de la Sierra Los Alamitos a la altura del Estanque del León. Es posible que la distribución de plantas pueda llegar hasta la Sierra San Julián, Zacatecas, aunque es muy probable que sean distribuciones con poca representatividad. Dentro del triángulo que forman la población No 1 al Este, la No. 7 al Oeste y la No. 10 al Norte, es posible encontrar localidades pequeñas en pequeños cañones de las diferentes Sierras, la característica necesaria es que en ellos se presenten paredes de carbonato de calcio con las características antes mencionadas. Gentry (1982), reportó sus zonas de colecta, dos en la población uno, una en la población tres, una en la población cinco y una en la población siete.

Como es de observarse en el mapa anterior, en la Comarca Lagunera se localizan al menos cuatro sitios con poblaciones nativas de esta especie, No. 4, No. 5, No. 6, y No. 7.

2.2. Estudios sobre el tamaño poblacional de la Noa (*Agave victoriae-reginae* T. Moore).

Especie endémica del desierto Chihuahuense, existen únicamente 10 poblaciones distribuidas en los estados de Coahuila, Durango y Nuevo León Martínez (2002) presenta distribución discontinua en forma de islas con poblaciones pequeñas, mencionan que *A. victoriae-reginae* T. Moore, tiene un bajo nivel de clonación, la especie se reproduce únicamente por semilla (Eguiarte, *et. al.*, 2001).

El área de distribución de *A. victoriae-reginae* T. Moore esta restringida a tres cuadros de 1° de latitud por 1° de longitud, que representan, en teoría, una superficie de 30 000 km², lo que la convierte en una especie microendémica. García y Mendoza (2001), utilizaron isoenzimas para analizar la estructura genética de 10 poblaciones, encontrando que *A. victoriae-reginae* muestra altos niveles de variación y diferenciación entre poblaciones, lo que de acuerdo con los autores sugiere que la deriva génica no ha jugado un papel importante en la evolución de la especie y el flujo genético entre las poblaciones es muy limitado, además encontraron que existe una reducida endogamia dada posiblemente por la eficiencia de la polinización.

Martínez (2002), estimó la estructura de tamaños, la densidad de población y el tamaño de las poblaciones, la producción de semillas por la planta en campo y el porcentaje de germinación, incluyendo producción *in Vitro* de plantas a partir de cultivo de semillas y tallos provenientes de plántulas generadas por semillas. Los resultados del análisis de distancias genéticas y geográficas de las poblaciones del este, centro, y oeste, muestran que las del este y oeste están más relacionadas.

Martínez (2002) determinó el tamaño de las poblaciones, encontrando que los grupos del centro son más pequeños; la densidad promedio es de 0.47 ind/m², la población más grande se estimó con un total de 574 000 individuos con una densidad de 0.70 ind/m² y la población más pequeña con 864 individuos, el porcentaje de reproductores general estimado fue de 0.00131 reprod/m²; la producción de semilla por planta reproductiva es alta, con un promedio superior a 50 000 sem/pl, y el porcentaje de germinación arriba del 90%.

Eguiarte *et. al.* (2001), concluyen que entre mayores niveles de variación genética presente una población, es más valiosa, por lo que la diversidad filogenética es un recurso valioso en la toma de decisiones sobre la conservación.

2.3. Características Botánicas y Taxonómicas de la Noa (*Agave victoriae-reginae* T. Moore).

La fisonomía del paisaje mexicano de muchas de las zonas áridas y semiáridas, es notable y vistosa, por la presencia de extensas comunidades donde destacan diversas formas biológicas, principalmente de especies de *Agave*, como elementos perennifolios y característicos del matorral xerófilo (Mitton y Grant, 1994).

La familia Agavaceae fue propuesta por Endlicher en 1841, quien la formó tomando como tipo nomenclatura al género *Agave*. Sin embargo, no fue hasta la publicación de Hutchinson en 1964 que se les tomó en cuenta y a partir de esa fecha, ha levantado una serie de controversias tanto sobre su validez, como sobre su circunscripción genérica (García y Mendoza, 2001).

El aprovechamiento de los Agaves ha sido importante en el desarrollo humano de zonas áridas y semiáridas de México. Como fuente de alimento, las partes comúnmente utilizadas son los tallos y las bases de las hojas, las cuales son ricas en carbohidratos, en las zonas rurales se consumen como un complemento a la dieta mientras que en las ciudades son golosinas. El líquido que produce, rico en azúcares, vitaminas y minerales se aprovechan en forma simple como aguamiel o se transforma en otras bebidas vía fermentación (pulque) o destilación (bacanora, mescal o tequila).

Las fibras de las hojas han sido utilizadas desde tiempos prehistóricos y junto con las bebidas han sido la forma más común de uso, sin embargo, también se han usado como planta medicinal, ornamental, ecológica para evitar la erosión de terrenos inclinados, para envolver otros alimentos, para limpieza, etc. Por todo lo anterior los agaves siguen siendo actualmente para las poblaciones rurales “el árbol de las maravillas” (Mitton y Grant, 1994).

Entre las especies de agave mas utilizadas destacan; *A. atrovirens*, maguey pulquero; *A. fourcroydes*, henequén; *A. lechuguilla*, *A. sisalana*, sisal; *A. tequilana*, agave azul; y muchas otras que en menor escala se utilizan como productoras de fibra o bebidas (Sánchez, 1996).

Agave es un termino derivado de una palabra griega que significa "admirable", corresponde al nombre genérico de plantas rizomatosas prolongadas en un tallo erguido, con hojas radicales o apicales, generalmente fibrosas. El escapo terminal o inflorescencia es a veces vigoroso, con flores diversamente dispuestas de perianto tubular inicialmente y que luego se amplia en lóbulos erguidos provistos de estambres fijos en su base y mas largos que ellos; ovarios triloculares, multiovalados; capsula loculicida, coronada al principio por el perianto resistente, semillas negras aplanadas o comprimidas (Conzatti, 1989).

Posición taxonómica de *Agave victoriae-reginae* T. Moore (Gentry 1982).

División:	Angiospermae
Clase:	Liliopsida
Subclase.	Liliidae
Orden:	Asparagales
Familia:	Agavaceae
Subfamilia:	Agavoidae
Genero:	Agave
Subgénero:	Littaea
Grupo:	Marginatae
Especie:	<i>A. victoriae-reginae</i> T. Moore (1875)
Sinonímias:	<i>Agave consideranti</i> Carr. (1875) <i>Agave fernandi-regis</i> Berger (1915) <i>Agave nickelsii</i> R. Grosselin (1895).

Descripción taxonómica Gentry (1982). Planta variable pequeña, compacta, sola a cespitosa, tallos cortos sin ramificaciones. Hojas cortas, verdes con líneas blancas, conspicuas, estrechamente imbricadas, de 15-20 cm de largo (menos de 25 cm x 4-6 cm de ancho), línea ovalada, redondeada en el ápice, rígida, gruesa, plana a cóncava en la parte alta, redondeada a afilada en la parte inferior de la quilla; margen blanco, endurecido, sin dientes, 2-5 mm de ancha, continua hasta la base; espinas terminales 1-3, 1.5-3 cm de longitud, triangular-cónica, tubuladas, muy anchas en la base, con una ranura ancha en la parte superior, quilla negra, redondeada en la parte inferior. Inflorescencia espigada, 3-5 m de alto, erecta. Flores de manera densa de la mitad hacia el ápice, el pedúnculo con brácteas cartáceas, flores en pares o triadas, sobre pedicelos cortos de 40-46 mm de longitud, con diversos colores, los tépalos y estambres frecuentemente matizados de rojo a púrpura. Tépalos de 18-20 x 5-6 mm, lineares, apicalmente redondeados, extendidos, los filamentos cerrados al termino de la antitesis y erectos, el inferior fuertemente aquillado. Estambres con filamentos de 45-50 mm de longitud, insertados sobre un tubo circular; anteras 18-21 mm de longitud, fusiforme, con cuello corto, tubo poco profundo, extendido, 3 x 8-10mm; frutos ovoides a oblongas, de 17-20 x 10-13 mm, redondeadas en la base, apiculadas. Semillas 3-5 x 3.5 mm, hemisféricas a lacrimiformes, afilada sobre las caras, el margen alado.

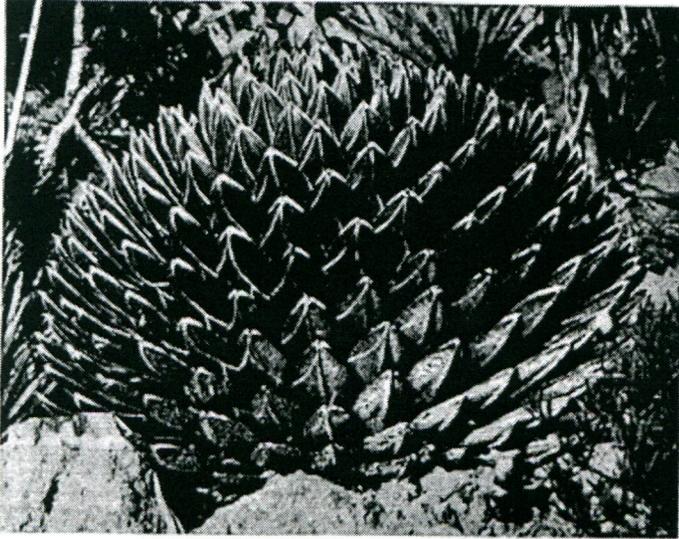


Figura 2

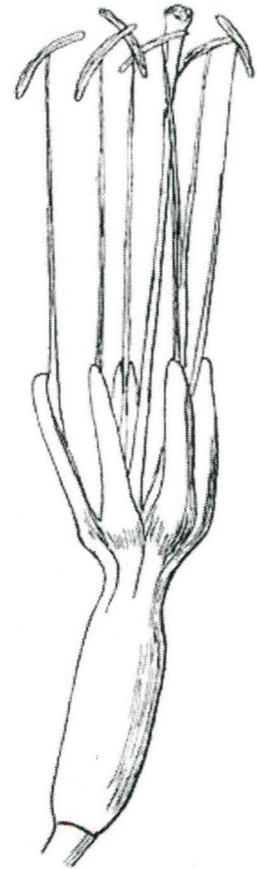


Figura 3

Figura 2. Planta de Noa (*Agave victoria-reginae* T. Moore) en su hábitat.

Figura 3. Inflorescencia de Noa (*Agave victoria-reginae* T. Moore).

2.3.1. Hábitos reproductivos de *Agave victoriae-reginae* T. Moore.

Debido a que el ciclo de vida o de reproducción es muy amplio, que va de 15 a 20 años para llegar a su madurez sexual y su reproducción es única, esta se lleva a cabo raramente mediante propágulos de los estolones, y también por medio de semillas siendo este último el más importante (Vázquez, 1990).

2.4. Estudios sobre conservación de Noa (*A. victoriae-reginae* T. Moore).

Revisiones bibliográficas muestran que existen pocas investigaciones en relación a la noa (*A. victoriae-reginae* T. Moore), y no existen estudios sobre su genética y ecología que determinen el estado de alteración de las poblaciones silvestres.

Los reportes que sitúan a la especie en cierto peligro de extinción, citan una distribución geográfica restringida, decomisos y registros de colecta que se han hecho hasta la década pasada, enlistando gran cantidad de plantas silvestres mexicanas, exportadas por la frontera norte, entre las cuales se encuentran agaves como el de Noa (*A. victoriae-reginae* T. Moore) y de igual forma se hace con otras especies endémicas mexicanas de las familias Cactaceae, Cycadaceae, Orchidaceae, Euphorbiaceae, etc. Que tienen una elevada demanda en el mercado internacional (Martínez P. 1991).

La reducción y fragmentación de la población de una especie causa pérdidas de la variabilidad genética, con la consecuente disminución de la adaptabilidad a los cambios y por lo tanto de su potencialidad para sobrevivir al efecto de las alteraciones del ambiente (Vázquez, 1990).

La conservación efectiva de germoplasma requiere de la interacción del conocimiento acumulado de varias tecnologías combinadas en estrategias integradas (Fay, 1994). Todas las estrategias pueden ser válidas y deben ser exploradas, siempre que estas acciones no pongan en peligro a la propia naturaleza o a la especie (Vázquez, 1990).

En las últimas décadas se han empleado métodos de análisis genéticos y de demografía, los cuales han permitido conocer el estado en que se encuentran las poblaciones vegetales amenazadas. Análisis electroforéticos pueden ayudar a determinar los niveles de variación que se presentan dentro de una especie (Eguiarte *et. al.*, 2001), y los estudios demográficos hacen posible conocer la dinámica de la población. Esta información puede ayudar a dirigir programas para la conservación *in situ* y *ex situ* y el futuro aprovechamiento de especies amenazadas (Eguiarte *et. al.*, 2001). Cada vez es más evidente que aún cuando un hábitat esté protegido, las poblaciones pueden desaparecer debido a su fragmentación o a otros factores que han alterado a tal grado la dinámica del ecosistema que el hábitat ha dejado de ser apropiado para un taxón dado.

En tal situación puede ser esencial llevar a cabo repetidas introducciones de genotipos conocidos hasta que las condiciones ecológicas adecuadas para su supervivencia sean entendidas y manipuladas. En este caso resulta importante contar con un banco de semillas y más aún si ha sido posible, diferenciar los genotipos almacenados (Vázquez, 1990).

Asimismo la micropropagación por cultivo de tejidos puede ofrecer mayores ventajas sobre las técnicas convencionales. En la última década las técnicas *in Vitro* se han utilizado para el rescate de especies en peligro de extinción con el objeto de lograr una rápida multiplicación de individuos libres de patógenos. Un gran número de regenerantes puede producirse a partir de pequeñas cantidades de material inicial, en algunos casos, tan pequeña como una yema o una semilla y llegar a clonar individuos y/o inducir variaciones genéticas bajo condiciones controladas (Wochok, 1999).

De antemano, se sabe que el tipo de respuesta morfogénica *in Vitro* puede ser factor de variación genética (Chakraborty, 1995).

2.5. Técnicas de cultivos de tejidos empleados en la propagación *in Vitro* en el genero *Agave*.

En cultivo de tejidos, las investigaciones del género *Agave* se han realizado con pocas especies (Cuadro 1). Los estudios se han orientado principalmente a especies de uso hortícola e industrial, con la finalidad de propagar masivamente clones de plantas seleccionadas en campo, que permitan establecer homogeneidad en los cultivos, resaltando las características de interés comercial, de las cuales, podemos citar la calidad y cantidad de fibra, desarrollo acelerado de las plantas entre otras características (Cuadro1). En el caso de las especies en peligro de extinción, las técnicas de cultivo *in Vitro* se presentan como una alternativa importante en la conservación de germoplasma y propagación de plantas y son una herramienta fundamental cuando los sistemas tradicionales no funcionan (Wochok, 1999).

Debido a los hábitos de crecimiento de las plantas del género *Agave*, las estructuras que han sido utilizadas para fines de micropropagación son hoja, tallo, yema lateral, rizoma o estolón; también en raros casos el uso de estructuras reproductoras como las semillas (Cuadro 1). El uso de reguladores del crecimiento auxinas y citokininas, han sido necesarios en la promoción de respuestas morfogénicas (Cuadro 1.). El medio de cultivo con mayor aplicación en micropropagación de agaves es el M.S. (Murashige y Skoog), como se expresa en los diferentes trabajos citados (Cuadro 1.)

2.6. Aspectos generales de la germinación.

La semilla esta formada por un embrión, con provisión almacenada de alimento en los cotiledones, rodeados por cubiertas protectoras. En la época en que la semilla se separa de la planta madre, su metabolismo se encuentra en un nivel muy bajo y no hay en ella señales de actividad de crecimiento. Durante la germinación de la semilla el metabolismo celular se incrementa, el embrión reanuda su crecimiento activo, las cubiertas de la semilla se rompen y emerge la plántula (Hartmann y Kester, 1996).

Para que la germinación se inicie, se deben de cumplir tres condiciones importantes:

Primera: La semilla debe ser viable, esto es que el embrión debe estar vivo y tener condiciones para la germinación.

Segunda: Las condiciones internas de la semilla deben ser favorables.

Tercera: La semilla debe encontrarse en las condiciones ambientales apropiadas. Los factores principales para la germinación son: humedad, oxígeno, temperatura y luz (Hartmann y Kester, 1996).

CUADRO 1. Técnicas de cultivos de tejidos empleados genero *Agave*.

Especie	Explant	Medio de cultivo	Combinación de reguladores de crecimiento	Morfogénesis	Literatura consultada
<i>Agave spp.</i>	Hojas			Callo	Hunault 1974*
	Segmentos de semilla	LS	2,4-D 0.2 +K 1.0	Brotos (OI)	Groenewald et al. 1977.
	Segmento de semilla	LS	2,4-D 0.2 +K 1.0	Nódulos embriogénicos, vía directa, plántulas	
<i>A. atrovirens</i> Kart.	Brote lateral			Brotos (OD)	Madrigal et al. 1981*
<i>A. fourcroydes</i> Lem.	Tallo, rizomas y hoja joven			Brotos (OI)	
	Rizoma	SH	2,4D 0.025 +BA 10.0	Brotos (OI)	
	Rizoma	MS	2,4D 0.025 +BA 10.0	Brotos (OD)	
<i>A. arizonica</i> Gentry & Weber	Base de hoja	MS	NAA 0.1 ó 1.0 +BA 10.0	Brotos (OI)	Powers & Backhaus 1989
<i>A. cantala</i> Robx.	Segmentos de nodo de estolón	MS	NAA 0.075 +IBA 0.1 + K 0.5	Brotos (OD)	Binh et al. 1990
<i>A. fourcroydes</i> <i>A. tequilana</i> , Weber <i>A. atrovirens</i>	Brote, tallo y segmento de semilla	MS	IAA 0.3 K 1.0	Brotos (OI)	Madrigal et al. 1990
<i>A. atrovirens</i> Kart. ex Salm.	Yemas laterales	MS	IAA 2.0 + K 1.0 + BA 1.0	Brotacion (OD)	Villalobos et al. 1991
	Cambium vascular	MS	IAA 1.0 + K 1.0	Brotacion (OD)	
<i>A. sisalana</i> Perr. Syn	Rizoma	SH	BA 5.0 o 10.0	Nódulos (embriones) vía directa. Plántulas	Das 1992.
	Hojas inmaduras	MS	BA 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 o 10.0	Sin respuesta	
<i>A. victoriae-reginae</i> T. Moore	Lamina foliar	MS	2,4-D 0.31	Embryogenesis directa	Rodríguez-Garay et al. 1996

Medios LS: Linsmair & Skoog; SH: Schenk & Hildebrandt, y MS: Murashige & Skoog; BA : 6-benzylaminopurine; K: Kinetin; IBA: Indole-3-butyric acid; 2,4-D: 2,4-dichlorophenoxyacetic acid; NAA: α -Naphthalenacetic acid; IAA: Indole-3 acetic acid; OD: Organogenesis directa; OI: Organogenesis indirecta; (*): citado por (Madrigal et al 1990).

1. El primer estadio de la germinación llamado imbibición es de rápida toma de agua. La absorción inicial de agua significa la imbibición de la misma por los coloides de la semilla y ocasiona hidratación del protoplasma. Como resultado de ello la semilla se hincha y sus cubiertas pueden romperse. Dado que la absorción de agua es un proceso físico, puede efectuarse en semillas no viables (Bidwell, 1983; Hartmann y Kester, 1996).

El oxígeno es necesario para la germinación de la semilla. El metabolismo durante los estadios iniciales de la germinación puede ser anaerobio, cambiando a aerobio tan pronto como la testa se rompa y el oxígeno se difunda en su interior (Bidwell, 1993).

Una temperatura adecuada es importante para la germinación de la semilla. La luz también es importante en la germinación de las semillas, sobre todo para las muy pequeñas (Bidwell, 1993).

La edad de la semilla también es un factor de importancia en la germinación, puesto que en realidad son pocas las semillas que pueden sobrevivir durante muy largo tiempo. Algunas son capaces de sobrevivir pocos días o semanas. Almacenadas a muy bajas temperaturas (congelación) o bajo condiciones anaerobias parece durar más tiempo. Sin embargo, parece que la baja absorción de oxígeno de las semillas es probablemente el resultado de procesos no metabólicos destructores, de lenta autooxidación (Bidwell, 1993).

La longevidad de la semilla es una de las características ecológicas de la planta como también las características morfológicas y bioquímicas. Las plantas leñosas de clima árido por ejemplo, se cree que tienen más larga vida que las plantas de hábitat tropical o de clima calido húmedo (Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, 1961).

2. El segundo estadio de la germinación comprende la movilización de una gran cantidad de reservas, como proteínas, grasas y almidón u otros carbohidratos para nutrir a la plántula en crecimiento, por lo que las enzimas digestivas deben activarse o sintetizarse, inmediatamente después de empezar la germinación. Al parecer las giberelinas son muy importantes en este proceso (Bidwell, 1993; Hartmann y Kester, 1996).

Otras hormonas implicadas son los inhibidores como el caso de ácido abscísico puede bloquear el estímulo de la giberelina para la germinación.

Las cotocininas, controlan la germinación probablemente a nivel de transpiración de DNA – RNA.

El etileno es posible que este implicado en la germinación de semillas de algunas plantas no leñosas (Bidwell, 1993; Hartmann y Kester, 1996).

3. El tercer estadio de la germinación de la semilla consiste en la división celular de los puntos de crecimiento separados del eje embrionario, seguida de la expansión de las estructuras de la plántula (Hartmann y Kester, 1996).

2.7. Letargo, Latencia y dormancia de la semilla.

Letargo puede definirse como el estado de crecimiento y metabolismo suspendidos. Puede ser impuesto por las condiciones desfavorables o desde dentro y controlado por mecanismos del tejido (Bidwell, 1993; Hartmann y Kester, 1996).

El letargo es un mecanismo de defensa contra las heladas invernales o la sequía prolongada y es una parte necesaria de la vida de muchas plantas. Debe ocurrir en el tiempo debido, es decir antes de que las condiciones adversas se presenten y sean de una intensidad letal (Bidwell, 1993). No obstante Freeman (1994), Nóbél (1991), Pritchard y Miller, (1995) mencionan que las especies de *Agave lechuguilla*, *Agave parry*, *Agave deserti* y *Agave americana* que se distribuyen en la región del desierto Chihuahuense al parecer no presentan dormancia en sus semillas.

2.7.1. Factores que causan el Letargo en la semilla.

Factores ambientales:

1. Exigencia de luz: Es un factor que impide la germinación de semillas pequeñas enterradas muy profundamente, tanto que agotaría sus reservas antes de alcanzar emerger y poder ser autótrofas. Muchas semillas no germinan bajo el dosel del bosque, por que la luz que llega al suelo es insuficiente para estimular la germinación (Bidwell, 1993; Raven y Curtís, 1985).

2. Temperatura: El tratamiento con bajas temperaturas es esencial para la germinación de muchas semillas y la alta temperatura puede ser inhibidora en el momento de la germinación. La fluctuación de las semillas del día y de la noche a veces da mejores resultados que las temperaturas constantes, tanto en la germinación de la semilla como en el crecimiento de la plántula.

Los requerimientos de un período frío impiden la germinación de semillas que han sido liberadas en verano o en otoño, en una época donde las plántulas tendrían pocas oportunidades de establecerse antes de que principiaran las condiciones desfavorables. En lugar de ello, las semillas quedan latentes durante el invierno y como resultado de ese tratamiento frío germinan temprano en la primavera siguiente teniendo toda la estación de crecimiento a su disposición (Ray, 1985).

3. Disponibilidad de humedad: La humedad proporcionada a la semilla en germinación, puede afectar tanto el porcentaje como la velocidad de germinación. Debido a su naturaleza coloidal, las semillas secas tienen un gran poder de absorción de agua dependiendo de la naturaleza de la semilla, la disponibilidad de agua en el medio circundante y de la temperatura (Hartmann y Kester, 1996).

Factores externos:

1. Testa de la semilla. Algunas cubiertas de la semilla son impermeables a la humedad (letargo de la cubierta de la semilla). En este caso la semilla no llega a absorber agua sino hasta que la cubierta es modificada por métodos naturales o artificiales (Hartmann y Kester, 1996).

Existen semillas con cubiertas, resistentes a la expansión del embrión lo cual puede ser un factor para retardar la germinación (Hartmann y Kester, 1996).

Factores internos:

1. Inmadurez del embrión: En algunas especies los embriones no se han desarrollado por completo morfológicamente al tiempo de maduración de la semilla y por lo común, tienen un crecimiento posterior de la semilla, después de haberse removido de la planta (Hartmann y Kester, 1996).

2. Presencia de inhibidores: Estas sustancias se producen durante el desarrollo del fruto y de la semilla y algunas de ellas se acumulan en el fruto, en las cubiertas de la semilla y en el embrión.

Una clase de inhibidores comprende a subproductos de procesos metabólicos cuya presencia puede ser incidental a un papel en la regulación de la germinación.

Otra clase incluye hormonas vegetales de ocurrencia natural que controlan no solo la germinación de la semilla sino el crecimiento y desarrollo de la planta en general (Hartmann y Kester, 1996).

Los inhibidores se pueden aislar de la mayoría de todas las semillas y de otras partes de la planta. El solo aislamiento de una sustancia química no prueba que ésta actué como inhibidor en la semilla (Merlín, 1993).

3. Concentración de etileno. Se ha demostrado que las semillas producen etileno durante el periodo de germinación y que el letargo puede romperse por medio del tratamiento con etileno (Bidwell, 1993).

2.7.2. Tratamientos para superar la latencia en semillas.

En condiciones naturales la tensión de cubierta o testa resistente se rompe gradualmente mediante la congelación y el deshielo, la lixiviación, el paso por el conducto digestivo de un animal o ciertas condiciones de iluminación y temperatura (Weaver, 1998).

Artificialmente se trata a la semilla mediante escarificación, que es cualquier proceso de rayado, ruptura o alteración mecánica de las semillas para hacerlas permeables al agua y a los gases, en la mayoría de las semillas de cubierta dura, la germinación se mejora con el tratamiento artificial adicional (Hartmann y Kester, 1996).

1. Tratamiento mecánico: Batiendo la semilla con arena o fregando las semillas sobre una tabla abrasiva. Debe hacerse la operación con mucho cuidado para evitar daños al embrión (Hartmann y Kester, 1996).

2. Tratamiento con agua: El propósito de remojar la semilla en agua es ablandar las cubiertas impermeables, y consiste en colocar las semillas de cuatro a cinco veces su volumen en agua caliente de 77° a 100°C. Se retira del fuego de inmediato y las semillas se dejan remojar en el agua hasta que se enfríe gradualmente durante 12 a 14 horas (Hartmann y Kester, 1996).

Al respecto, Raven y Curtis (1985) mencionan que las semillas de algunas especies desérticas germinan solamente cuando ha caído suficiente agua de lluvia para arrastrar los inhibidores químicos del endospermo; la cantidad de agua necesaria para llevarse estos inhibidores es suficiente para que la planta complete su ciclo biológico.

3. Tratamiento químico: Se escarifican pequeñas muestras de semilla con buenos resultados sumergiéndolas durante 12 horas en alcohol etílico absoluto. Para grandes lotes de semillas se recomienda frecuentemente un tratamiento con ácido sulfúrico concentrado (98%), si se determina previamente la duración del empapado en el ácido. Se atribuye el aumento de la germinación debido al tratamiento con ácido sulfúrico, se debe a un ablandamiento de la cubierta de la semilla por oxidación, aumentando la permeabilidad del aire y agua a través de la envoltura de la semilla (Hartmann y Kester, 1996).

4. Combinación de dos o más tratamientos de pregerminación: La combinación de escarificación mecánica, escarificación con ácido o remojo en agua caliente seguido por enfriamiento en húmedo es efectiva para semillas que tienen un tegumento duro, impermeable y un embrión latente (Merlín, 1993).

5. Estratificación: Las semillas de zonas frías requieren de ser enfriadas en condiciones de humedad durante un periodo después de la maduración aparente, si se requiere que germine con vigor. Las prácticas comunes de satisfacer estas condiciones artificialmente es utilizando temperaturas que varían de -1° a -2°C de uno a varios meses, según sea la especie (Merlín, 1993).

Baskin y Baskin (1990) mencionan que estudios de laboratorio han podido demostrar que la estratificación es necesaria para romper la dormancia en semillas de *Agave virginica*. Esto sugiere que este tratamiento es necesario para que la especie complete su ciclo de vida en las regiones geográficas en las que habita. La temperatura de estratificación debe ser de 0° a 10°C durante seis semanas o más, para poder alcanzar un 94% de germinación.

6. Control de la temperatura durante la germinación: La alternancia diaria de temperatura es efectiva para estimular la germinación de semillas recién cosechadas de muchas especies.

Las temperaturas óptimas son aquellas más favorables para la germinación. Estas quedan en la gama en que se obtiene el mayor porcentaje de plántulas con la mayor velocidad de germinación. Las temperaturas óptimas de germinación para la mayoría de las plantas fluctúan entre 26.5° a 35°C (Hartmann y Kester, 1996).

Bassin y Baskin (1990). Freeman (1994), Nóbél (19891), al germinar semillas de *Agave virginica*, *Agave lechuguilla* y *Agave deserti*, obtuvieron los mas altos porcentajes de germinación, los cuales fluctuaron de 94% a 95% de 7 a 8 días a temperaturas de 25° a 30°C. Sin embargo Miller (1995) al germinar semillas de *Agave parry* y *Agave americana* a temperaturas de 20° a 25°C con 80% en 7 y 20 días respectivamente.

Agüero (1994) encontró que las semillas de *Agave victoriae-reginae* T. Moore al ser germinadas a temperaturas de 20°C obtienen que aquellas que fueron colectadas durante el otoño e invierno, presentan un porcentaje mayor en la germinación de 95% a 97% respectivamente, en un tiempo de 7 días.

Las combinaciones usuales de temperatura son de 15° a 30°C y de 20° a 30°C manteniendo las semillas a las temperaturas más bajas durante 16 horas y las temperaturas más altas durante 8 horas. Estas condiciones son partes del ambiente normal de una estación del año (Hartmann y Kester, 1996).

6. Estimulantes químicos. Tienen una actividad significativa en la fisiología de las semillas. El ácido giberélico estimula la germinación en ciertas semillas, estimula el crecimiento de las plántulas, aumenta la velocidad de germinación (Hartmann y Kester, 1996).

Las citocininas parecen ser activas para estimular la germinación de cierta clase de semillas, pueden estimular la germinación y superar la latencia por temperatura elevada de ciertas semillas como la de lechuga (Hartmann y Kester, 1996).

Muchas semillas latentes recién cosechadas germinan mejor después de un remojo en solución de nitrato de potasio. Las semillas se colocan en charolas de germinación o en cajas de petri y el sustrato se humedece en una solución de nitrato de potasio al 0.2% (Hartmann y Kester, 1996).

7. Exposición a la luz. Pueden estimular la germinación de muchas semillas dependiendo de la clase, edad, manejo previo y temperaturas acompañantes. La sensibilidad a la luz es más fuerte de inmediato después de la cosecha y tiende a desaparecer con el almacenamiento en seco.

La luz debe proporcionársela lámparas fluorescentes de luz blanca fría con una intensidad no menor de 75 a 125 bujías (800 a 1345 lux) cuando menos durante 8 horas diarias (Hartmann y Kester, 1996).

2.7.3. Control de enfermedades de semillas germinadas.

Con lo que respecta a control de enfermedades durante la germinación Hartmann y Kester (1996) señalan lo siguiente:

El ahogamiento causado por ciertos hongos principalmente *Pythium ultimum* y *Rhizoctonia solani*, se presentan durante varios periodos de la germinación de la semilla y del crecimiento subsecuente de la planta. Una forma de control es mantener buenas condiciones sanitarias en el área donde van a germinar las semillas. Cualquier planta podrida o enferma debe descartarse de inmediato.

Los tratamientos de semilla para controlar enfermedades son: desinfección y protección.

Los desinfectantes eliminan los organismos que están dentro de la semilla. Entre los tratamientos de este tipo se encuentra el agua caliente, el formaldehído y el vapor airado.

Los desinfectantes eliminan al organismo presente en la superficie de la semilla, por ejemplo el hipoclorito de sodio. Los protectores son materiales que se aplican a la semilla y que la protegen de hongos del suelo.

2.8. Aspectos germinativos y desarrollo *in Vitro* de Noa (*Agave victoriae-reginae* T. Moore).

2.8.1. Porcentaje de germinación.

Raven y Curtís, (1985) mencionan que las semillas de agaves de porte pequeño tienden a perder viabilidad mucho más rápido que las grandes, debido a que el embrión es más susceptible a sufrir daños por factores ambientales.

Vázquez, (1990) en sus publicaciones sobre conservación de semillas señala la importancia que tiene la época de colecta de semillas de *A. victoriae-reginae* T. Moore, haciendo mención que las semillas colectadas en el mes de diciembre presentan mayor porcentaje de germinación de hasta el 95% con respecto a otras épocas de colecta.

Afirmando que en las épocas de frío las semillas se mantienen con mayor viabilidad, y que en las épocas de calor intenso la semilla sufre daños fisiológicos que limitan su potencial de germinación.

En (1998) Martínez realizando trabajos sobre germinación *in Vitro* de semillas de Noa (*A. victoriae-reginae* T. Moore) reportó porcentajes de germinación del 94% en semillas con remojo previo de 36 horas antes de la siembra.

Los altos porcentajes de germinación se obtienen cuando la semilla es sometida a algún tipo de estratificación y escarificación, Mistretta, (2002).

Pritchard y Miller, (1995) mencionan que la temperatura es un factor importante en la germinación alcanzando porcentajes de germinación de

semillas de Noa (*A. victoriae-reginae* T. Moore) del 90% al 96% a temperaturas de 23 a 25° C.

Agüero, (1994) determino que las semillas remojadas en agua de 12 a 40 horas antes de la siembra no implican efectos mayores en la germinación, pero si ayuda a romper el letargo de algunas semillas.

2.8.2. Días de emergencia de la hoja cotiledonar.

Eguiarte *et. al*, (2001) menciona que los días en que emerge la hoja cotiledonar de *A. victoriae-reginae* T. Moore ocurre entre los 11 y 17 días después de la siembra, a temperatura constante de 25° C. y con buena luminosidad.

Freeman, (1994) reportó días de emergencia de hoja cotiledonar de 13 y 15 días para semillas germinadas de *A. victoriae-reginae* T. Moore con 10 horas de remojo en alcohol etílico al 50% y semilla remojada con agua destilada durante 10 horas respectivamente.

El periodo de emergencia de semillas de *A. victoriae-reginae* T. Moore es 2 veces menor (7-9 días), en semillas germinadas *in Vitro* con respecto a las que germinan *in Vivo*. García y Mendoza, (1995).

Hartmann y Kester, (1996) realizaron estudios sobre conservación de especies del genero *Agave* y determinaron que los días a emergencia de la hoja cotiledonar son mas prolongados en semillas que presentan germinación menor del 86%,

Martínez (1998) menciona que los días a emergencia de semillas de Noa (*A. victoriae-reginae* T. Moore) germinadas *in Vitro* en un medio M.S. (Murashige y Skoog) oscila entre los 11 y 13 días después de la siembra.

La emergencia de semillas de Noa (*A. victoriae-reginae* T. Moore) ocurre a los 10.5 días si se aplica un tratamiento preegerminativo (remojo) con hipoclorito de sodio al 20% durante 6 horas antes de la siembra. Madrigal, (1990).

2.8.3. Días de aparición de la 1ª hoja verdadera.

En (1998) Martínez observó que la aparición de la 1ª hoja verdadera de semillas de Noa, ocurre a los 25 días después de la siembra en medio de cultivo M.S., en condiciones de temperatura de 27° C.

Agüero, (1994) afirma que en *A. victoriae-reginae* T. Moore la 1ª hoja verdadera aparece a los 21 días, cuando la semilla a seguido un tratamiento de remojo en agua destilada por un lapso de 30 horas.

Raven y Curtís, (1985) mencionan que algunas semillas de agaves de porte pequeño, desarrollan la 1ª hoja verdadera a los 37 días después de la siembra en condiciones libres al ambiente y con sustratos poco fértiles.

2.8.4. Organogénesis y embriogénesis somática.

El cultivo de tejidos se fundamenta en la potencialidad celular (Dodds y Roberts, 1982), por lo que teóricamente de cualquier parte de la planta se pueden regenerar nuevas plantas.

Sin embargo, el tipo y el estado fisiológico de fragmento de planta (explante) serán factores importantes en el estudio de regeneración y estabilidad genética (George, 1993). Tejidos y órganos inmaduros son generalmente los de mayor plasticidad morfo genética *in Vitro*, en relación a los tejidos, inmaduros, (Tisserat 1985).

Los componentes físico-químicos del cultivo de tejidos son también importantes a considerar para el adecuado desarrollo de los cultivos, entre los de mayor importancia en tomar en cuenta, se pueden citar a las sales minerales, la sacarosa como fuente de carbono, las vitaminas, aminoácidos, reguladores del crecimiento, pH, temperatura y la luz en cuanto a la intensidad, calidad y fotoperiodo, (Gamborg y Shyluk, 1991).

Las investigaciones en diversas especies han permitido la regeneración de un gran número de medios nutritivos, el más comúnmente usado es la formulación desarrollada por Murashige y Skoog (M.S.) en 1962, (Tisserat, 1985).

El cultivo de tejidos se puede enmarcar en dos vías de acuerdo al proceso de regeneración de las plantas, (Tisserat, 1985): (a) embriogénesis somática directa e indirecta, y (b) organogénesis que puede ser de forma directa, indirecta y la formación de plantas a partir de yemas axilares y meristemas apicales.

2.8.4.1. Embriogénesis somática.

La formación de embriones somáticos a partir de células, tejidos y órganos puede llegar a ocurrir de manera directa e indirecta, en gran parte por la acción inductora de auxinas como el 2,4-D y eventualmente citocininas, (George, 1993). La forma directa implica el desarrollo a partir de una célula o grupo de células directamente del tejido somático sin pasar por la fase de callo (masa amorfa de células). Entre los tejidos de más rápida respuesta se pueden citar a las células epidérmicas de tallo, explantes de embriones inmaduros, así como el tejido nuclear, aunque se reporta también de anteras y protoplastos, (Tisserat, 1985).

La embriogénesis indirecta consiste en el establecimiento en cultivo *in Vitro* de cualquier explante, la proliferación de callo y la subsecuente iniciación de estructuras proembrionarias donde participan una célula o un grupo de éstas. Prácticamente cualquier parte de la planta, como raíz, hojas tallo, embrión cigótico, peciolo, etc., pueden ser utilizadas para producir callos embriogénicos, (George, 1993).

2.8.4.2. Perspectivas del uso de la embriogenesis en la propagación de especies en peligro de extinción.

Para la aplicación de este sistema de propagación por cultivo de tejidos en programas de conservación de especies en peligro de extinción, es necesario distinguir las vías que permiten mantener una estabilidad genética de las que generan diferentes niveles de inestabilidad.

Para lograr cultivos estables genéticamente, es necesario seleccionar el órgano o tejido apropiado, las regiones meristemáticas: yemas axilares y punta de brotes, son tejidos que se caracterizan por mantener su estabilidad genética, por ser zonas donde las células que lo integran se mantienen en un estado de renovación celular y de forma similar al formado durante el desarrollo del embrión cigótico, (Margara, 1998).

Los tejidos u órganos no meristemáticos derivados de los brotes y yemas axilares, como hojas, raíz, tallo, estolón, etc., se caracterizan por presentar alta especialización celular, en muchos casos ésta se ve reflejada en cambios notables a nivel cromosómico, a este respecto, Ramulu y Dijkhuis, (1996), por medio de un análisis de ADN nuclear por citómetro de flujo, en diversos tejidos (brote, hoja, tallo, raíz, estolón) de 2 especies de *Agavaceas*, reportaron una alta inestabilidad en tallos, raíces y estolones en relación a explantes de hojas y brotes. La vía de repuesta morfológica, directa e indirecta, es otro factor importante a contemplar para la estabilidad o inestabilidad genética (Meins, 1996).

Los procesos indirectos implican una no diferenciación de los tejidos, protagonizado por una mitosis acelerada, que conlleva a una desorganización, originando una masa de células, comúnmente denominada callo, inducida principalmente por la presencia exógena de reguladores de crecimiento adicionados al medio.

Los cultivos de callo por largos periodos de tiempo, están directamente relacionados con la aparición y presencia de elevados niveles de variación genética, (Nehra *et al.* 1994).

Es evidente que la inestabilidad genética depende de varios factores, entre los de mayor importancia se mencionan al tipo de explante (meristemas), el sistema de regeneración (directa), el genotipo, el tipo y la concentración óptima de los reguladores de crecimiento (mínimas) y el menor tiempo en cultivo de los estados inestables (ej. callo), (Nehra *et al.* 1994).

2.8.4.3. Organogénesis.

La organogénesis es la base fundamental de la multiplicación vegetativa o formación de nuevos meristemas (Margar, 1998), y también de la producción mundial de plantas *in Vitro* (Vasil, 1994). Tisserat, (1985) divide al proceso de producción de órganos en tres tipos:

- a. Producción de órganos adventicios vía callo, a lo cual se nombra organogénesis indirecta, los tejidos más convenientes para ser utilizados por esta vía son las puntas de los tallos, hojas y pétalos.
- b. Surgimiento de órganos adventicios directamente sin pasar por la fase de callo, se emplean embriones, hojas, cormos, bulbos, tallos, rizomas y tubérculos.
- c. Producción de plantas generadas de la brotación de las yemas axilares o puntas de brotes, para la propagación usualmente se adiciona al medio una citocinina para inhibir la dominancia apical y estimular el desarrollo de las yemas axilares; una más de las ventajas de usar áreas meristematicas es que

dependiendo del tamaño del explante usado inicialmente (80 μ) pueden obtenerse plantas libres de patógenos.

Estos dos últimos procesos (b y c) se enmarcan en una organogénesis directa, en donde las células con la competencia organogénica se encuentran en el explante al tiempo de su disección.

La forma indirecta requiere de una desdiferenciación del tejido acompañada de una actividad mitótica para la formación de callo y posteriormente ocurre una redeterminación de las células para adquirir la capacidad morfogenética (Sharp *et al.* 1990).

Al igual que en la embriogénesis somática directa, los promotores de la callogénesis son altas concentraciones de auxinas y bajas o ausencia de citocininas, (Tisserat, 1985).

2.8.4.4. Perspectivas de la aplicación de la organogénesis en la propagación de especies en peligro de extinción.

De las tres vías propuestas anteriormente para la producción de órganos, la última, producción de plantas generadas directamente de la brotación de las yemas axilares o puntas de brotes, es el proceso que permite mantener una mayor posibilidad de estabilidad genética, (Hussey, 1996). Para los casos en que se requiere mantener la estabilidad genética y se utiliza la desdiferenciación a callo de los tejidos, es necesario que el cultivo y división del callo no se prolongue, debido a que se corre el riesgo de generar plantas aberrantes tal y como se indicó anteriormente para embriogénesis.

2.8.5. Función de los reguladores de crecimiento en el cultivo de tejidos.

Las hormonas son, por definición, compuestos orgánicos sintetizados por las plantas, que influyen sobre el crecimiento y desarrollo; actúan generalmente en lugar diferente a donde son producidas y se encuentran presentes y activas en muy pequeñas cantidades. Aparte de estos productos naturales, se han

desarrollado otros de tipo sintético, que pueden tener una actividad semejante a la de los primeros. Al conjunto de estos productos sintéticos, junto con las hormonas, se denomina reguladores, y son los responsables, en primer lugar, de la distribución de los compuestos que la planta biosintetiza. También determinan el crecimiento relativo de todos los órganos de la planta.

En el cultivo *in Vitro* de las plantas, los reguladores, especialmente las auxinas y las citocininas, juegan un papel muy importante. Se puede decir que el cultivo *in Vitro* es generalmente imposible sin reguladores. Si a un medio nutritivo se le debe añadir una auxina o una citocinina, para conseguir la extensión y/o la división celular, es algo que depende del tipo de explanto y de la especie vegetal. Por ejemplo explantos que producen suficiente cantidad de auxina, no necesitan una cantidad adicional para conseguir la extensión y/o la división. Otros explantos producen suficiente cantidad de citocinina, no precisando de ninguna adición exógena. Se puede hacer la siguiente división, en relación con el crecimiento de células, tejidos u órganos:

1. Cultivos que no necesitan ni auxina ni citocinina.
2. Cultivos que necesitan sólo auxina.
3. Cultivos que necesitan sólo citocinina.
4. Cultivos que necesitan auxina y citocinina.

En el caso de especies con las que no se haya trabajado previamente, se debe plantear si sus tejidos u órganos necesitaran reguladores exógenos, para su crecimiento y desarrollo *in Vitro*. Se deberán de determinar las cantidades absolutas y relativas, de auxinas y/o citocininas que deben añadirse. Otros reguladores como las giberelinas y etileno, pueden también ser necesarios.

2.8.5.1 Auxinas.

Las auxinas (IAA, IBA, NAA o 2,4-D) se añaden frecuentemente a los medios nutritivos. El IAA, que se produce de forma natural en las plantas, se añade en concentraciones de 0.01-10 mg l⁻¹. Las auxinas sintéticas, y relativamente

más activas (IBA, NAA, y 2,4-D), se utilizan en concentraciones de $0.001-10 \text{ mg l}^{-1}$. las auxinas generalmente producen: elongación celular y expansión de los tejidos, división celular (formación de callo), y formación de raíces adventicias, inhibición de la formación de vástagos axilares y adventicios, y frecuentemente embriogénesis en los cultivos en suspensión. Con una baja concentración de auxinas predomina la formación de raíces adventicias, mientras que con altas concentraciones no se producen raíces, y tiene lugar en cambio, la formación de callo. La utilización del 2,4-D se debería limitar al máximo, ya que induce mutaciones. También el 2,4-D puede inhibir la fotosíntesis, cosa que no ocurre con otras auxinas como NAA, IBA e IAA.

En ocasiones la dicción de auxinas estimula el crecimiento de plántulas. Pierik *et al.* (1994) demostró que el 2,4-D promueve la formación de brotes adventicios (raíces) en plantas de algunos agaves.

2.8.5.2. Citocininas.

Las citocininas se utilizan frecuentemente para estimular el crecimiento y el desarrollo; siendo las más comunes: Kinetina, BA, 2Ip, y PBA. Generalmente estimulan la división celular, sobre todo si van en compañía de una auxina. En concentraciones elevadas ($1-10 \text{ mg l}^{-1}$) puede inducir la formación de vástagos adventicios, sin embargo, generalmente se inhibe la formación de raíces. Las citocininas promueven la formación de vástagos axilares, porque disminuyen la dominancia apical, también retardan el envejecimiento.

2.8.5.3. Giberelinas.

Este grupo de compuestos no se utiliza generalmente en el cultivo *in Vitro*. En la mayor parte de los casos son sustancias no esenciales en el cultivo *in Vitro*. GA₃, es la más utilizada, pero debe tenerse en cuenta que es muy sensible al calor: Se pierde el 90% de su actividad biológica después del autoclaveado (Ammirato, 1993). En general las giberelinas inducen la elongación de los

entrenados y el crecimiento de los meristemas o yemas *in Vitro*. También pueden romper la dormición de embriones aislados o yemas. Las giberelinas generalmente inhiben la formación de raíces adventicias (Pierik, 1999), y también la formación de vástagos adventicios.

2.8.5.4. Otros reguladores.

Oligosacarinas. Hace poco tiempo se descubrió que las oligosacarinas definidas estructuralmente como fragmentos de los polisacáridos de la pared celular), son mensajeros químicos, con propiedades reguladoras específicas. Las oligosacarinas se desprenden de la pared celular por la acción enzimática. Las oligosacarinas pueden actuar como reguladores, no sólo disparando los mecanismos de defensa de las plantas, contra los patógenos u otros tipos de estrés, sino también regulando la tasa de crecimiento y diferenciación, para producir raíces, flores, y yemas vegetativas.

Acido abscísico. En la mayoría de los casos el ABA produce un efecto negativo en los cultivos *in Vitro*, debido a que la actividad fotosintética resulta mínima y las referencias a crecimiento del callo y embriogénesis son probablemente incidentales (Ammirato, 1993).

Etileno. Se sabe que tanto el cultivo de órganos como el de callos pueden producir etileno, una hormona gaseosa. Teniendo en cuenta que los tubos, matraces y otros recipientes de plástico están a veces herméticamente cerrados, se debe tener cuidado para evitar la acumulación de etileno, sobre todo en caso de utilizar recipientes de plástico, ya que ellos mismos pueden generar este gas. El flameado también puede generar etileno. Mackenzie y Street (1990),.

Algunas veces el crecimiento *in Vitro* puede ser estimulado por el etileno. Parece que una cierta concentración de etileno es necesaria para la inducción de la división celular (calogénesis y formación de brotes) esto fue demostrado

por Mackenzie y Street (1990), para cultivos de células en suspensión. Es importante tener en cuenta que el 2,4-D induce la formación de etileno.

2.8.6. Función de las vitaminas en el cultivo de tejidos.

Una o varias de las siguientes vitaminas se utilizan algunas veces en el cultivo *in Vitro* (los nombres alternativos y las concentraciones utilizadas en mg l^{-1} se indican entre paréntesis): inositol (mio-inositol, meso-inositol; 100-200), Vitamina B₁ (tiamina, aneurina; 0.1-5.0), pantonato de calcio o ácido pantoténico (0.-2.5), ácido fólico (vitamina M; 0.1-0.5), riboflavina (lactoflavina, vitamina B₂; 0.1-1.00) ácido ascórbico (vitamina C; 1-100), ácido nicotínico (vitamina PP, niacina; 0.1-5), piridoxina (adermina, vitamina B₆; 0.1-1.0), biotina (vitamina E; 1-50).

En ocasiones se utilizan altas concentraciones de ácido ascórbico, lo que no quiere decir exactamente que la planta tenga unas necesidades elevadas. La vitamina C se utiliza en estas concentraciones elevadas como antioxidante.

La mayor parte de las plantas son capaces de sintetizar vitaminas *in Vitro*, y quizá deberíamos preguntarnos, si la adición frecuente de mezclas de vitaminas en el cultivo *in Vitro*, es siempre necesaria.

III. MATERIALES Y METODOS

3.1. Ubicación geográfica del experimento.

El trabajo se efectuó en laboratorio durante el periodo Mayo-Octubre del año 2005 en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Laguna, en el municipio de Torreón, Coah. A una altitud de 1100 msnm y dentro de las coordenadas geográficas 25° 32' 51'' de latitud norte y 103° 26' 53'' de longitud oeste, con clima seco desértico con lluvias en verano, precipitación media anual de 230 mm, temperatura media anual de 19 a 22° C según Koppen.

3.2. Estructura física.

El establecimiento del proyecto se realizó en los laboratorios de cultivo de tejidos y microbiología del departamento de biología.

3.3. Metodología.

3.3.1. Material vegetal empleado.

Se utilizó semilla de Noa (*Agave victoriae-reginae*) proporcionada por la Universidad Autónoma Agraria "Antonio Narro" Unidad Laguna. La cual se colectó en el Cañón del Indio de la Sierra de las Noas en primavera-verano del 2004, la cual se localiza al sureste del área conurbada de la Comarca Lagunera, en la porción Este de la sierra, constituyendo el cinturón geográfico más importante.

3.3.2. Etapa de germinación de semillas de *A. victoriae-reginae* T. Moore.

3.3.2.1. Preparación del medio de cultivo.

El medio de cultivo empleado fue el de Murashige y Skoog (1962), complementado con sacarosa a razón del 0.8%, y agar a razón del 0.8%; el pH

se ajusta a 5.8 previo a la adición del agar. Posteriormente se distribuyen en frascos de vidrio (25 ml). Se les coloca una tapa plástica, y se introducen en una bolsa de plástico y son llevadas a la autoclave para su esterilización. La esterilización en la autoclave se realiza en un tiempo de 20 minutos a 21 libras de presión y a 120°C de temperatura. Posterior a la esterilización se retiran de la autoclave y se introducen en bolsas de plástico selladas hasta el día de su utilización.

3.3.2.2. Procedimiento de siembra.

Un día antes de la siembra se pone a remojar en agua destilada la mitad de la semilla a utilizar considerando que en cada recipiente se colocaran 4 semillas.

Antes de sembrar es necesario asperjarse las manos con alcohol y colocarse un cubrebocas.

El día en que se efectúa la siembra se llevan todos los recipientes, y material a utilizar a la campana de flujo laminar.

Se abre el paquete de cajas de petri, y se flamea una utilizando una mitad para descansar el juego de pinzas de disección, los cuales han sido flameados previamente, para ser utilizados posteriormente. El resto de las cajas debe permanecer dentro de la campana.

Se pasan las semillas utilizando las pinzas estériles a un vaso estéril.

Se agrega el fungicida (Captan) y se agita el vaso durante 15 minutos.

Se agrega el cloro al 20%, en el cual permanecerán las semillas durante 20 minutos agitando constantemente.

Se drena el cloro y se da un enjuague con agua destilada estéril durante 1 minuto.

Se drena el agua y se le agrega el microdine al 20% agitando constantemente durante 10 minutos.

Se drena el microdine y se dan 3 enjuagues con agua destilada estéril, con una duración aproximada de 1 minuto entre cada enjuague.

Se toman 4 semillas y se colocan en media caja petri con las pinzas previamente flameadas.

Se flamea la boca y tapa del envase, y se colocan las 4 semillas ampliamente distribuidas.

Se sellan con película plástica, se rotulan los recipientes, y se llevan al cuarto de germinación.

3.3.3. Etapa de inducción de brotes de plántulas desarrolladas de Noa (*A. victoriae-reginae* T. Moore).

Este procedimiento se realiza en la campana de flujo laminar, utilizando las plántulas desarrolladas. Y se utiliza el medio de cultivo de Murashige y Skoog, con la diferencia de que en este medio se le adicionarán las hormonas reguladoras requeridas auxinas 2,4-D y las citocininas BAP, propuestas por Robert. Este procedimiento se realizó a los 115 días después de la siembra de semillas de Noa (26 de Agosto del 2005). Se utilizan envases de plástico donde se adiciona el medio, aproximadamente 150 ml por envase.

3.3.3.1. Procedimiento de trasplante o repicado.

Se realizó en la campana de flujo laminar, se utilizaron pinzas y cajas de petri, el trasplante se hizo de manera directa de medio a medio sin aplicar ningún tratamiento de asepsia debido a que las plántulas se encontraban en un medio axénico.

Se utilizan las pinzas estériles que son constantemente flameadas con alcohol al 96%. Se toman 4 plantas y se colocan en media caja petri con las pinzas previamente flameadas. Se flamea la boca y tapa del envase, y se colocan las 4 plantas ampliamente distribuidas. Se sellan con película plástica, se rotulan los recipientes, y se llevan al cuarto de germinación.

3.4. Variables Evaluadas.

Porcentaje de germinación. Este parámetro se midió mediante observaciones diarias, evaluando individualmente a las semillas durante un periodo de 6 días después de la siembra., el día de siembra fue el 3 de mayo del 2005.

Días de emergencia de la hoja cotiledonar. Este parámetro se evaluó a partir de la germinación, es decir del 6 al 15 día después de haber realizado la siembra.

Días de aparición de aparición de la 1ª Hoja verdadera. Esta variante se determino mediante observaciones diarias a partir de la emergencia de la hoja cotiledonar.

Formación de brotes adventicios y callo. La medición se realizo después de haber realizado el trasplante al medio para inducción de brotes (con hormonas), a partir del 26 de agosto del 2005 (115 días después de la siembra), mediante observaciones semanales por un lapso de 2 meses consecutivos (Septiembre y Octubre).

3.5. Tratamientos.

Se plantearon un total de 2 tratamientos:

Tratamiento 1: Semilla con remojo en agua destilada 24 horas antes de la siembra.

Tratamiento 2: Semilla sin remojo.

3.6. Siembra.

Se realizo el día 3 de Mayo del año 2005, utilizando recipientes de vidrio con tapas plásticas, desinfectando la semilla con captan, cloro, microdín y posteriormente se llevaron al cuarto de germinación.

3.7. Repicado o Trasplante.

Se realizo 26 de Agosto del 2005 (115 días después de la siembra), utilizando el mismo medio de cultivo que el de germinación con la diferencia de la adición de hormonas para la inducción de brotes.

3.8. Diseño experimental.

Se utilizo un diseño experimental completamente al azar con 2 tratamientos y 10 repeticiones. La unidad experimental la constituyo un recipiente de vidrio con tapa plástica no hermética con 4 semillas/recipiente. El análisis de varianza se realizo únicamente para las siguientes variantes: Porcentaje de germinación, días de emergencia de la hoja cotiledonar y días de aparición de la 1ª Hoja verdadera.

00106

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De acuerdo a los objetivos previamente establecidos en este trabajo se presentan los resultados obtenidos.

4.1. Porcentaje de germinación.

Cuadro 2. Resultados para el porcentaje de germinación de semillas de Noa (*A. victoriae-reginae* T. Moore) germinadas en medio de cultivo MS, con datos analizados individualmente, correspondiente a los tratamiento 1 y 2.

Variable	Tratamiento 1	Tratamiento 2
Germinación (%)	95	92.5
	3 días	4 días

En el caso de los porcentajes de germinación se evaluaron las semillas sembradas, obteniendo diferencia con las semillas que no lograron germinar.

Para el tratamiento 1 (semilla con 24 horas de remojo) se obtuvo un porcentaje de germinación del 95%, a los 3 días después de la siembra (Figura 4). Utilizando semillas colectadas en primavera – verano del 2004.

Para el tratamiento 2 (semilla sin remojo) el porcentaje de germinación fue del 92.5%, a los 4 días después de la siembra (Figura 4). Semillas colectadas en primavera – verano del 2004.

Los resultados coinciden con los señalados por Martínez, (1998) el cual obtuvo 94% de germinación en semillas remojadas en agua destilada 36 horas antes de la siembra en medio de cultivo de tejidos, (M.S.).

Las semillas fueron germinadas a una temperatura de 25°C, coinciden con los establecidos por Pritchard y Miller, (1995) quienes afirman que la temperatura es un factor importante en la germinación ya que los mas altos porcentajes de

semillas germinadas de Noa (*A. victoriae-reginae* T. Moore) oscilan entre el 90% y 96% a temperaturas de 23 a 25° C.

El análisis de varianza (Cuadro 3), señala que no existe diferencia significativa entre los tratamientos, sin embargo el 2.5% de germinación de diferencia entre tratamientos es un valor significativo para esta especie, ya que para la introducción de poblaciones a gran escala es determinante por las cantidades de plantas que logran desarrollarse.

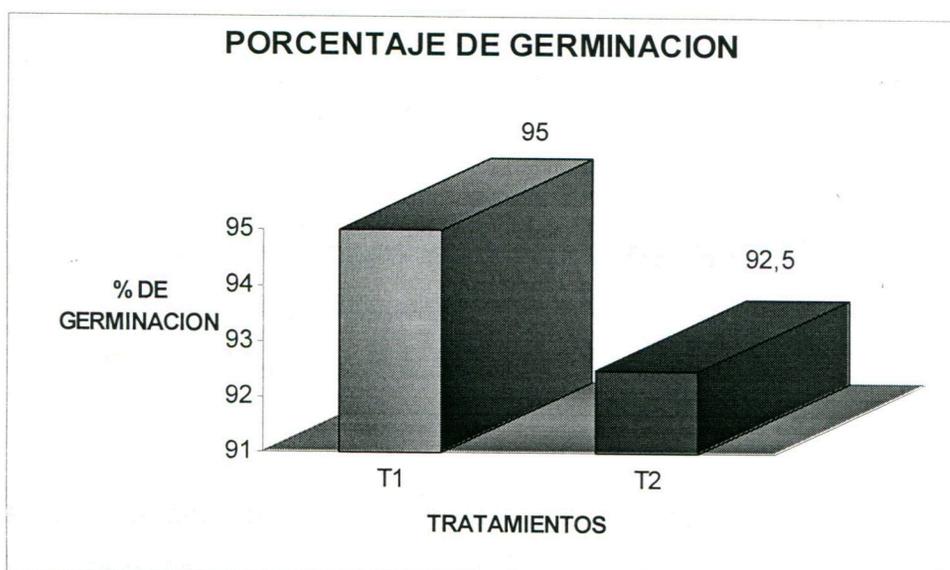


Figura 4. Porcentaje de germinación de Noa (*A. victoriae-reginae* T. Moore)

Cuadro 3. Análisis de varianza para el porcentaje de germinación de semillas de Noa (*A. victoriae-reginae* T. Moore) en medio de cultivo MS, con datos ordenados en un cuadro completamente al azar.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Fo	Nivel de Significancia
Tratamientos	1	31.250000	31.250000	0.2432	0.633
Error	18	2312.50000	128.472229		
Total	19	2343.75000			
Coefficiente de variación	12.09%				

Cuadro 4. Comparación de medias para el porcentaje de germinación de semillas de Noa (*A. victoriae-reginae* T. Moore) germinadas en medio de cultivo MS, ordenado en un cuadro completamente al azar.

Tratamientos	Media
1	95 A
2	92.5 B

4.2. Días de emergencia de la hoja cotiledonar.

Cuadro 5. Resultados para los días que tarda en emerger la hoja cotiledonar de semillas de Noa (*A. victoriae-reginae* T. Moore) germinadas en medio de cultivo MS, con datos correspondientes a los tratamientos 1 y 2.

Variable	Tratamiento 1	Tratamiento 2
Emergencia (días después de la siembra)	11.2	12.4

Referente a los días de emergencia de la hoja cotiledonar T1 presentó una diferencia poco mas de un día respecto a T2, determinando que los promedios en días para T1 son de 11.2 días, y para T2 de 12.4 días (Figura 5).

El análisis de varianza determino que si existe diferencia significativa entre tratamientos (Cuadro 6), comprobando que el tratamiento 1 (semilla con 24 horas de remojo), superó por más de 1 día de diferencia al tratamiento 2, referente a los días en que emerge la hoja cotiledonar.

Los resultados obtenidos coinciden con los propuestos por Egúarte *et. al*, (2001) el cual menciona que los días en que emerge la hoja cotiledonar de *A. victoriae-reginae* T. Moore ocurre entre los 11 y 17 días después de la siembra, a temperatura constante de 25° C. y con buena luminosidad.

De igual manera los resultados obtenidos son semejantes a los obtenidos por Martínez (1998) el cual afirma que los días a emergencia de semillas de Noa (*A. victoriae-reginae* T. Moore) germinadas *in Vitro* en un medio M.S. (Murashige y Skoog) oscila entre los 11 y 13 días después de la siembra, sin aplicar ningún tratamiento pregerminativo o remojo. Entendiendo que para Martínez los días de emergencia ocurre cuando el cotiledón es totalmente diferenciado y ha emergido del sustrato o del medio de cultivo.

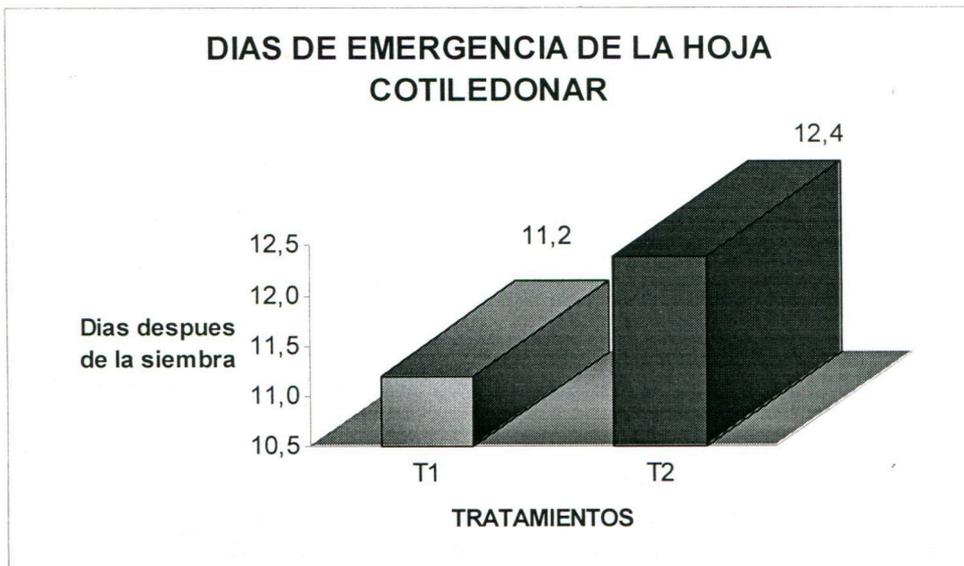


Figura 5. Días promedio de emergencia de la hoja cotiledonar de semillas de Noa *A. victoriae-reginae* T. Moore).

Cuadro 6. Análisis de varianza para los días que tarda en emerger la hoja cotiledonar de semillas de Noa (*A. victoriae-reginae* T. Moore) germinadas en medio de cultivo MS, ordenado en un cuadro completamente al azar.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Fo	Nivel de significancia
Tratamientos	1	7.799561	7.799561	9.3625	0.007*
Error	18	14.995117	0.833062		
Total	19	22.794678			
Coefficiente de variación	7.72%				

Cuadro 7. Comparación de medias para los días que tarda en emerger la hoja cotiledonar de semillas de Noa (*A. victoriae-reginae* T. Moore) germinadas en medio de cultivo MS, ordenado en un cuadro completamente al azar.

Tratamientos	Media
1	11.191000 A
2	12.440000 B

NIVEL DE SIGNIFICANCIA = 0.05

dms < 2 1 > = 0.8576

dms < 1 2 > = 0.8576

NIVEL DE SIGNIFICANCIA = 0.01

dms < 2 1 > = 1.1747

dms < 1 2 > = 1.1747

4.3. Días de aparición de la 1ª hoja verdadera.

Cuadro 8. Resultados respectivos para los días de aparición de la 1ª hoja verdadera en semillas de Noa (*A. victoriae-reginae* T. Moore) germinadas en medio de cultivo MS, con datos correspondientes para los tratamientos 1 y 2.

Variable	Tratamiento 1	Tratamiento 2
Aparición de la 1ª hoja verdadera (Días después de la siembra).	23.4	25.2

Los días de aparición de la 1ª hoja verdadera resultó con niveles significantes entre los tratamientos T1 y T2 con valores de 23.4 y 25.2 días respectivamente (Figura 6).

El análisis de varianza determinó que si existe diferencia significativa entre tratamientos (Cuadro 9), es decir que T1 resultó ser el más óptimo para reducir el tiempo de formación de la 1ª hoja verdadera.

Los resultados se asemejan a los obtenidos por Martínez en (1998) el cual observó que la aparición de la 1ª hoja verdadera de semillas de Noa, ocurre a los 25 días después de la siembra en medio de cultivo MS, en condiciones de temperatura de 27° C, y sin aplicar ningún tratamiento de remojo.

Sin embargo Agüero, (1994) afirma que en la Noa, la 1ª hoja verdadera aparece a los 21 días, cuando la semilla a seguido un tratamiento de remojo en agua destilada por un lapso de 30 horas.

Ambos tratamientos (T1 y T2) superan en gran medida los obtenidos por Raven y Curtís, (1985) los cuales mencionan que algunas semillas de agaves de porte pequeño, desarrollan la 1ª hoja verdadera a los 37 días después de la siembra en condiciones libres al ambiente y con sustratos poco fértiles, por lo que se comprueba que la técnica *in Vitro*, a parte de ser una técnica segura resulta ser una herramienta aceptable para la propagación de especies con fines conservacionistas.

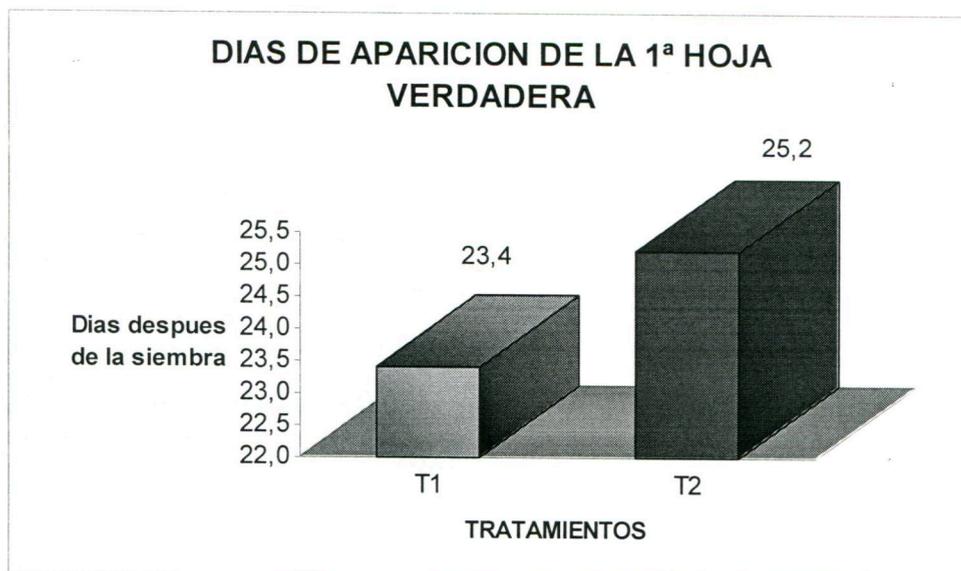


Figura 6. Días de aparición de la 1ª hoja verdadera de Noa (*A. victoriae-reginae* T. Moore)

Cuadro 9. Análisis de varianza respectivo a los días en que aparece la 1ª hoja verdadera en semillas de Noa (*A. victoriae-reginae* T. Moore) germinadas en medio de cultivo MS, con datos ordenados en un cuadro completamente al azar.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Fo	Nivel de Significancia
Tratamientos	1	17.429688	17.429688	49.6314	0.000*
Error	18	6.321289	0.351183		
Total	19	23.750977			
Coefficiente de variación	2.44%				

Cuadro 10. Comparación de medias para los días en que aparece 1ª hoja verdadera en semillas de Noa (*A. victoriae-reginae* T. Moore) germinadas en medio de cultivo MS, con datos ordenados en un cuadro completamente al azar.

Tratamientos	Media
1	23.341000 A
2	25.208000 B

NIVEL DE SIGNIFICANCIA = 0.05

dms < 2 1 > = 0.5568

dms < 1 2 > = 0.5568

NIVEL DE SIGNIFICANCIA = 0.01

dms < 2 1 > = 0.7627

dms < 1 2 > = 0.7627

4.4. Formación de brotes adventicios.

Cuadro 11. Resultados respectivos para la formación de brotes adventicios en plantas de Noa (*A. victoriae-reginae* T. Moore) desarrolladas en medio de cultivo MS modificado por Robert, con datos analizados, correspondientes para el tratamiento 1 y 2.

Variable	Tratamiento 1	Tratamiento 2
Brotes adventicios (No. brotes/plántula)	2	1

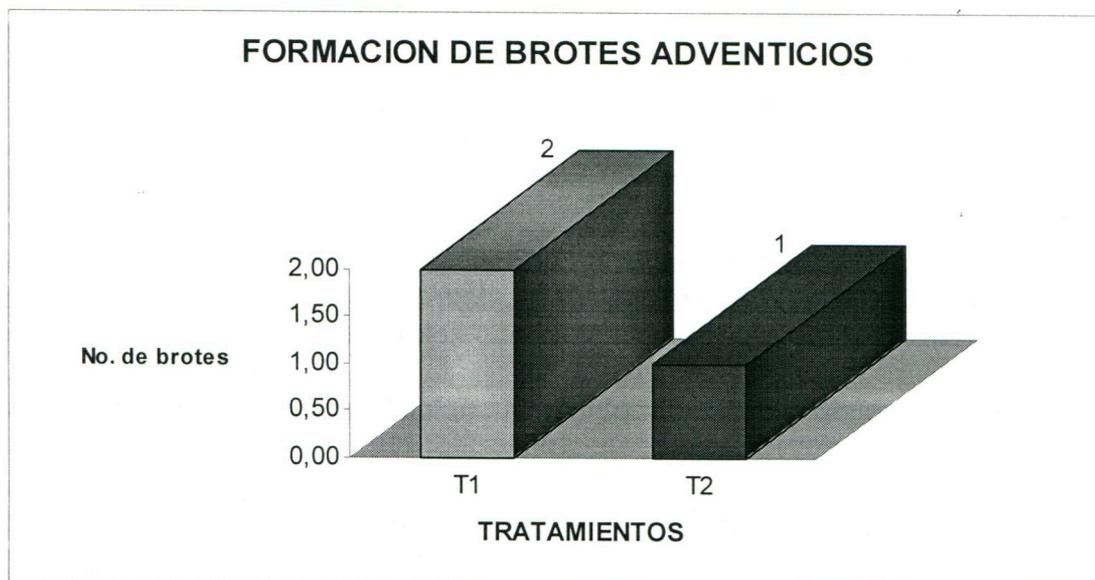


Figura 7. Formación de brotes adventicios de plantas de Noa (*A. victoriae-reginae* T. Moore).

Respecto a la formación de brotes adventicios se obtuvo que el T1 mostró en promedio 2 brotes/planta, mientras que el T2 presentó 1 brote/planta.

Frydrich, (1982) en estudios realizados en *A. sisalana* obtuvo 3 brotes adventicios/planta.

En (1989) Backhauss encontró que en *A. arizonica* se producen de 5 a 10 brotes/planta, cada 12 semanas.

Sin embargo Robert, (1992) utilizando BAP (10mg/l mg de BAP), empleado en la propagación de *A. fourcroydes*, cuadruplicó el número de brotes adventicios cada 4 semanas originando los individuos deseados.

Los resultados obtenidos son consecuencia de la utilización de hormonas en este caso auxinas y citocininas, que influyen en el desarrollo y diferenciación celular. Los brotes adventicios se atribuyen a el uso exclusivo de las auxinas según Pierik *et al.* (1994) el cual demostró que el 2,4-D promueve la formación de brotes adventicios (raíces) en plantas de algunos agaves.

4.5. Formación de callo.

Cuadro 12. Resultados respectivos para la formación de callos en plantas de Noa (*A. victoriae-reginae* T. Moore) desarrolladas en medio de cultivo MS modificado por Robert, con datos analizados, correspondientes para el tratamiento 1 y 2.

Variable	Tratamiento 1	Tratamiento 2
Callo	1.4	2.0

De los 40 explantos utilizados para cada uno de los tratamientos se obtuvieron porcentajes de formaron callo/explanto para T1 el 55% (22 explantos con callo) y para T2 el 42.5% (17 explantos con callo)

La formación de callo se evaluó utilizando un cuadro descriptivo el cual se menciona a continuación.

Tipo de callo	Valor
No existe	0
Escaso	1
Abundante	2
Muy abundante	3

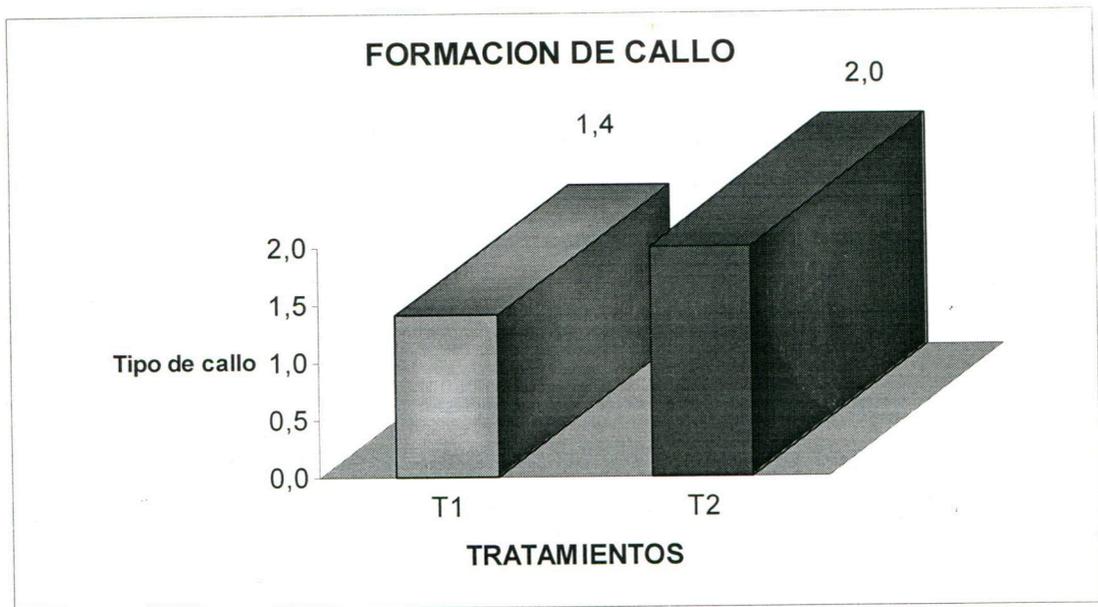


Figura 8. Formación de callos de plantas de Noa (*A. victoriae-reginae* T. Moore).

En el T1 la formación de callo fue escasa, mientras que para el T2 se obtuvo una formación de callo abundante.

Nehra *et al.*, (1994), afirma que la formación de callo o callogénesis se atribuye a una inestabilidad genética que depende de varios factores, entre los que se mencionan el genotipo, el tipo y la concentración óptima de los reguladores de crecimiento (auxinas y citocininas) las cuales en preferencia deben de ser concentraciones mínimas.

Al igual que en la embriogénesis somática directa, los promotores de la callogénesis son altas concentraciones de auxinas y bajas o ausencia de citocininas, según las investigaciones de Tisserat, (1985).

Sin embargo debemos de tomar en cuenta que en algunos recipientes de plástico se corre el riesgo de la acumulación de etileno, ya que estos mismos pueden generar este gas. El flameado también generar etileno según Mackenzie y Street (1990).

Algunas veces el crecimiento *in Vitro* puede ser estimulado por el etileno. Parece que una cierta concentración de etileno es necesario para la inducción de la división celular (calogénesis y formación de brotes) esto fue demostrado por Mackenzie y Street (1990), para cultivos de células en suspensión de Hacer. Es importante tener en cuenta que el 2,4-D induce la formación de etileno.

Ammirato, (1993), menciona que en la mayoría de los casos el ABA (ácido abscísico) produce un efecto negativo en los cultivos *in Vitro*, debido a que la actividad fotosintética resulta mínima y las referencias a crecimiento del callo y embriogénesis son probablemente incidentales.

V. CONCLUSIONES

5.1. Porcentaje de germinación.

De acuerdo a los resultados obtenidos se determina que no existe diferencia significativa entre los tratamientos 1 y 2.

La semilla utilizada fue colectada durante el ciclo primavera-verano del año 2004, la cual presento buen porcentaje de germinación para ambos tratamientos, determinando que la época de colecta no es un factor que limite el proceso de desarrollo de la semilla, descartando lo que menciona Vázquez, (1990) en sus publicaciones sobre conservación de semillas el cual señala la importancia que tiene la época de colecta de semillas de *A. victoriae-reginae* T. Moore, haciendo mención que las semillas colectadas en el mes de diciembre presentan mayor porcentaje de germinación de hasta el 95% con respecto a otras épocas de colecta.

5.2. Emergencia de la hoja cotiledonar.

La emergencia ocurre primero en el T1 con respecto al T2, esta diferencia se debe al tiempo de inicio de la germinación en cada uno de los tratamientos.

5.3. Aparición de la 1ª hoja verdadera.

El tiempo requerido para la aparición de la 1ª hoja verdadera para T1 fue menor, presentándose a los 23.4 días, con respecto al T2 que se presento 2 días después, siendo mejor el resultado obtenido en este experimento, que a los obtenidos por Martínez, (1998), el cual menciona que la 1ª hoja verdadera aparece a los 25 días después de la siembra y sin aplicar ningún tratamiento de remojo.

5.4. Formación de brotes adventicios.

El número de brotes obtenidos en ambos tratamientos (T1 y T2) indican un bajo índice de formación de brotes, siendo los promedios de 2 y 1 brotes/planta respectivamente, con respecto a los mencionados en la literatura citada, los cuales son superiores en distintas especies.

Se puede atribuir la escasa presencia de brotes en ambos tratamientos, a las concentraciones de auxinas 2,4-D, el cual puede influir en alguna alteración fisiológica de esta especie ocasionando un efecto de toxicidad.

5.5. Formación de callo.

Respecto a la formación de callo para T1 se manifestó la formación de callo escaso, en comparación a T2 el cual fue abundante, confirmando que los porcentajes de callogénesis fueron del 55% para T1 y 42.5% para T2.

Se deduce que la formación de callo no ocurre por efecto de la semilla con remojo, sino más bien atribuidos a la influencia de los reguladores de crecimiento, en este caso las hormonas (auxinas y citocininas), las cuales incitan a su formación, coincidiendo con lo mencionado por Nehra *et al.*, (1994).

Las especies presentan una respuesta diferente a la estimulación hormonal, por lo cual se debe especificar su uso para cada una de ellas

5.6. Recomendaciones.

Se sugiere que para acelerar el proceso de germinación y reducir los días en que ocurre este efecto, se lleve a cabo el remojo de la semilla en agua destilada por un lapso de 24 horas anteriores a la siembra.

En base a los resultados obtenidos se recomienda que la germinación se lleve a cabo en el laboratorio bajo condiciones controladas de luz y temperatura, ya que la semilla presenta una alta precocidad, con respecto a la germinación en condiciones naturales.

Dado el bajo número de brotes adventicios formados, se sugiere determinar la dosis óptima del uso y combinación a diferentes concentraciones de las hormonas, para determinar el protocolo de producción *in Vitro* de esta especie.

VI. BIBLIOGRAFIA.

- Agüero M; A. 1994. Potencial de reproducción sexual de la noa (*Agave victoriae-reginae* T. Moore). Escuela Superior de Biología. Gómez palacios Durango.
- Ammirato. 1993. Handbook of plant cell culture. 3. Crop species. MacMillan Publ. Comp., Nueva York, 1-620.
- Backhaus. G. 1989. Alternative uses for sisal fiber In: Cruz C. del Castillo L. Robert Ml.(eds. Biología y aprovechamiento integral del henequen y otros agaves. Cent Invest Cient Yucatan. Pp 177-186.
- Baskin, J. M. and Baskin, C. C. 1990. The ecology life of *Agave virginica* L. In Tennessee cedar glades. The American Midland Naturalist. Pp. 449-452.
- Bidwell, R. G. S. 1993 Fisiología vegetal. Ed. AGT. México, D.F. 1ª Ed. En español. Pp. 455, 456, 576, 582.
- Chakraborty, R. 1995. The Bottleneck Effect and Genetic Variability in Populations. Pp. 1-10.
- Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de Norteamérica. 1961. El libro de agricultura. Pp. 188, 209, 211.
- Dodds J. H. y L.W. Roberts. 1982. Experiments in plant Tissue Culture. Cambridge University Press. Cambridge 178 p.
- Eguiarte, L.E., Larson-Guerra, J., Núñez-Farfán, J., Martínez-Palacios, A., Santos del Prado, K. y Arita, H.T. 2001. Diversidad filogenética y conservación: ejemplos a diferentes escalas y una propuesta a nivel poblacional para *Agave victoriae-reginae* en el Desierto de Chihuahua, México. Revista Chilena de Historia Natural. (27): 475-492.
- Freeman, C. E. 1994. Germination response of a New Mexico population of Parry agave (*Agave parry* Engelm, var. *parry*) to constant temperature, water stress, and pH. The Southwestern Naturalist Pp. 64-74.
- Frydrych. D. 1982. Induction in vitro de bourgeons adventifs á partir du sisal. Premiers resultants. Cot Fib Trop 27. Fasc 3: 295-304.

- Gamborg O.L. y J.P. Shuyluk. 1991. Nutrition Media and Characteristics of plant Cell and Tissue Culture. Paginas 21-42, en; T.A. Thorpe (ed.), Plant Tissue Culture, Methods and Applications in Agriculture. Academic Press Inc., New York.
- García y Mendoza, 1995. Riqueza y endemismo de la familia Agavaceae en México. En: Conservación de plantas en peligro de extinción: Diferentes enfoques. Instituto de Biología, UNAM. México, D.F.
- Gentry, 1982. Agaves of Continental North America. The University of Arizona Press. Arizona, U.S.A.
- George E. F. 1993. Plant Propagation by Tissue Culture. 1. The Technology. Exergetics Ltd. England.
- Hartmann, T;H. y Kester, E.D. 1996. Propagación de plantas, principios y practicas CECSA. 2ª Ed. Pp. 161, 109-118, 193-195.
- Hussey G. 1996. Vegetative propagation of plant by Tissue Culture. Paginas 29-66, en :M.M. Yeoman (ed.), Plant Cell Culture Technology. Blackwell Sci. Publ, Oxford.
- Madrigal, L.R., F. Pineda-Estrada, Y Rodríguez De La O. 1990. *Agave*. In: Handbook of Plant Cell Culture, Ammirato et al., (eds.). Vol, 5:206-227,
- Mackenzie and Street. 1990. Handbook of plant cell culture. MacMillan Publ. Comp., Nueva York, 530-678.
- Margara J. 1998. Multiplicación Vegetativa y Cultivo *in Vitro*, los meristemos y la organogénesis. Editorial Mundi-Prensa, Madrid. 232 p.
- Martínez P. A. 2000. Estructura poblacional y conservación de semillas de *Agave victoriae-reginae* T. Moore (Agavaceae), endémica y en peligro de extinción. Evaluación genética y demográfica de *Agave victoriae-reginae* T. Moore y aplicación del cultivo de tejidos para su conservación. Pp. 1-37.
- Martinez. A., Eguiarte, L.E., 1998. Conservation genetics of the endangered endemic *Agave victoriae-reginae* (Agavaceae) in the Chihuahuan desert. Evaluación genética y demográfica de *Agave victoriae-reginae* T. Moore y aplicación del cultivo de tejidos para su conservación. Pp. 1-20.

- Meins F. 1996. Determination and morphogenetic competence in plant tissue culture. Páginas 7-25, en :M.M. Yeoman (ed.), Plant Cell Culture Technology. Blackwell Sci. Publ., Oxford.
- Merlín, B. E. 1993. Evaluación del pre-acondicionamiento a la semilla de cuatro leguminosas forestales del desierto sonorense. Tesis profesional. Universidad Autónoma Chapingo. México. Pp. 51-53.
- Mistretta, O. 2002. Genetics of species re-introductions: applications of genetic analysis. *Biodiversity and Conservation*, 3: 184-190.
- Mitton, J. B. and M.C. Grant. 1994. Associations among protein Heterozygosity, grow rate and Developmental homeostasis. *Annual Reviews of Ecology and Systematics* 15:479-499.
- Murashige, T. Y F. Skoog. 1962. A Revised Medium for rapid growth and bioassays with Tobacco tissue culture. *Physiology. Plant.* 15: 473-494.
- Nehra N.S. 1994. Effect of in vitro propagation Methods on field performance of two strawberry cultivars. *Euphytica* 76:173-178.
- Nobel, P. S. 1991. Environmental Biology of agaves and cacti. University of California. Pp. 128-129.
- Nóbel, P.S., 1995. Environmental Responses of Agaves a case study *with Agave deserti*. En: Carlos Cruz, et al. (eds.), *Biología y Aprovechamiento integral del Henequen y otros Agaves*. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. 55-66. 1992. Annual variations in flowering percentage, seedling establishment and ramet production of a desert perennial. *Int. J. Plant Sci.* 153(1): 102-107.
- Olivares Sáenz, Emilio. 1993. Paquete de diseños experimentales FAUANL. Versión 2.4. Facultad de Agronomía UANL. Marín, N. L.
- Orozco. 1995. La destrucción de la naturaleza. Fondo de Cultura Económica, Colección La Ciencia desde México. No. 83, México.
- Pierik. 1994. In vitro culture of plants. Bibliography. Ponsen en looyen, Wageningen, Países bajos. 1-179.
- Pritchard, H. W. and Miller, A. P. 1995. The effects of constant temperatures, light and seed quality on the germination Characteristics of *Agave Americana*. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. Pp. 11-14.

- Raven, P. H. y Curtís, H. 1985. Biología vegetal. Ed. Omega S. A. Barcelona, España. Pp. 171,194-195.
- Ray, P. M. 1985. La planta viviente. Ed Continental S. A. México. P. 249.
- Ramulu K.S. y P. Dijkhuis. 1996. Flow cytometric análisis of polysomaty and *in Vitro* genetic instability in potato. Plant Cell Reports 3:234-237.
- Robert, M.L.1992. Biotechnology in Agricultura and Forestry. Vol 19 High-Tech and Micropropagation III. Ed By Y P.S. Bajaj. Springer-Verlag Berlin Heidelbergy.
- Sánchez M;E. 1996. Comercialización de cactáceas mexicanas reflexiones para la acción. Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey-Campus Querétaro. México. Pp 3-4.
- Sharp W.R. 1990. The physiology of *in Vitro* asexual embryogenesis. Paginas 268-310, en J. Janick (ed.), Horticultural Reviews, Vol. 2, Purde University, Avi Publishing Co. Westport, CT.
- Tisserat B. 1985. Embryogenesis, Organogenesis and Plant Regeneration. Paginas 79-105, en R.A. Dixon (ed.), Plant Cell Culture, a Practical Research. IRL. Press, Oxford.
- Vasil I. K. 1994. Automation of plant propagation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 39:105-108.
- Vázquez, C. 1990. Ecología y conservación de semillas. Fac. Ciencias UNAM, Rev. Ciencias, No. 4: 30-33.
- Weaver, R. J. 1998. Reguladores de crecimiento de las plantas en la agricultura. Ed Trillas. Mexico. Pp. 174-178.
- Wochok, Z.S. 1999. The role of tissue culture in preserving threateried and endangered plant species. Biological Conservation 20:83-89.

ANEXO. A

1.1. Preparación de Soluciones del medio M.S. modificado por Robert.

Macronutrientes.

1.1.1. Solución A

Solución A	Para 5 lt.
1.- NH_4NO_3 (Nitrato de Amonio)	7.2 g
2.- KNO_3 (Nitrato de Potasio)	2.525 g
3.- KH_2PO_4 (Fosfato de Potasio)	0.85 g
4.- $\text{MnSO}_4\text{H}_2\text{O}$ (Sulfato de Manganeso)	0.0845 g
5.- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Sulfato de Zinc)	0.043 g
6.- H_3BO_3 (Acido Bórico)	
7.- Inositol	

1.1.1.1. Preparación de la solución patrón

- En un matraz Erlenmeyer de 500 ml agregar 200 ml de agua destilada.
- Poner en agitación.
- Pesar cada uno de los reactivos y añadir de uno en uno (disolviendo perfectamente cada uno de ellos antes de agregar el siguiente).
- Aforar a 500ml.
- Guardar en frascos ámbar y etiquetar con el nombre de la solución, persona que preparo y la fecha.

1.1.1.2. Cloruro de Calcio



Se disuelve perfectamente 4.4 g. en 50 ml de agua destilada. Tomar 10 ml de la solución/ cada litro de medio y verter cuando se está preparando el medio

antes de las hormonas. Se añade lentamente por las paredes del matraz, ya que si se agrega rápido el medio puede precipitarse.

1.2. Solución B

Solución B (Macro)	Para 10 litros	Para 5 litros
1.-Mg SO ₄ (<i>Sulfato de Magnesio</i>)	7.40 g/lit	3.7 g/lit

1.2.1. Preparación de la solución patrón

- Disolver el sulfato de magnesio en 200 ml de agua destilada y aforar a 500 ml.
- Guardar en frascos ámbar y etiquetar con el nombre de la solución, persona que la preparo y la fecha.

1.3. Solución C (Micros)

Solución C (Micros)	g/100 ml
1.- KI (<i>Yoduro de Potasio</i>)	0.0830 gr./100 ml
2.- Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O (<i>Molibdato de sodio</i>)	0.0250 gr./100 ml
3.- CuSO ₄ 5H ₂ O (<i>Sulfato de Cobre</i>)	0.0025 gr./100 ml
4.- CoCl ₂ 6H ₂ O (<i>Cloruro de cobalto</i>)	0.0025 gr./100 ml

1.3.1. Preparación de la solución patrón

- En un matraz Erlenmeyer de 500 ml agregar 50ml de agua destilada.
- Poner en agitación.
- Pesar cada uno de los reactivos y añadir de uno en uno (disolviendo perfectamente cada uno de ellos antes de agregar el siguiente).

d) Aforar a 100ml.

e) Guardar en frascos ámbar y etiquetar con el nombre de la solución, persona que la preparo y la fecha.

1.4. Solución D (Edta-Hierro) (Micros)

Solución D	g/100 ml
1.- Na ₂ EDTA	0.373 gr./100 ml
2.- FeSO ₄ 7H ₂ O	0.278 gr./100 ml

1.4.1. Preparación de la solución patrón

a) Disolver cada uno de los reactivos por separado en 25 ml de agua destilada caliente.

b) Dejar enfriar.

c) Mezclar las dos soluciones en un matraz de aforación y completar a 100 ml.

d) Guardar en frascos ámbar y etiquetar con el nombre de la solución, persona que la preparo y la fecha.

1.5. Solución E (Vitaminas)

Solución E	g/lit.
1.- Glicina	0.0100 g/lit.
2.- Ácido nicotínico	0.0025 g/lit.
3.- Piridoxina	0.0025 g/lit.
4.- Tiamina	0.0200 g/lit.
5.- Inositol	1.000 g/lit.

1.5.1. Preparación de la solución patrón

a) Disolver cada uno de los reactivos por separado en 25 ml de agua destilada estéril.

b) Aforar a 50 ml

c) Guardar en frascos ámbar y etiquetar con el nombre de la solución, persona que preparo y la fecha.

1.6. Preparación de hormonas (reguladores de crecimiento), para inducir brotación.

1.6.1. Auxinas.

2,4-D

2,4-Dichlorophenoxyacetic acid.

Pesar 0.01g. y disolver en hidróxido de potasio 1 N (KOH).

Agregar posteriormente un poco de agua destilada, para agregarse al medio de cultivo que está preparando.

1.6.2. Citocininas.

6-Benzylaminopurina(Benziladenina)

Pesar 0.0025 g. y disolver en 1 ml de alcohol etílico (EtOH) aforar a 10 ml con agua destilada y tomar 0.1 ml para preparar un litro de medio de cultivo.

ANEXO. B

1. Asepsia de material.

1.1. Limpieza de la campana de flujo laminar.

Se prepara una solución de QRIT al 1% y con algodón se limpia perfectamente la campana de flujo. Se enciende ½ hora antes de realizar la siembra.

Una vez limpia la campana se recomienda colocar en su interior todo el material que se va a utilizar, asperjándolo previamente con alcohol etílico.

1.2. Preparación del material a utilizar en la siembra.

1 vaso de precipitado de 1 litro.

2 vasos de precipitado de 250 ml.

2 pinzas para disección.

8 cajas petri.

800 ml de agua destilada (en un matraz de 1 litro)

100 ml de cloro al 20% + dos gotas de tween 20.

100 ml de fungicida Captan.

100 ml de microdine al 10%.

Los vasos de precipitados se cubren con una capa doble de papel aluminio, se sella con una liga y guardándose en bolsas de polipapel perfectamente anudadas, para su esterilización.

Las pinzas y cajas petri se envuelven con papel de estraza, colocándoseles un trozo de cinta testigo para esterilizarlos posteriormente.

1.1.2. Campana de flujo laminar

En la campana de flujo laminar, el aire se toma del exterior, y se hace pasar a través de un filtro de poro muy fino, antes de que llegue a la mesa de la campana. Este sistema de filtrado asegura que el flujo del aire sobre la mesa es completamente estéril. Teniendo en cuenta que el flujo del aire es continuo,

a través de la cámara de inoculación, es prácticamente imposible que ninguna partícula pase desde la habitación en la que se encuentra la cámara, a esta última. Cuando no se usa, la cámara se cubre con plástico, quedando resguardada del aire del exterior. El flujo del aire puede ser regulado, y en la parte superior de la cámara se disponen tubos fluorescentes para su iluminación. Se sitúa una llave de gas sobre la mesa para el flameado, o en su defecto se utiliza un mechero de alcohol o un esterilizador seco. En este último proceso, el instrumento que se va a esterilizar se coloca durante un cierto tiempo en un aparato que contiene pequeñas esferas de cristal calientes, también llamado incinerador de bacterias.

Se recomienda que las cámaras de flujo laminar sean revisadas por un servicio técnico, una vez al año, y la mayor parte de los laboratorios prefieren hacer un contrato de mantenimiento con el suministrador.

En los laboratorios modernos las cámaras de flujo laminar se sitúan en una habitación especial (relativamente limpia) y aislada, que se mantiene estéril y libre de polvo por medio de filtros. La habitación se mantiene presurizada de manera que el aire no estéril del exterior no pueda entrar.

Los filtros de las cámaras de flujo laminar deben ser limpiados con aspiradora, de forma regular, y reemplazarlos anualmente. El suelo de la habitación en la que se encuentra la cámara, deberá ser descontaminado a diario, y se deberán utilizar en su interior calzas y batas de laboratorio limpias. Los visitantes del exterior son una fuente importante de contaminación (a través del calzado y el vestido).

Algunas indicaciones para el uso de la cámara de flujo son:

- Mantener la habitación tan limpia como se posible.
- No introducir ningún material infectado.
- Retirar los tubos o recipientes sospechosos de contaminación.
- Tan pronto como sea posible, retirar la basura en bolsas de plástico

Es necesario que antes de realizar algún procedimiento de siembra o trasplante encender la cámara de flujo por lo menos $\frac{1}{2}$ hora antes de utilizarla, y evitar la interrupción o inversión del flujo del aire, exponer la parte mas vital de la cámara al flujo directo del aire estéril, y finalmente evitar introducir la cabeza (cabello), en el interior de la cámara. En algunos laboratorios se conectan lámparas ultravioleta durante la noche para desinfectar el ambiente.

1.1.3. Esterilización de los medios nutritivos.

Antes de que las semillas sean colocadas sobre el medio (inoculación), este es esterilizado, esto es liberado de todos los microorganismos. La esterilización de los medios nutritivos se lleva a cabo en una autoclave (olla a presión de gran tamaño), así como también los materiales que se van a utilizar en la siembra. Los medios nutritivos, así como cualquier otro material esterilizado, deben ser almacenados en armarios o cajas metálicas que hayan sido previamente desinfectadas con alcohol a 96%.

1.1.4. Esterilización

La mayor parte de los medios nutritivos se esterilizan en autoclave. Este aparato (literalmente: recipiente que se cierra a si mismo), esteriliza por medio de vapor. Siempre que el tiempo de exposición sea suficiente, el vapor a presión puede destruir todos los microorganismos. Por ejemplo, un medio nutritivo con un volumen de hasta 50 ml se mantiene 20 minutos a 121° C, en vapor saturado a alta presión. El autoclave es un aparato que se puede comprar de diferentes tamaños y estilos. Este puede ser horizontal y vertical. La autoclave horizontal es más simple en su uso, pero relativamente caro. La autoclave tiene un rango de temperaturas entre 115 y 135° C. la esterilización depende de: tiempo, presión, temperatura y el volumen de objeto que se va a esterilizar.

1.1.5. Ventajas del uso de la autoclave

- Velocidad, simplicidad, destrucción adicional de los virus
- No absorción (evento que ocurre con la esterilización por filtrado).

1.1.6. Desventajas del uso de la autoclave

- Se producen cambios en el pH,
- Algunos componentes se pueden separar y se pueden producir reacciones químicas que pueden conducir a una pérdida de actividad de los componentes del medio.

1.1.7. Recomendaciones que se deben tomar en cuenta cuando se utiliza la autoclave (el tiempo se empieza a contar cuando se alcanza la temperatura indicada).

1. Tubos de ensayo y matraces, conteniendo entre 20 y 50 ml de medio nutritivo: 20 minutos a 121° C.
2. Matraces conteniendo 50-500 ml de medio nutritivo: 25 minutos a 121° C.
3. Matraces conteniendo 500-5,000 ml de medio nutritivo: 35 minutos a 121° C.
4. Tubos de ensayo vacíos, matraces y papel filtro: 30 minutos a 130° C.

Por seguridad, cuando se esterilizan frascos, no se deben acomodar demasiado apretados entre si, y suelen colocarse con los tapones sin apretar.

1.1.8. Alteraciones que puede producir el empleo de la autoclave en la esterilización de medios nutritivos (Van Braga, 1971).

- Sacarosa: Se descompone produciendo fructosa y glucosa (un medio autoclaveado que contuviese sacarosa inicialmente, pasa a tener una mezcla de diferentes azúcares.
- Ácido giberélico: Pérdida del 90% en reactividad.
- Vitamina B1: Se forma pirimidina y tiazol.

- Antibióticos.
- Extractos vegetales: Pérdida de actividad.

1.1.9. Consideraciones que deberán tomarse en cuenta durante y después de la esterilización.

1. El pH de los medios baja 0.3 - 0.5 unidades.
2. El autoclaveado a una temperatura alta puede caramelizar los azúcares, pudiéndose producir toxicidad.
3. Un proceso demasiado largo puede conducir a la precipitación de sales y al mismo tiempo despolimerizar el agar.
4. Se debe tener cuidado de utilizar la duración y temperatura correctas (presión eficaz). El *Bacillus stearothermophilis* puede ser utilizado como un indicador biológico (para ver si la esterilización se ha realizado correctamente), ya que muere por 12 - 15 minutos a 121°C.
5. Se debe tener en cuenta que las sustancias volátiles pueden ser destruidas por el uso de la autoclave, por ejemplo el éter y el etileno.
6. Si se requiere que la superficie del medio nutritivo tenga una cierta pendiente, al sacar de la autoclave, los recipientes se colocan inclinados, hasta que se solidifiquen a una temperatura de 45-80°C.
7. Se recomienda el uso de agua desionizada en el interior del autoclave, ya que el agua corriente generalmente contiene demasiado calcio, que se puede precipitar sobre el fondo del autoclave y sus sistemas de control de nivel de agua y de presión.

ANEXO. C

1. Preparación del medio de cultivo (1 litro).

1. En un matraz Erlenmeyer de 2 litros, agregar 400 ml de agua destilada y proceder con lo siguiente agitando constantemente.
- 2.- Añadir 100 ml de la solución A.
- 3.- Añadir 50 ml de la solución B.
- 4.- Añadir 1 ml de la solución C.
- 5.- Añadir 5 ml de la solución D.
- 6.- Añadir 10 ml de Cloruro de Calcio.
- 7.- Añadir 1 ml de la solución E.
- 8.- Pesar aparte 30 gr. de sacarosa, disolver en la solución.
- 9.- Completar el volumen a 900 ml con agua destilada.
- 10.- Añadir hormonas requeridas (Solo en el caso de inducción de brotes).
- 11.- Ajustar el pH de 5.7 a 5.8.
- 12.- Aforar a 1 litro.
- 13.- Vaciar en un matraz Erlenmeyer de 2 litros de capacidad.
- 14.- Agregar 8 gr. de agar bacteriológico.
- 15.- Tapar con una torunda de algodón.
- 16.- Clarificar en un mechero de Bunsen.
- 17.- Distribuir en recipientes y esterilizar en la autoclave.

Nota: Cuando se utiliza el medio para germinación se excluye el punto No. 10, es decir las hormonas no son necesarias, para lograr la germinación.