

FECHA DE ADQUISICIÓN	
NUM. DE INVENTARIO	00262
PROCEDENCIA	
NUM. CALIFICACIÓN	
PRECIO	
DIST.	



TL00262

SB317
.A2
.M37 2006
TESIS LAG
Ej.2

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN DE CARRERAS AGRONÓMICAS



**PRODUCCIÓN IN VITRO DE *Agave durangensis*, COMO
ALTERNATIVA DE DESARROLLO SUSTENTABLE EN ZONAS
SEMIÁRIDAS**

POR

FILIBERTO MARTÍNEZ LARA

T E S I S

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

INGENIERO AGRÓNOMO

TORREÓN, COAHUILA

ENERO DEL 2006

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
UNIDAD LAGUNA**

**PRODUCCIÓN IN VITRO DE *Agave durangensis*, COMO
ALTERNATIVA DE DESARROLLO SUSTENTABLE EN ZONAS
SEMIÁRIDAS**

TESIS

PRESENTADA POR:

FILIBERTO MARTÍNEZ LARA

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

INGENIERO AGRÓNOMO

COMITÉ EVALUADOR

PRESIDENTE:



MC. AMANDA JARAMILLO SANTOS

VOCAL:



M.C. HÉCTOR MONTAÑO RODRIGUEZ

VOCAL:



BIOL. MARIA DE JESÚS RIVERA GONZÁLEZ

VOCAL SUPLENTE:



M.C. JOSÉ JAIME LOZANO GARCÍA

COORDINADOR DE LA DIVISIÓN DE CARRERAS AGRONÓMICAS



M.C. JOSÉ JAIME LOZANO GARCÍA

TORREÓN, COAHUILA


**Coordinación de la División
de Carreras Agronómicas
ENERO DEL 2006**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
UNIDAD LAGUNA**

**PRODUCCIÓN IN VITRO DE *Agave durangensis*, COMO
ALTERNATIVA DE DESARROLLO SUSTENTABLE EN ZONAS
SEMIÁRIDAS**

TESIS

ELABORADA POR:

FILIBERTO MARTÍNEZ LARA

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

INGENIERO AGRÓNOMO

COMITÉ ASESOR

ASESOR PRINCIPAL:



MC. AMANDA JARAMILLO SANTOS

ASESOR:



M.C. HÉCTOR MONTAÑO RODRIGUEZ

ASESOR:

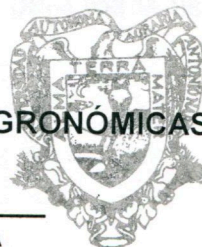


BIOL. MARIA DE JESÚS RIVERA GONZÁLEZ

COORDINADOR DE LA DIVISIÓN DE CARRERAS AGRONÓMICAS



M.C. JOSÉ JAIME LOZANO GARCÍA



TORREÓN, COAHUILA

**Coordinación de la División
de Carreras Agronómicas
ENERO DEL 2006**

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS

DEDICATORIAS

	INTRODUCCIÓN.....	1
CAPITULO		
I		
1.1	Planteamiento del problema.....	3
1.2	Justificación.....	4
1.3	Objetivos.....	5
1.4	Metas.....	5
CAPITULO		
II	REVISIÓN DE LITERATURA.....	6
2.1	Origen y distribución.....	6
2.2	Descripción botánica.....	7
2.3	Clasificación taxonómica.....	8
2.4	Aspectos generales de la germinación.....	9
2.5	Brotación de la hoja cotiledonar.....	10
2.6	Suelo y clima.....	10
2.7	Propagación.....	10
2.8	Usos.....	11
2.9	Historia de Cultivo de tejidos.....	12
2.10	Micropropagación de Agaves.....	14
2.10.1	Etapas del desarrollo de plántulas <i>in vitro</i>	18
2.10.2	Principales aplicaciones de cultivo de tejidos.....	19
2.10.3	Tipos de propagación <i>in vitro</i>	20
2.11	Medio de cultivo.....	20
2.11.1	Componentes del medio de cultivo.....	21
2.12	Fuentes de carbono.....	22
2.13	Vitaminas.....	23
2.13.1	Vitaminas comúnmente usadas.....	23
2.14	Otras fuentes de nitrógeno.....	24
2.15	Suplementos orgánicos indefinidos.....	25
2.16	Reguladores de crecimiento.....	25
2.16.1	Auxinas.....	26
2.16.2	Citocininas.....	29
2.17	Organogénesis.....	31
2.18	Etileno.....	33

2.19	Agente gelificante.....	33
2.20	Agua.....	34
2.21	Factores que intervienen en el cultivo de tejidos.....	34
2.22	Propiedades físicas del medio.....	35
2.22.1	Factores físicos.....	35
2.22.2	Intercambio gaseoso.....	36
2.22.3	Humedad.....	36
2.22.4	Luz.....	36
2.22.5	Temperatura.....	36
2.22.6	Factores químicos.....	37
2.23	Fotosíntesis.....	37
2.24	Fotomorfogénesis.....	37

CAPITULO

III MATERIALES Y MÉTODOS..... 39

3.1	Localización del experimento.....	39
3.2	Estructura física.....	39
3.3	Diseño experimental.....	39
3.4	Material vegetal.....	40
3.5	Preparación del medio de cultivo para germinación y para inducir brotación.....	40
3.6	Marcha para la siembra.....	41
3.7	Limpieza de la campana laminar.....	41
3.8	Desinfección y siembra de la semilla para los tratamientos 1 y 2.....	42
3.9	Siembra para germinación de semillas y trasplante.....	42
3.10	Variable evaluadas.....	43

CAPITULO

IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... 45

4.1	Porcentaje de germinación.....	45
4.2	Días a brotación de la hoja cotiledonar.....	47
4.3	Días de aparición de la 1ª hoja verdadera.....	49
4.4	Formación de brote.....	51
4.5	Formación de callo.....	53

CAPITULO

V CONCLUSIONES..... 56

CAPITULO

VI RECOMENDACIONES..... 57

BIBLIOGRAFÍA..... 58

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO	TÍTULO	PÁGINA
1	Propagación <i>in vitro</i> de diversas especies del género <i>Agave</i>	15
2	Escala para evaluar la presencia de callo en cada uno de los tratamientos.....	44
3	Resultados obtenidos sobre el porcentaje de germinación de semillas de <i>Agave durangensis</i> germinadas en medio de cultivo MS sin hormonas.....	46
4	Análisis de varianza para el porcentaje de germinación de semillas de <i>Agave durangensis</i> , germinadas en medio de cultivo MS sin hormonas.....	67
5	Comparación de medias para el porcentaje de germinación de semillas de <i>Agave durangensis</i> germinadas en medio de cultivo MS sin hormonas.....	47
6	Resultados obtenidos para días a brotación de la hoja cotiledonar de semillas de <i>Agave durangensis</i> germinadas en medio de cultivo MS.....	48
7	Análisis de varianza para la brotación de la hoja cotiledonar de <i>Agave durangensis</i> , germinadas en medio de cultivo MS sin hormonas, con datos ordenados en un cuadro completamente al azar.....	67
8	Comparación de medias para la brotación de la hoja cotiledonar de <i>Agave durangensis</i> , germinadas en medio de cultivo MS sin hormonas, con datos ordenados en un cuadro completamente al azar.....	48

9	Resultados obtenidos en los días de aparición de la 1ª hoja verdadera de <u>Agave durangensis</u> germinadas en medio de cultivo MS.....	50
10	Análisis de varianza para la aparición de la 1ª hoja verdadera de <u>Agave durangensis</u> , germinadas en medio de cultivo MS sin hormonas, con datos ordenados en un cuadro completamente al azar.....	68
11	Comparación de medias para la aparición de la 1ª hoja verdadera de <u>Agave durangensis</u> , germinadas en medio de cultivo MS sin hormonas, con datos ordenados en un cuadro completamente al azar.....	50
12	Resultados obtenidos para la formación de brotes axilares en plántulas de <u>Agave durangensis</u> , germinadas en medio de cultivo MS con hormonas, modificado por Robert, cuyos datos son analizados individualmente, de acuerdo a cada tratamiento.....	52
13	Análisis de varianza para la formación de brotes axilares de <u>Agave durangensis</u> , germinadas en medio de cultivo MS con hormonas, modificado por Robert, con datos ordenados en un cuadro completamente al azar.....	68
14	Comparación de medias para formación de brotes axilares de <u>Agave durangensis</u> , germinadas en medio de cultivo MS con hormonas, modificado por Robert.....	52
15	Resultados utilizados para el análisis de varianza para la formación de callo en plantas de <u>Agave durangensis</u> , germinadas en medio de cultivo MS con hormonas, modificado por Robert.....	54

16	Análisis de varianza para la formación de callo en <u>Agave durangensis</u> , germinadas en medio de cultivo MS con hormonas, modificado por Robert.....	69
17	Comparación de medias para formación de callo en cada uno de los tratamientos en <u>Agave durangensis</u> , germinadas en medio de cultivo MS con hormonas, modificado por Robert.....	54

ÍNDICE DE FIGURAS

PÁGINA

Figura 1	Porcentaje de germinación de <u>Agave durangensis</u>	46
Figura 2	Días de brotación de la hoja cotiledonar de semillas de <u>Agave durangensis</u>	49
Figura 3	Días de aparición de la 1ª hoja verdadera de de <u>Agave durangensis</u>	51
Figura 4	Comparación de medias en la formación de brotes axilares de <u>Agave durangensis</u>	53
Figura 5	Formación de callo en <u>Agave durangensis</u>	55

ÍNDICE DE ANEXOS

PÁGINA

Anexo A	Preparación del medio MS modificado por Robert. (Soluciones stock).....	62
Anexo B	Preparación del medio de cultivo para germinación.....	66
Anexo C	Análisis de varianza de los tratamientos 1 y 2.....	67

INTRODUCCIÓN

Las técnicas de micropropagación o propagación *in vitro* tienen la ventaja de producir grandes cantidades de plantas en espacios relativamente reducidos y durante todo el año; a diferencia de los métodos convencionales de propagación, ya sea por semilla, hijuelos (rizomas) o bulbillos, con los cuales sólo se realiza la actividad una vez por año.

Generalmente, las técnicas de propagación *in vitro* mimetizan eventos naturales, como la producción de embriones. Estas formas de propagación no siempre se utilizan simplemente con el propósito de una producción masiva de plantas de alto valor, sino que también para mejorar genéticamente alguna especie de interés para el hombre. La producción de variación genética y la selección celular son, entre otras, técnicas que se pueden realizar a nivel celular en lugar de manipular plantas completas en grandes extensiones de tierra.

A partir del descubrimiento de que las plantas pueden ser clonadas con mayor rapidez *in vitro*, en los últimos años se ha incrementado el conocimiento concerniente a la micropropagación.

La relación entre la cultura prehispánica con los magueyes era muy íntima como fuente primordial de sustento, alimento y vestido, tradición que no ha sido heredada por las generaciones actuales. Aún así, es usado para la producción de bebida, cuerdas, madera, forraje en zonas marginadas.

El uso como bebida se conserva en determinadas regiones del país como Oaxaca, Michoacán, Guerrero, Jalisco, Guanajuato, Zacatecas, Durango, Sonora, Tamaulipas. Obteniendo el Mezcal o bacanora como bebida. En la actualidad esta fuerte bebida ha tenido una gran demanda nacional e internacional y la producción actual ha sido rebasada por la misma.

Esto provocó una explotación irracional y desmedida del recurso natural, por lo cual las autoridades han exigido a los productores que produzcan su propia planta a través de la enorme variedad de germoplasma que existe en las diversas regiones del país.

Es por eso importante que las instituciones proporcionen tecnología de producción de planta a los productores de mezcal.

En el trabajo realizado se busca la producción de planta genéticamente vigorosa de *Agave durangensis in vitro* como alternativa sustentable para la región de Durango.

El uso de semilla como germoplasma, su germinación, crecimiento y su posterior micropropagación o multiplicación *in vitro* se realiza en laboratorio de cultivo de tejidos.

Los resultados obtenidos son positivos y alentadores ya que la producción masiva de plantas por esta técnica se puede desarrollar ampliamente, con bajo costo y conservando la variedad del germoplasma.

CAPITULO I

1.1. Planteamiento del problema

La escasez de la planta de agave utilizada con fines de producción de mezcal, y el consecuente riesgo de extinción de la especie, esta ocasionando problemas de tipo ecológico, social y económico, ya que en la actualidad la práctica de producción genera empleos para los habitantes de las comunidades de las principales entidades en las cuales el agave se presenta de manera natural.

Actualmente el territorio nacional se caracteriza por presentar una amplia diversidad vegetal dada sus características topográficas. A últimas fechas, esta diversidad se ha visto afectada.

Algunas causas de extinción de especies son: exceso de recolección de las mismas, la cual excede a la tasa natural de reproducción; el gran desarrollo demográfico, el cual limita el hábitat característico de estas especies.

La alteración de los ecosistemas por acción antropogénica actúa directamente en la disminución de los individuos, ocasionando con ello pérdida de la diversidad genética.

La explotación se realiza sin técnica alguna, la recolección de material es indiscriminada, sin considerar la edad o madurez de la planta, sin tomar en cuenta la variedad de los individuos en una comunidad.

En la actualidad algunos productores forman sus parcelas de magueyes por medio de la recolección de hijuelos de las plantas adultas, siendo esto una especie de clonación, esto es lento y no hay información de la edad del producto.

Se considera que produciendo la planta a través de semilla se mantiene la variación genética, es importante porque se localizan y conservan las áreas de posibles bancos de germoplasma de las regiones productoras del recurso.

Es necesaria la concientización de los productores de que esta es una alternativa de producción redituable, que les permitirá una rápida recuperación del recurso y les permitirá llevar un control de la edad de sus plantas para realizar una rotación de producción, también se podrá determinar los ejemplares con mejores características para una mejor producción de tipo sustentable

1.2. Justificación

El mercado de las bebidas producidas a partir de agave, está adquiriendo importancia internacional, razón por la cual los esfuerzos de investigación deben ser mayores, con la finalidad de encontrar respuestas científicas a los problemas de selección y mejoramiento genético, que acorten tiempos de maduración de la planta, y paralelamente cuidar la sobreexplotación de la misma, con la finalidad de preservar el ecosistema.

Para ayudar a minimizar los daños ecológicos causados por la devastación de éste tipo de especies, y con la finalidad de apoyar a los productores a seguir utilizando estas especies pero de una manera controlada, en las regiones semiáridas, se propone el presente proyecto, el cual consiste en la producción de planta de agave, por medio de la micropropagación del cual se espera obtener plantas genéticamente vigorosas, y de rápido crecimiento, del cual los conocimientos generados serán transferidos a los productores.

Esta transferencia hacia los productores es necesaria, la determinación de todo un paquete tecnológico sustentable sobre el cultivo es función principal de las universidades del país.

La escasez de la planta de agave utilizada con fines de producción de mezcal, y el consecuente riesgo de extinción de la especie, va a ocasionar problemas de tipo ecológico, social y económico, ya que en la actualidad la práctica de producción genera empleos para los habitantes de las comunidades de las principales entidades en las cuales el agave se presenta de manera natural.

Los efectos de la degradación del suelo son numerosos: deterioro de flora y fauna, desequilibrio del ciclo hidrológico, disminución de la diversidad, disminución de la capacidad alimentaría, etc. Esto provoca la atención en el ámbito mundial, por la producción de la desertificación, una medida de apoyar a este problema es la propagación rápida de vegetación propia de estas zonas.

En la actualidad ya existe el problema de la falta de planta para la producción de mezcal en el área de Durango, es adecuada la vinculación entre los productores y la Universidad Antonio Narro para la producción de planta y que sea aprovechada por los grupos marginados de la región.

1.3. Objetivos

General:

Producción de plántulas de *Agave durangensis*. Como alternativa sustentable.

Particular:

Multiplicación de plántulas de *Agave durangensis* in vitro.

1.4. Metas

Al término de la investigación se pretende determinar la metodología que permita obtener plantas de esta especie mediante la técnica de cultivo de tejidos, mismas que podrán ser utilizadas en posteriores investigaciones encaminadas a la obtención de plantas genéticamente vigorosas a partir de la técnica de cultivo de tejidos.

CAPITULO II

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Origen y distribución

Los agaves son plantas monocotiledóneas, pertenecientes a la familia agavaceae en la cual se incluyen cerca de 300 especies, habitantes comunes en regiones de baja precipitación conocidas como áridas y semiáridas, las cuales comprenden alrededor del 25 % de la superficie de América del Norte y del Sur. De las especies registradas, más de 150 son endémicas de México. Los estados más ricos en diversidad de especies de agaves son: Chihuahua, Sonora, Coahuila, Durango y Jalisco. El agave forma parte de la vegetación natural del Estado de Durango, más de 40 especies de Agave se encuentran en el mismo. (Ramírez 1996).

El genero agave tiene su centro de origen y diversidad en México; su distribución geográfica natural se extiende hacia el norte del país hasta el sureste de Estados Unidos y hacia el sur del país hasta Nicaragua (Martínez 1994).

Al nombre maguey se le atribuye un origen Caribeño- Antillano, aunque hay referencias al uso de este nombre para la planta en México desde la época colonial (Goncalves 1956).

El genero agave, cuyo nombre viene del griego y significa admirable, fue descrito inicialmente por Linneo en 1753 siendo la primera especie *Agave americana*. Existen en la republica mexicana 272 especies de las 310 que existen en el continente del género agave, de la familia agavaceae (Granados 1999).

Existen otras plantas productoras de aguamiel que son de menor importancia, ya sea por que su cultivo es de poca producción y también por que el producto tiene

menos calidad, entre estas variedades se encuentran los magueyes conocidos: cimarrón, penca larga, cenizos, etc.; se diferencian unas especies de otras por el color, longitud, anchura y la forma de sus hojas, además por la cantidad y relativa apreciación popular de sus productos como aguamiel y forraje (Ramírez 1996).

La clasificación de los magueyes (Ramírez 1996) se basa principalmente en las siguientes características:

- a) Disposición y número de hojas.
- b) Forma, tamaño, color, consistencia y textura de las hojas.
- c) Forma, tamaño, color y disposición de las espinas marginales y de la púa terminal.
- d) Forma del eje floral y de la yema central.
- e) Tipo de inflorescencia y forma de la flor.
- f) Existencia de estolones o rizomas secundarios.
- g) Forma del tallo.

2.2. Descripción Botánica

Las plantas del género *Agave* se caracterizan por raíces duramente fibrosas, radiadas y extendidas superficialmente; tallos gruesos, muy cortos, usualmente más cortos que la yema terminal, simple o ramificada; hojas largas, generalmente suculentas, protegidas o desprotegidas con dientes sobre los márgenes, con una espina aguda muy dura; la presencia de una roseta suculenta monocárpica o policárpica, perenne o multianual con larga vida de sus hojas; floración única después de ocho a veinte años; frecuentemente con vástagos en la base y ocasionalmente propágulos en la inflorescencia; inflorescencia con escapo alto, espigada o racimosa o paniculada con las flores en grupos umbeladas, bracteadas; flores en su mayoría largas, generalmente proterandras; perianto tubular o superficialmente cónico, los seis segmentos erectos o variablemente curvos, similares o dimorfos, imbricados en la yema. Seis estambres; filamentos

largamente proyectados, insertados en tubo o sobre la base del tepalo; anteras versátiles; ovario ínfero, con tres celdas, succulento, paredes gruesas con numerosos óvulos afilares en dos filas por celda; pistilo elongado, filiforme, tubular, estigma trilobular, con papilas glandulares; el fruto es capsular dehiscente loculícida; las semillas son planas (viables), (Valenzuela 2003).

El maguey florece solo una vez, ya que poco después de este muere. Cuando va a florecer sale de su cogollo un tallo floral llamado quiote que se desarrolla rápidamente, si se toma en cuenta el lento crecimiento de la planta. El quiote alcanza de 4 a 5 metros de altura y en su extremo superior se desarrolla la inflorescencia en forma de racimo con varias ramificaciones que tienen varios grupos de flores, de color verde amarillento. La edad de floración depende de la variedad, del suelo, clima, cultivos. Los magueyes cultivados florecen entre los 8 y 12 años y otros más tiempo (Ramírez 1996).

2.3. Clasificación taxonómica

Reino :	Vegetal.
Sub-reino:	Cormophyta.
Tipo:	Angiospermas.
Clase:	Monocotiledónea.
Orden:	Amarilidaceae.
Familia:	Agavaceae.
Sub-familia:	Agavoideae.
Género:	Agave
Especie:	Duranguesis

(Luna 2003).

2.4. 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).

La semilla es una unidad reproductiva compleja, característica de las plantas vasculares superiores, que se forma a partir del óvulo vegetal, generalmente después de la fertilización (Vázquez 1997).

Las características estructurales y funcionales de las semillas juegan un papel substancial en la sobrevivencia de los individuos y determinan en gran parte el éxito o el fracaso de las especies en un hábitat particular (Granados 2001).

Para la iniciación de la germinación, 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).

Bassin y Baskin (1990). Freeman (1994), Nóbél (1991), 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.

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

2.5. Brotación de la hoja cotiledonar

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%.

2.6. Suelo y clima

Por la rusticidad propia del maguey se acostumbra plantarlos en terrenos cerriles ya que en estos se desarrolla bien y casi no hay cultivo que se adapte mejor en este tipo de suelos. Puede cultivarse desde luego en terrenos planos y fértiles y no obstante su rusticidad y resistencia responde bien a los fertilizantes pero por no ser tan remunerativo económicamente como otros cultivos por el largo periodo de tiempo que tarda en llegar a su madurez, no se prefiere para el maguey esta clase de suelos (Ramírez 1996).

2.7. Propagación

La propagación de la planta puede hacerse en dos formas: Sexual (semilla) y Asexual (hijuelos o propagulos)..

La primera forma ha caído en descenso y en la actualidad nadie la práctica debido a que es más tardada la obtención de plantas y porque se obtienen variedades

diversas de la especie, originadas por la fecundación de la semilla con polen de otras plantas y no es posible propagar lo que realmente se desea y se prefiere ya sea por su mayor producción de aguamiel, por la calidad de esta, por el rápido desarrollo de la planta (Ramírez 1996).

El mismo autor menciona que la propagación por semilla es poco usada porque tiene el inconveniente de que la planta tardara más en llegar a su madurez, pues necesita hasta 20 años o más para ello y además una parte de las semillas son estériles. Siendo la propagación por hijuelos el método más usado; se dejan los hijuelos junto a la planta madre de 2 a 4 años hasta que alcancen 1 metro de ahí se plantan en su lugar definitivo.

2.8. Usos

Innumerables son los usos o aportaciones que esta planta ha brindado para la humanidad. Toda entera sirve como leña y para cercar los campos, sus tallos se aprovechan como madera, sus hojas para cubrir los techos, como tejas, como platos, o fuentes para hacer papiro (papel), para hacer hilo con que se fabrica calzado, telas y toda clase de vestidos que entre nosotros suelen hacerse de lino, cáñamo, algodón u otras materias semejantes, de las puntas hacen clavos y púas con que solían los indios perforarse las orejas para mortificar el cuerpo cuando rendían culto, hacen también alfileres, agujas, abrojos de guerra y rastrillos para peinar la trama de las telas, del jugo que mana de él y que destila en la cavidad media cortando los renuevos interiores u hojas más tiernas con cuchillos de *iztli* (y del cual produce una sola planta cincuenta ánforas), fabrican vinos, miel, vinagre, azúcar, dicho jugo provoca las reglas, ablanda el vientre, provoca la orina, limpia riñones y la vejiga, rompe los cálculos y lava las vías urinarias. También de la raíz de hacen sogas muy fuertes y útiles para muchas cosas. Las partes más gruesas de la hojas así como el tronco, cocidas bajo la tierra (modo de cocción que los chichimecas llaman barbacoa) son buenos para comerse y saben a sidra aderezada con azúcar, cierran además de modo admirable las heridas recientes,

En 1922 Haberlant y Kotte cultivaron ápices radiculares de chícharo y maíz en un medio enriquecido con sales inorgánicas, glucosa, peptona, asparagina y varios aminoácidos, partiendo de la idea de obtener condiciones alimentarias semejantes a los tubos de floema.

Robbins (1922) con la misma idea enriquece el medio de cultivo con glucosa, agar y sales inorgánicas para el cultivo de ápices radiculares de varias especies.

Gutheret (1934) reporta que los cultivos de cambium de *Salix caprea* y *Populus nigra* se observa un desarrollo semejante al crecimiento de las algas, si el cambium se cultiva en medio solidificado, conteniendo solución de Knop, glucosa y cisteina hidrociorada.

Robbins (1936), estudio el efecto de los microelementos inorgánicos y señaló que el zinc, manganeso y boro son necesarios para el cultivo de ápices radiculares.

Morel y Martin (1952) son los primeros investigadores que logran obtener plantas libres de virus en dalia a partir de meristemas ápicales de tallo.

Murashige y Skoog (1962) desarrollaron un medio nutritivo con el que lograron un crecimiento rápido en tejidos de tabaco, en la actualidad las sales inorgánicas de ese medio de cultivo se usan con bastante éxito en casi todas las especies.

Durante 1974, los estudios que se realizaron fueron sobre citología, fusión de protoplastos, producción de metabolitos secundarios, fitomejoramiento, propagación y mutagenesis.

Murashige, Serpa y Jones (1974) por medio del uso de yemas apicales como inóculos iniciales, obtuvieron un método para la multiplicación masiva de *Gerbera jamesonii*.

Márton y Maliga (1975) demostraron que la resistencia adquirida mediante la utilización de la técnica de cultivo in vitro no persiste en la regeneración de plantas, porque está controlada por un factor mendeliano simple.

Osborne (1976) sugirió que el gradiente de auxinas y etileno se puede ajustar entre las células. Con la interacción se explican algunos aspectos de control de la velocidad, extensión y orientación del crecimiento celular; en este caso, el etileno puede ser un factor crítico en la expresión morfogénica.

Knauss y Knauss (1979) sugirieron que uno de los problemas de mayores consecuencias en cultivo de tejidos vegetales es la contaminación bacteriana que se presenta en las etapas de multiplicación y/o enraizamiento. Frecuentemente, la desinfección previa es insatisfactoria, por lo que opinan que el preacondicionamiento del inóculo en un ambiente frío y seco es útil para resolver el problema de la contaminación, además mencionan que no es conveniente el uso de gentamicina en cultivo de células vegetales.

Marg, Umiel y Nitzan (1983) observaron que los cultivos de tejidos no diferenciados (callos) de tabaco fueron más sensibles al cloranfenicol (CAF) que los tejidos diferenciados (yemas). La diferencia se manifiesta especialmente en un régimen de oscuridad por la falta de luz azul y ultravioleta. La fotodegradación del cloranfenicol se mostró en intervalos de afluencia de luz moderada ($6-15 \text{ W/m}^2$) evidentemente, los productos finales de la fotodegradación pueden ser o no tóxicos, de acuerdo con el régimen de irradiación. Ellos discuten el establecimiento de un sistema de selección para la resistencia a químicos, especialmente los usados en cultivo de tejidos vegetales.

2.10. Micropropagación de Agaves

La utilización del cultivo de tejidos en el género *Agave*, se ha llevado a cabo sobre todo en especies de importancia económica o en especies en peligro de extinción.

Enseguida (Cuadro 1) se resumen las especies en las cuales se han realizado trabajos con cultivo de tejidos.

Cuadro 1. Propagación *in vitro* de diversas especies del género *Agave*

Especie	Explante	Respuesta morfogénica	Referencia
<i>A. arizonica</i> Gentry Weber	Bulbilos	Callo Organogénesis	Powers y Backhaus 1989
<i>A. atrovirens</i> Karw	Yemas axilares	Organogénesis	Madriral-Lugo <i>et al.</i> , 1989
<i>A. cantala</i> Robx	Rizomas	Organogénesis	Binh <i>et al.</i> , 1990
<i>A. fourcroydes</i> Lem	Rizomas	Proliferación de yemas axilares y organogénesis	Robert <i>et al.</i> , 1987
	Tallos	Organogénesis	Madriral-Lugo <i>et al.</i> , 1989
	Rizomas		
<i>A. schidigera</i> Lem	Rizoma	Organogénesis	Binh <i>et al.</i> , 1990
	Hijuelos	Proliferación de yemas axilares	Rodríguez-Garay (no publicado)
<i>A. sisalana</i> Perrine	Rizomas	Organogénesis	Binh <i>et al.</i> , 1990
	Rizomas	Prolifereción de yemas	Das, 1992
	Hojas jóvenes	axilares	
<i>Agave</i> sp	Semillas	Organogénesis	Greenewald <i>et al.</i> , 1977
<i>A. tequilana</i> Weber	Tallos	Organogénesis	Castro C. <i>et al.</i> 1990
	Hojas	Organogénesis	Santacruz-Ruvalcaba y Rodríguez-Garay (no publicado)
<i>A. victoriae-reginae</i> Moore	Embriones somáticos	Proliferación de yemas axilares	Rodríguez-Garay y <i>et al.</i> , (en prensa)

Las técnicas que utiliza la micropropagación son esencialmente sencillas y pueden realizarse satisfactoriamente aún en casa; el requisito principal inicial es satisfacer las condiciones de asepsia requeridas. El trabajo puede facilitarse

destinando áreas y equipo apropiado para las diferentes tareas, que incluyen la preparación del medio de cultivo y la siembra e incubación de los inóculos.

La asepsia se define como el conjunto de técnicas que impiden el acceso de microorganismos a un lugar determinado, siendo en este caso, el frasco con el medio de cultivo. La propagación *in vitro* se lleva a cabo en un laboratorio conformado básicamente por tres salas o áreas, en ellas se llevan a cabo las labores de preparación del medio de cultivo, siembra *in vitro* de los inóculos así como la incubación del material sembrado, requiriéndose en las dos últimas un control sanitario estricto (Barba 2001).

El cultivo de tejidos es un termino usado para indicar el cultivo aséptico *in vitro* de las diferentes partes de la planta, considerándoseles a estas, como explantes o inóculos que pueden variar desde pedacitos de tallos, hojas, yemas raíz, hasta células individuales, los cuales tienen la potencialidad de diferenciación en una dieta balanceada de nutrientes y hormonas (Barron 1999).

Los métodos de cultivo de tejidos están ya establecidos en la agricultura y en la horticultura para la propagación clonal de genotipos selectos. Esta importante función de la tecnología de cultivo de tejidos (*in vitro*) ha aumentado enormemente con los adelantos que se han producido durante los último años en los método para la erradicación de patógenos, manipulación genética, conservación genética y el adelanto más reciente adquisición y distribución de germoplasma (withers, 1985).

El cultivo *in vitro* es un poderoso auxiliar para confirmar o descubrir estructuras y su metabolismo celular y subcelular, actualmente se esta utilizando, para reproducir, condiciones asépticas en mayor cantidad y menor espacio, organismo de interés alimenticio, medicinal, ecológico e industrial.

El obstáculo inicial para el cultivo de tejidos fue mantener viva la porción extraída, esto permitió conocer mucho de la fisiología del organismo estudiado, el otro paso fue procurar la multiplicación celular de tal modo que se crearon líneas completas del organismo (Ramírez 1999).

El cultivo de tejidos de plantas depende de la selección de los nutrimentos del medio de cultivo e indican que las células de muchas especies de plantas pueden crecer en medios completamente definidos. Sin embargo el criterio varía y muchos medios que han sido reportados como óptimos frecuentemente responden a la adición de un suplemento orgánico, lo que indica un requerimiento. En muchos casos éstos pueden suplementarse incrementando las concentraciones de sales inorgánicas.

La eficiencia de un medio de cultivo debe ser adecuadamente probada y comparada con un medio ya existente, para demostrar su reproducibilidad, así, es necesario un mínimo de tres subcultivos con mediciones cuantitativas de crecimiento contra un medio estándar, para determinar el merito de un nuevo medio (Ramírez J. 1996).

La micropropagación es un área en la que se puede obtener aplicaciones a más corto plazo no solo por ser la más sencilla, si no porque se puede emplear de inmediato en forma comercial (Robert 1985).

La biotecnología es considerada como un área de la ciencia y la tecnología de las conocidas actualmente como "tecnologías de punta", de acelerado desarrollo en la última década, es definida como un conjunto de técnicas que emplean sustancias vivas para modificar un producto o servicio.

Después de un amplio análisis de la misma como posible alternativa de mejoramiento en los niveles de vida de la gente que habita en los países en vías de desarrollo.

En particular, el cultivo de tejidos vegetales como una rama de la biotecnología, ofrece importantes aplicaciones en la agricultura, tal es el caso de la micropropagación de cultivares, la preservación de germoplasma y el mejoramiento genético (Ramírez 1996).

Cuando se utilizan los recursos naturales sin conocer sus ciclos de vida, evitamos que las poblaciones silvestres se recuperen. Si bien representan recursos naturales, no debemos olvidar que son seres vivos al igual que nosotros", acotó el científico. Una propuesta para revertir esta situación es la Regeneración *in vitro* del agave (Grupo Reforma 2005).

Las plantas propagadas bajo condiciones *in vitro* presentan diferentes grados de variabilidad genética, dependiendo del sistema de propagación o regeneración que se utilice. Mediante el cultivo de yemas y meristemas se producen prácticamente copias de las plantas, esto, desde el punto de vista hortícola es una ventaja, pero para efectos de conservación no lo es. Cuando se someten especies amenazadas a un proceso de clonación de este tipo, es importante utilizar diferentes genotipos o variantes de la especie de diferentes áreas, además de numerar o nombrar los diferentes clones para mantenerlos identificables, esto es importante si las plantas serán utilizadas en programas de reintroducción ya que se ha visto que muchas especies de cactáceas presentan problemas de autoincompatibilidad (Soltero 1999).

2.10.1. Etapas del desarrollo de plántulas *in vitro*

Estas fueron descritas por Murashige (1974), las cuales han sido adoptadas ahora para un amplio número de variedades de material vegetal propagado para investigación o comercio (Barrón 1999), estas etapas son:

Etapa 1.- desinfección y establecimiento del explante. En esta etapa se selecciona el explante, se desinfecta superficialmente para la eliminación de

patógenos. La desinfección de la superficie generalmente involucra el lavado del tejido, seguido por esterilización con uno o más desinfectantes.

Etapa 2.- multiplicación del tejido. Se refiere a la rápida multiplicación del material de la etapa 1, que es repentinamente subcultivado en la etapa 2, hasta tener un número de propágulos o plantas deseadas.

Hay tres procedimientos usados para la multiplicación clonal de las plantas durante la etapa 2 y se enumeran a continuación.

1. Embriogénesis somática.
2. Desarrollo de ramificación axilar.
3. Desarrollo de brotes adventicios.

Etapa 3.- Enraizamiento *in vitro*, los brotes derivados de la micropropagación pueden ser inducidos para producir raíz, los mejores resultados son obtenidos cuando los brotes de la etapa 2 son transferidos a un medio de enraizamiento.

Etapa 4.-Aclimatación. Es el proceso por el cual la planta *in vitro*, se adapta al cambio ambiental. Es necesaria la aclimatación, porque las plantas no están adaptadas a las condiciones *in vivo*.

2.10.2. Principales aplicaciones de cultivo de tejidos

Esta tiene 4 aplicaciones potenciales:

- a. Producción de metabolitos secundarios.
- b. Mejoramiento genético y almacenamiento de germoplasma.
- c. Producción de plantas libres de enfermedades.
- d. Rápida propagación (micropropagación).

De las anteriores, son dos las áreas en que son de importancia comercial principalmente, la micropropagación y la producción de metabolitos secundarios (Barrón 1999).

2.10.3. Tipos de propagación *in vitro*

Barrón 1999, menciona que existe gran variedad de procesos, para el mejoramiento genético y para una rápida multiplicación vegetativa, entre ellos están:

1. Cultivo de embriones maduros e inmaduros.
2. Cultivo de órganos: cultivo de un órgano de la planta con el fin de propagarla, por ejemplo: meristemos, ápices, yemas axilares solas o segmentos nodales.
3. Cultivo de callos: corresponde al conjunto de células procedentes de la desorganización de un tejido y presenta células no diferenciadas que conservan el poder de dividirse.
4. Cultivo de células en suspensión: La suspensión de células consiste de células libres y microagregados de células en un medio líquido en movimiento.
5. Cultivo de protoplastos: Es el cultivo de células sin pared pectocelulósica, es decir células con sus componentes vivos, rodeados solamente por la membrana citoplasmática, este es el caso adecuado para la manipulación genética.
6. Cultivo de haploides o anteras: Consiste en el cultivo de anteras con polen inmaduro, donde el polen se divide para formar callo o embriones, utilizado principalmente para la obtención de plantas haploides.

2.11. Medio de cultivo

El medio de cultivo es una combinación de sustancias químicas descritas por los investigadores después de numerosos experimentos, el cual permite que las plantas crezcan y se multipliquen *in vitro*.

El éxito de cultivo de tejidos, está determinado grandemente por la calidad del medio nutritivo, ya que la composición de este gobierna el crecimiento y morfogénesis del tejido vegetal cultivado.

Una vez elegido el objetivo deseado, es importante seleccionar el medio de cultivo apropiado. El medio de cultivo se selecciona o define por sus propiedades químicas y físicas, por ello es recomendable hacer una revisión de literatura con el fin de seleccionar el medio, de no haber trabajos disponibles, se desarrolla un trabajo basado en prueba y error. Los medios de cultivo más comúnmente usados son formulaciones establecidas por Gamborg, Séller, Linsmaier y Skoog, Murashige y Skoog, Schenk y Hildebrandt y White, sin embargo existen otros con variaciones de estos medios básicos. De cualquier manera la elección del medio dependerá de factores como: especie con la que se trabaja, edad del órgano, edad de la planta, tipo de órgano y necesidad de reguladores.

El medio tiene básicamente dos funciones:

- a. Proporcionar los nutrientes para el crecimiento continuo de los explantes aislados y propágulos siguientes.
- b. Dirigir el crecimiento y desarrollo mediante el control hormonal (auxinas, citocinonas, giberelinas y ac. Abscisico).

2.11.1. Componentes del medio de cultivo

El crecimiento y desarrollo *in vitro* de la planta está determinado por un número complejo de factores. En la actualidad existen innumerables formulaciones cada una de las cuales contiene entre 15 y 35 compuestos químicos que se suministran y se clasifican en 8 categorías.

Cualitativamente los medios de cultivo aportan los mismos elementos (macro y micro) que se consideran esenciales para el crecimiento de las plantas.

1. Macronutrientes: se proveen los 6 macroelementos esenciales N, P, K, Ca, Mg, y S. los iones K^+ , NO_3^- y NH_4^+ , son los que ejercen la influencia importante en el crecimiento de los tejidos. El ión amonio (NH_4^+) no es conveniente para ciertos tejidos por lo tanto, es importante conocer la composición iónica exacta de las diferentes soluciones minerales propuestos para el cultivo de tejidos.

2. Micronutrientes: para el cultivo *in vitro*, incluye Fe, Mn, Zn, B, Cu y Mo, pero en ocasiones es necesario adicionar, dependiendo de la especie los micronutrientes: Co, I, Na y Cl.

El hierro, se considera como un elemento esencial para el crecimiento del tejido, mientras que el Zn, Bo, Cu, Co y Mo son esenciales para la síntesis de clorofila y la función del cloroplasto, aunque los tres últimos se desconoce o se sabe muy poco de su influencia en el crecimiento de los tejidos, pero se les agrega a los medios de cultivo como una medida de precaución, en concentraciones bajas de 0.00003 a 0.03 mM/l.

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

2.12. Fuentes de carbono

Muy pocos cultivos *in vitro* son autótrofos y por lo tanto es necesario agregar al medio una fuente de carbono, el carbohidrato preferido en el cultivo de tejidos es la sucrosa, aunque la glucosa y fructuosa la pueden sustituir en algunos casos, la glucosa es tan efectiva como la sacarosa, siendo la fructuosa menos efectiva. También se han usado otros carbohidratos como la lactosa, galactosa, rafinosa, maltosa y almidón, pero estos generalmente producen resultados inferiores a los obtenidos con la sacarosa o glucosa.

Los carbohidratos juegan un papel muy importante en la nutrición y estructura de la planta, son fuente de energía, por lo que no solamente es importante la concentración para la organogénesis, si no también la fuente de carbón.

2.13. Vitaminas

Las vitaminas utilizadas por lo general son del grupo B, siendo la más importante al parecer, la vitamina B1 o tiamina, normalmente las plantas sintetizan las vitaminas requeridas para su desarrollo o crecimiento, pero cuando estas crecen *in vitro*, es necesario adicionarlas, pero no se consideran esenciales, excepto la tiamina de tal manera que se agregan al medio como una medida de precaución. , o bien, son adicionadas para estimular procesos específico (catálisis enzimática, crecimiento, etc.)

2.13.1. Vitaminas comúnmente usadas

1. Tiamina: esencial para el crecimiento celular, funciona como coenzima para el ciclo de krebs.
2. Ácido nicotínico: constituyente de coenzimas activas en las reacciones luminosas, es una vitamina adicional, pero no es esencial.
3. Piridoxina (B6): Sirve como coenzima en la ruta metabólica y es adicionada como piridoxina- HC.
4. Ácido pantoténico: es otra vitamina B, se activa como coenzima del metabolismo de las grasas y se adiciona en forma de sal de Ca.
5. Ácido Fólico: Al igual que la vitamina B, tiene actividad como coenzima, ayuda en la proliferación.
6. Riboflavina (B2): es ocasionalmente usada en el medio.
7. Biotina (vit H): Activa como coenzima en el metabolismo graso.
8. Tocoferol (vit E).
9. Ácido p-Aminobenzoico.

2.15. Suplementos orgánicos indefinidos

La adición de una amplia variedad de extractos orgánicos al medio de cultivo muchas veces resulta en una respuesta favorable del tejido, sin embargo estos componentes deben ser utilizados como último recurso.

Algunos ejemplos son:

- Leche de coco (endospermo líquido).- produce una fuerte división celular en los tejidos, este tiene un compuesto análogo a la kinetina. Puede ser usado junto con una auxina.
- Caseína hidrolizada: es una mezcla de proteína, la caseína es de forma lechosa, es hidrolizada para formar un ácido débil.
- Extracto de levadura: es una fuente natural de vitaminas en forma de polvo.
- Extracto de malta.
- Jugo de naranja y tomate.
- Plátano molido.
- Peptona y tristoná.

(Barrón, 1999).

2.16. Reguladores de crecimiento

Las hormonas de crecimiento, son sustancias que se producen o sintetizan en una parte de un organismo, son transferidas a otra, en donde interviene en un proceso fisiológico específico. En sentido estricto, las sustancias de crecimiento, extraídas de los tejidos vegetales y las sustancias sintéticas con efectos reguladores, no pueden ser llamadas hormonas. Por lo anterior, fue creado el término "regulador de crecimiento vegetal", que define a los compuestos orgánicos distintos de los nutrientes, que en pequeñas cantidades (1 micromolar) estimulan, inhiben o modifican de algún modo, cualquier proceso fisiológico en la planta.

Los reguladores de crecimiento, al igual que las hormonas, no actúan solas, si no en conjunto o en oposición, es como producen los efectos fisiológicos. Los reguladores de crecimiento más importantes son: auxinas, citocininas, giberelinas y ácido abscisico (Barrón 1999).

2.16.1. Auxinas

Fueron descubiertas por Wenten 1926 cuando sustrajo una sustancia de la punta del coleoptilo de la avena, que causa la curvatura en otros coleoptilos. Esta se identifico como una auxina. Las auxinas más comúnmente usadas en el cultivo de tejidos son: Ácido-3-indolacético (AIA), Ácido-3-indolbutírico (IBA), Ácido -4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y Acido1-naftalenacético (ANA).

El AIA, se produce en forma natural en las plantas. El AIA, es degradado en pocos días por la acción de la luz y en pocas horas o días en el tejido vegetal, también se puede destruir por PH bajo, oxígeno y peroxidasas.

El IBA, ANA, y 2,4-D son auxinas sintéticas, aunque el IBA se ha encontrado en maíz y en otras pocas especies en forma natural. El AIA es una auxina débil, mientras que el ANA es una auxina fuerte, el 2,4-D es 8 a 10 veces mas activo que el AIA y el ANA es 2 veces mas activo que el AIA.

Las auxinas, son generalmente incluidas al medio de cultivo para:

- ❖ Estimular la producción de callo y crecimiento celular.
- ❖ Estimular la formación de la raíz.
- ❖ Inducir a embriogénesis somática.
- ❖ Estimular el crecimiento de ápices y meristemo.

También pueden causar inhibición de la formación de brotes axilares y adventicios, el 2,4-D inhibe la fotosíntesis y puede inducir a mutaciones.

En forma general, podemos decir que las auxinas a bajas concentraciones, inducen la formación de raíces adventicias, mientras que altas concentraciones, no se producen raíces y tiene lugar, en cambio la formación de callo (Barrón 1999).

Se generan principalmente en las partes jóvenes de las plantas, las cuales estimulan el crecimiento por alargamiento de los tallos y participa en la formación de las curvaturas fototrópicas (hacia la fuente de la luz) promueve la formación de las raíces laterales y adventicias, participa en la inhibición correlativa de las yemas axilares y brotes por el ápice del brote principal y por sus hojas juveniles.

Estas estimulan en algunas especies de plantas para formar frutos partenocárpicos (sin la fecundación del ovulo).

En muchas especies de plantas, en los fragmentos de tallo destinados a esquejes o estacas, las auxinas favorecen la regeneración de raíces, (Jankiewicz 2003).

El mismo autor menciona que se descubrió que las auxinas sintéticas como el 2, 4-D a concentraciones relativamente altas, pueden ser utilizadas como herbicidas y de esta forma siguen siendo ampliamente aplicadas en diferentes ramas de la agricultura.

Así mismo se sabe que las auxinas aplicadas por fuera (exógenas), especialmente a concentraciones altas, provoca el aumento de etileno y se presenta algunos fenómenos, que se distribuyen a las auxinas pero pueden ser en realidad una respuesta de la planta al alto contenido del etileno.

El ácido 2,4- diclorofenoxiacético (2,4-D) su nombre en ingles es, 2,4 Dichlorophrnoxyacetitic acid. , la concentración comparativa para este compuesto es 1-5 mg/l. se utiliza en cultivo de tejidos.

A concentraciones más altas es muy tóxico para muchas especies de plantas y por esto es popular como un herbicida, las auxinas sintéticas cuando son aplicadas a las plantas forman los conjugados semejantemente como AIA (ácido indol-3 acético).

Así, 2,4-D forma glucósidos y además adjunta el grupo -OH en la posición: 4. también forma conjugados con diferentes aminoácidos, por ejemplo con el ácido aspártico.

Solo después de algún tiempo desde la aplicación el 2,4-D es liberado gradualmente en cantidades necesarias para el crecimiento de las células en cultivo de tejidos.

El transporte de la auxinas es que se mueven en los coleótilos y ápices de los tallos de una gran variedad de especies en forma basipétala a una velocidad de 5-20 mm/h. se sabe también que el transporte acropétalo de auxinas en estos órganos es mínimo (Jankiewicz, 2003).

Las antiauxinas son compuestos que inhiben la acción de las auxinas, compitiendo con ella quizá para obtener los mismos puntos de enlace sobre una o varias sustancias receptoras. El efecto inhibitorio de algunas auxinas puede superarse completamente, mediante un aumento de la concentración de auxinas. Debe señalarse que esos términos no se excluyen mutuamente, por ejemplo en determinadas circunstancias, algunos compuestos pueden ser lo mismo auxinas que antiauxinas.

Hay otros inhibidores de la acción de las auxinas que no pueden clasificarse como antiauxinas y que no se cree retarden la acción de las auxinas, compitiendo directamente con ellas para obtener los mismos puntos de enlace.

El aumento de la concentración de auxinas no permite vencer completamente sus efectos inhibitorios (Weaver 1982).

2.16.2. Citocininas

Es una sustancia del crecimiento de las plantas que provoca la división celular (su sinónimo *fitocinina* tiene mucha menor aceptación. Muchas citocininas exógenas y todas las endógenas derivan probablemente de la adenina, una base nitrogenada de purina (Weaver 1982).

Haberlandt en 1913 observó un compuesto desconocido, presente en el tejido vascular que promovía la división celular, esto era lo que hoy conocemos como citosina. A través del cultivo de tejidos, en 1950 se uso agua de coco, que contenía varias citocininas que favorecían la división celular en zanahoria. Pero no fue hasta 1964 que se descubrió en si la primera citocinina en el endospermo lechoso del maíz dándose el nombre de zeatina, desde entonces, se han identificado otras citocininas con estructura semejante a la adenina. Las citocininas, comúnmente usadas en el medio de cultivo son: 6-benzilamino-purina (BAP) o 6 benziladenina (BA), 6- - -dimetilaminopurina (2ip o IPA), N-(2-furanilmetil)-1H-purina-6-amina (cinetina o kinetina) y -(4-hidroxi-3-metil-trans-2-butenilamino) purina (Zeatina). La zeatina y 2ip, son consideradas como citocininas naturales, mientras que la BA y cinetina son derivados sintéticos de las citocininas. La adenina es otro compuesto natural con estructura y acción similar.

Las citocininas, se utilizan frecuentemente para favorecer el crecimiento y desarrollo, estimular la división celular y promover la producción de brotes. En el medio de cultivo se adiciona para lograr cierto tipo de morfogénesis, dependiendo de la proporción con la concentración de auxinas, así, podemos lograr la estimulación de la formación de raíz, embriogénesis o iniciación de callo, ocurriendo cuando la proporción auxina-citocinina es alta, sin embargo cuando la proporción es baja, se produce proliferación de brotes axilares y adventicios,

elevada la proporción de citocininas, producen brotes adventicios, e inhibe la formación de raíz (Barrón 1999).

El descubrimiento en las plantas de compuestos con propiedades semejantes a las de la cinética estuvo relacionado con el desarrollo de la técnica de cultivo de tejidos *in vitro*. Se había observado que las células de tejidos cultivados *in vitro* se dividían más intensamente en presencia de agua de coco. Por lo tanto, se pensó que en el agua de coco se encuentran sustancias con propiedades semejantes a las de la cinética (Jankiewicz 2003).

El mismo autor menciona que la característica más importante es que estimulan las divisiones celulares en las plantas y retrasan el envejecimiento. Estos influyen en múltiples procesos bioquímicos, como la estimulación de la biosíntesis de los ácidos nucleicos y de diferentes proteínas, entre otras enzimas, como las proteasas y ribonucleasas.

Las citocininas afectan también a múltiples e importantes procesos fisiológicos, por ejemplo en estimulan la germinación de las semillas que necesitan luz y acortan el periodo de latencia de las yemas.

El fenómeno de inducción de la formación de yemas adventicias o estimulación de crecimiento de yemas axilares por las citocininas es muy utilizado por la técnica de micropropagación.

En el cultivo de tejidos se puede dirigir el desarrollo del material vegetal, aplicando citosina al medio, lo que regula el número de divisiones celulares, la formación de yemas y el crecimiento de los brotes. Dichos cambios morfológicos del tejido u órgano cultivado *in vitro* son frecuentemente el resultado de la estimulación de la actividad mitótica puede ser también el resultado de la diferenciación del sistema vascular por lo que en forma directa influye en el crecimiento de las plantas. En experimentos con cultivos *in vitro* se ha encontrado que en muy pocas cantidades

de C-BA se trasladan a la parte apical de los brotes. Casi toda la cantidad de BA absorbida se quedaba en la parte basal del brote. El transporte limitado de las citocininas se ha demostrado también en experimentos con plantas enteras, la posibilidad de que haya poca movilidad de citocininas se debe tener en cuenta al tratar a las plantas con estas (Jankiewicz 2003).

2.17. Organogénesis

La organogénesis es el evento morfogenético mediante el cual se producen órganos tales como raíces y tallos, pero en momentos diferentes. Por el contrario en la embriogénesis somática se producen plantas completas (estructuras bipolares) en un solo evento.

El potencial morfogenético de las plantas se da gracias a la totipotencialidad de las células vegetales. La totipotencialidad es la capacidad morfogénica que tienen las células vegetales para producir un organismo completo.

La producción de órganos puede ser directa e indirecta:

Organogénesis directa. Este proceso se da con cierta frecuencia en explantes relativamente grandes de un grupo cada vez más numeroso de especies vegetales. El tipo de explante, así como la salud y el estado fisiológico de la planta madre (donadora del explante), son factores importantes para el buen estado de la propagación. En este tipo de organogénesis, la formación de brotes y/o raíces se da directamente en el explante inicial sin la previa formación de callo.

La ausencia de callo en los explantes da un alto porcentaje de seguridad de que los brotes producidos sean idénticos (clones) a la planta madre, siendo por esto un medio de propagación comercial adecuado.

Los brotes adventicios se originan principalmente a partir de células epidérmicas del explante, sin embargo, también pueden formarse a partir de células subdermales. La formación de brotes adventicios es frecuentemente acompañada de producción de callo, por lo que es necesario hacer ajustes en las concentraciones de reguladores de crecimiento para evitarlo, ya que su presencia puede dar lugar a la producción de brotes con cambios genéticos.

Normalmente, la producción de brotes se da en individuos cuyos explantes (pecíolos, tallos, hojas, raíces, etc.) ya están predeterminados para la morfogénesis y necesitan un estímulo relativamente leve con bajas concentraciones de reguladores de crecimiento, por ejemplo, la producción de brotes en hojas de violeta africana se obtiene agregando 0.4 mg/l Ácido Indolacético (IAA) + 0.08 mg/l Bencilaminopurina (BA) al medio en cultivo.

Organogénesis indirecta. Contrariamente a lo que sucede en la organogénesis directa, en este tipo de organogénesis si existe la desorganización de las células (formación de callo) del explante original.

Este tipo de propagación clonal no es recomendable para fines comerciales, ya que existe una gran probabilidad de que se produzca variación genética, también llamada variación somaclonal.

La organogénesis indirecta, es un proceso que puede ser utilizado en trabajos de mejoramiento genético en donde es importante la producción de variación genética.

La variación somaclonal es el producto de diversos eventos cromosómicos como inversiones, deleciones y amplificación génica, entre otros.

Generalmente, las condiciones de incubación (fotoperíodo y temperatura) para la organogénesis son las que más comúnmente se utilizan para la propagación de yemas axilares.

Por otra parte, aún cuando el medio basal y otros ingredientes como vitaminas, fuente de carbono, agar y otros aditivos orgánicos son importantes, el control de la organogénesis está dado principalmente por la acción de auxinas y citocinas (Valenzuela 2003).

2.18. Etileno

Es una hormona gaseosa, que es producida por órganos y callos. El cultivo de tejidos requiere de recipientes cerrados, por lo cual es necesario evitar la acumulación de etileno.

No existe unanimidad de criterios, en las referencias bibliográficas, en lo que se refiere al papel que juega el etileno en la organogénesis *in vitro*, alguna habla de que no hay influencia y otras de que tiene un efecto positivo, por ejemplo: en callos de tabaco, se ha encontrado mayor concentración cuando se forma el brote o brotes adventicios. Algunas veces el crecimiento *in vitro* puede ser estimulado por el etileno, parece que en cierta concentración de este induce a división celular, en células en suspensión. Hay que tomar en cuenta que el 2,4-D induce a la formación de etileno (Barrón 1999).

2.19. Agente gelificante

El agar es el material de soporte más ampliamente usado en el cultivo de tejidos, pues provee al medio de cultivo un excelente gel húmedo, que sirve de soporte para los explantes, aunque se supone que es un material inerte en el medio, frecuentemente contiene trazas de elementos, dependiendo del alga y el método de manufactura (Cl, sulfato, Ca, Mg y Fe), pero los agares purificados, usualmente

son lo suficientemente limpios para el cultivo de tejidos. El agar clarifica entre los 60 y 100°C y solidifica a los 45°C, es estable en las temperaturas de incubación, no reacciona con el medio y es digerible enzimáticamente por las plantas. La firmeza del agar depende o puede ser controlada por la concentración y marca del agar usado y el pH del medio, las concentraciones más usadas son de 0.5 a 1.0%, las cuales proporcionan la firmeza en el pH típico del medio de cultivo.

Otros gelificantes comúnmente usados son: Phytigel y Gelrite, los cuales son productos sintéticos que dan como resultado un gel claro, deseable para detectar contaminación. Otros medios de soporte que han utilizado para el caso de medios líquidos son: papel celofán, puentes de papel filtro, mechas de papel filtro, espuma de poliuretano y vellón de poliéster (Barrón 1999).

2.20. Agua

La calidad del agua es importante, ya que se constituye el 95 % del medio nutritivo. Para los trabajos de investigación, se recomienda que el agua haya sido destilada, en el caso de trabajar con protoplastos, células o meristemas, se debe utilizar agua bidestilada, también puede ser utilizada agua purificada por osmosis inversa. Cuando no se utiliza agua destilada, puede usarse agua desionizada, aunque debe tomarse en cuenta que puede llegar a tener contaminantes orgánicos o incluso microorganismos. Sin embargo, el agua desionizada se utiliza frecuentemente en prácticas elementales, en las que se cultiva "in vitro" grandes explantes (Barrón 1999).

2.21. Factores que intervienen en el cultivo de tejidos

Se ha encontrado que el tipo de explante, la intensidad, tipo y duración de la luz, la temperatura, la relación O₂/CO₂, la concentración de otros gases y la composición química del medio, juegan un papel muy importante en la morfogénesis del cultivo.

Explante u inoculo: es el órgano, tejido o fragmento de tejido, células, etc. Tomado del material parental para iniciar el cultivo *in vitro*. La elección del explante es el primer paso para el establecimiento del cultivo aséptico, este variara de acuerdo al objetivo perseguido y los factores a considerar son: genotipo, edad de la planta y su estado fisiológico.

2.22. Propiedades físicas del medio

El metabolismo de los tejidos puede ser totalmente diferente dependiendo de sí se encuentra en un medio semi-sólido o líquido.

El medio sólido se agrega agar como agente gelificante, mientras que el medio líquido carece del agente gelificante.

La concentración del agente gelificante (agar, phytigel o gelrite) es muy importante, ya que dependiendo de la consistencia del medio, se puede orientar el cultivo hacia la formación de brote o callos también puede influenciar en fenómenos de hiperhidratación.

El medio líquido es importante para el cultivo de células y protoplastos, también para la fase de crecimiento y alargamiento de brotes de yema aunque se ha visto un mejor resultado para estos últimos en medios sólidos (Barrón 1999).

2.22.1. Factores físicos

El pH (grado de acidez y alcalinidad) del medio de cultivo es específico para cada tipo de planta al igual que ocurre en los suelos, por lo que se hace necesario ajustarlo a los requerimientos de cada especie en estudio, sin embargo, el pH adecuado estará en el rango de 4.5 a 7.0 para la mayoría de las plantas (Barrón 1999).

2.22.2. Intercambio gaseoso

Los gases más comunes son el O_2 , CO_2 y etileno (C_2H_4). Muy raramente se cuida el intercambio de gases, sin embargo, puede ser muy importante, así se pudo demostrar que la embriogénesis somática, es favorecida por bajas concentraciones de O_2 y altas concentraciones de CO_2 , las divisiones celulares y el establecimiento de callos o células en suspensión se favorecen con altas concentraciones de O_2 y Altas concentraciones de CO_2 , si se acumula con la intensidad luminosa, favorece la fotosíntesis. La acumulación de etileno produce una disminución del crecimiento, reducción de la superficie foliar y caída de hojas, reducción de la concentración de clorofila e inhibición de la raíz (Barrón 1999).

2.22.3. Humedad

En condiciones *in vitro*, la humedad dentro del recipiente es casi 100 % por eso la planta *in vitro*, en general, no desarrolla adecuadamente los sistemas de regulación hídrica tales como ceras, estomas, cutícula, etc. (Barrón 1999).

2.22.4. Luz

En condiciones *in vitro* clásicas, la intensidad lumínica es muy baja, de $5-25 W/m^2$ (1000-5000 lux), en comparación con las condiciones naturales donde la luz puede representar hasta $900 W/m^2$. La calidad de la luz es muy baja (longitud de onda) manifestándose la necesidad de cubrir la amplia gama de longitudes de onda naturales ya que la calidad de luz afectara a dos fenómenos importantes dependientes de la luz. Fotosíntesis y fotomorfogénesis (Barrón 1999).

2.22.5. Temperatura

La temperatura de los cuartos de cultivo oscila entre $21- 27^\circ C$, dependiendo si el cultivo es de zona templada o tropical, lo importante es tomar en cuenta que la

temperatura interna de los recipientes de cultivo puede ser de 2-4 °C más alto, por el "efecto invernadero". La temperatura óptima para el crecimiento y desarrollo *in vitro*, es generalmente 3-4 °C más alta que la correspondiente para el crecimiento *in vitro* (Barrón 1999).

2.22.6. Factores químicos

El medio de cultivo, la sustancia dentro del cual crecen los explantes influirán dependiendo de la especie que se trabaje. Y se seleccionará de acuerdo a los requerimientos del mismo (Barrón 1999).

2.23. Fotosíntesis

Por medio de este proceso, la planta en presencia de luz y agua incorpora el dióxido de carbono para formar compuestos orgánicos que le permiten crecer y reproducirse. Esta reacción se lleva a cabo en los cloroplastos (Barrón 1999).

2.24. Fotomorfogénesis

La morfogénesis funciona con la presencia de un pigmento susceptible al rojo llamado fotocromo, el cual trabaja entre los 660 – 730 nm de longitud de onda. Procesos tales como: expansión foliar, elongación de entrenudos, diferenciación de estomas, síntesis de clorofila, etc. Son influenciados por este pigmento.

Hay que considerar, que la luz natural es rica en azul y remarcablemente constante en la proporción rojo: Rojo- lejano (1.1), y que los cuartos de incubación *in vitro*, la fuente de luz es con lámparas fluorescentes, que tienen relativamente poca radiación rojo- lejano y también más baja en azul.

Esto produce una diferencia muy marcada con el azul del espectro solar, es por ello que se debe poner cuidado en el tipo y marca de la fuente de luz a seleccionar manifestándose la necesidad de cubrir la amplia gama de longitudes de onda

CAPITULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Localización del experimento

El experimento se estableció en el laboratorio de biotecnología ubicado dentro de las instalaciones del laboratorio de biología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Laguna, con dirección en carretera a Santa Fe y Periférico, Torreón Coahuila, México.

3.2. Estructura física

El laboratorio de biotecnología en el cual se realizó el experimento cuenta con tres principales divisiones en los cuales, la primera es el lugar de recepción donde se revisa que se cuente con el material necesario para el trabajo a realizar, la segunda división es el lugar de siembra, donde se encuentra la campana de flujo laminar y demás accesorios ahí se realizan todos los trabajos de siembra y trasplante según sea el material vegetativo a utilizar, y la tercer división es el cuarto de crecimiento, que cuenta con cancelas adaptados con lámparas de luz fluorescente, en los cuales se colocan los frascos con medios de cultivo, aquí se cuenta con sistema de enfriamiento adaptado con regulador de temperatura y se mantiene el cuarto de crecimiento en rangos de temperatura de 25 a 27°C.

3.3. Diseño experimental

Porcentaje de germinación.

Se utilizó un diseño completamente al azar con dos tratamientos y 18 repeticiones, cuyo modelo fue $Y_{ij} = \mu + T_i + \epsilon_{ij}$ con :

$i = 1, 2$ tratamientos.

$j = 18$ repeticiones

Donde:

Y_{ij} = Variable aleatoria observable de i-ésimo tratamiento y la j-ésima repetición

μ = Media general

T_i = Efecto del i-ésimo tratamiento

ϵ_{ij} = Error experimental.

Multiplicación *in vitro*.

Para la multiplicación de *in vitro* *Agave durangensis*, se desarrollo un diseño completamente al azar, con 2 tratamientos y 18 repeticiones.

En donde el tratamiento 1 consiste en la siembra de semilla con 24 horas de remojo y el tratamiento 2, siembra con semilla sin remojo.

3.4. Material vegetal

Semilla de *Agave durangensis*, recolectada posiblemente de diferentes plantas y proporcionada por productores de Tuitan, Mpio de Nombre de Dios, Dgo.

3.5. Preparación del medio de cultivo para germinación y para inducir brotación

Medio para germinación

El medio utilizado fue el propuesto por Murashige y Skoog (1962), suplementado con 30 gr de sacarosa y 8 gr. de agar el pH se ajustó a 5.7 una vez clarificado se se distribuyó en frascos gerber de 200 ml, los cuales se sellaron con una tapa magenta, esterilizaron en autoclave durante 20 minutos a una presión de 15 libras.

Posterior a la esterilización se retiran de la autoclave, se mantiene en refrigeración hasta el día de su utilización.

Medio para inducir la brotación

Se preparó el medio de cultivo en base a la formulación de MS modificada por Robert M. L. el proceso es similar a la de la germinación solo que en este caso se agregan las siguientes hormonas (reguladores de crecimiento) para la inducción de brotes axilares, el 2,4 D (auxina) es preparada en una concentración de 0.002 g. el cual se disuelve en 0.5 de hidróxido de potasio 1 N (KOH). o alcohol etílico, posteriormente se agrega un poco de agua destilada y se afora a 100 ml. Del cual se toma 1 ml. para cada litro de medio a preparar. La Benzylaminopurina (citocinina) se pesa 0.01g. y se disuelve en 0.5 ml de KOH (1N) se adiciona un poco de agua destilada y se agrega al medio, esta cantidad es para cada litro. Una vez clarificado el medio se vacían ahora en recipientes de plástico transparente con una capacidad de 500 ml y se esterilizan en autoclave durante 20 minutos a una presión de 15 libras en autoclave, después se retiran de la autoclave, se mantiene en refrigeración hasta el día de su utilización.

3.6. Marcha para la siembra

Tratamiento 1.- La semilla a utilizar se puso a remojar en agua destilada 24 horas, teniendo en cuenta de que se colocarían 4 semillas por frasco.

Para el tratamiento 2.- en este caso sólo se seleccionó el número de semillas a utilizar y se colocaron en una charola para ser llevadas a la campana y seguir los pasos a continuación descritos para su desinfectación.

3.7 Limpieza de la campana laminar

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

que se limpia la campana se colocó en su interior todo el material a utilizar previamente esterilizado y asperjándolo previamente con alcohol etílico. (Vasos de precipitado, pinzas, mangos para bisturí, navajas de disección, cajas de petri, soluciones a utilizar, recipiente en alcohol etílico para flamear, etc.).

3.8. Desinfección y siembra de la semilla para los tratamientos 1 y 2

1. Se introduce el vaso que contiene la semilla en la campana laminar.
2. Se agrega el hipoclorito al 10 % + 3 gotas de tween 20, en el cual permanecerán durante 20 minutos, agitando constantemente.
3. Se drena el hipoclorito de sodio y se da un enjuague con agua destilada estéril.
4. Se drena el agua y se agrega el alcohol al 70 % agitando constantemente durante 30 a 60 seg.
5. Se drena el alcohol y se agrega el microdine® al 20 % agitando constantemente durante 10 min.
6. Se drena el microdine y se dan tres enjuagues con agua destilada estéril, con una duración aproximada de 1 min. Entre cada enjuague.
7. Se toma las semillas y se colocan en una media caja de petri.
8. Se flamea la boca y la tapa del envase y con las pinzas previamente flameadas se toman las semillas una por una y se siembran cuatro semillas por envase.
9. Se sella con película plástica.
10. Se rotulan (tipo de semilla, fecha, medio de cultivo, quien realiza la siembra).

3.9. Siembra para germinación de semillas y trasplante

La siembra se llevo a cabo el 04 de mayo de 2005 en medio MS. Sin hormonas, Se realizo en la campana de flujo laminar, con el procedimiento antes mencionado utilizando frascos de vidrio (gerber) con capacidad de 200 ml.

colocando 4 semillas en cada una, cada frasco representa una repetición y las semillas submuestras respectivamente de cada tratamiento.

El 09 de junio de 2005 se realizó el primer trasplante de las plántulas en medio MS. Con hormonas para la inducción de brotes axilares, esto corresponde a un rango de 37 días después de la siembra, utilizando como reguladores de crecimiento el 2,4 D (auxina) y benzylaminopurina (citocinina) colocando 4 plántulas por cada recipiente, siendo los recipientes de plástico transparente con una capacidad de 500 ml, los cuales contenían el medio de MS modificado por Roberts para la etapa de inducción de brotes. Cada envase debidamente sellados con membrana plástica y etiquetados, se llevaron al cuarto de crecimiento, donde permanecieron bajo un fotoperiodo largo (16 horas luz.), a una temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 114 días.

3.10. Variables Evaluadas

1.- Porcentaje de germinación. Para la toma de datos de esta variable se tuvo una observación diaria para cada tratamiento con su respectiva repetición y submuestra, evaluando la semilla continuamente durante 6 días después de la siembra.

2.-Días a brotación de la hoja cotiledonar. Esta variable se evaluó a partir de haber obtenido todas las semillas germinadas, desde el día 6 hasta el 17 después de la siembra, donde se observó los diferentes tiempos de brotación entre tratamientos.

3.- Días de aparición de la 1ª Hoja verdadera. Esta variable se determinó mediante observaciones diarias a partir de la emergencia de la hoja cotiledonar, hasta los 36 días después de haber realizado la siembra.

4.- Formación de brotes axilares y callo. La toma de datos se realizó después del primer trasplante al medio para inducción de brotes axilares (con hormonas), el 25 de agosto de 2005, (114 días después de la siembra). Contando los brotes formados en cada uno de los tratamientos; en el caso de formación de callo se estableció una escala de cuatro niveles (ausencia, escaso, abundante y muy abundante) dependiendo de la presencia del mismo.

Cuadro. 2 Escala para evaluar la presencia de callo en cada uno de los tratamientos.

CALLO	
ausencia	0
Escaso	1
Abundante	2
Muy abundante	3

Para la interpretación de resultados se utilizó el programa de paquete de diseños experimentales FAUANL de Olivares Sáenz, Emilio. 1993. versión 2.4. Facultad de agronomía, UANL. Marín, N.L.

La comparación de medias se realizó con la prueba de Tukey. La parcela experimental consistió de 18 recipientes, siendo la parcela útil, un recipiente con 4 explantes en ella.

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Porcentaje de germinación

En base al análisis estadístico se determina que no existe diferencia significativa entre los tratamientos 1 y 2 con respecto a la germinación de semilla (cuadro 5), presentándose un 93 % a los 5 días y un 90 % a los 6 días respectivamente (cuadro 3 y figura 1).

Para esta variable se determinó que existe un día de diferencia entre los tratamientos, siendo el tratamiento 1 el primero en germinar y con mayor porcentaje de germinación, Es conveniente mencionar que las semillas utilizadas fueron proporcionadas por productores de Tuitan, Mpio de Nombre de Dios, Dgo.

Los porcentajes de germinación obtenidos se encuentran en el rango, ya que Bassin y Baskin (1990). Freeman (1994), Nóbel (1991), 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 obtuvo un 80% de germinación en 7 y 20 días respectivamente.

Los resultados obtenidos en este experimento son superiores a los que se reportan para las especies *A. lechuguilla*, *A. virgínica* y *A. deserti*. Ya que el tiempo mínimo reportado para germinación de estas especies, es de 7 días y en este caso particular de *Agave durangensis* el tiempo mínimo fue de 5 días, no existen antecedentes bibliográficos en específico para esta especie.

Cuadro 3. Resultados obtenidos sobre el porcentaje de germinación de semillas de *Agave durangensis* germinadas en medio de cultivo MS sin hormonas.

Variable	Tratamiento 1	Tratamiento 2
Germinación (%)	93	90
DDS	5	6

T1= Semillas con 24 horas de remojo, T2= Semillas sin remojo, DDS = días después de la siembra.

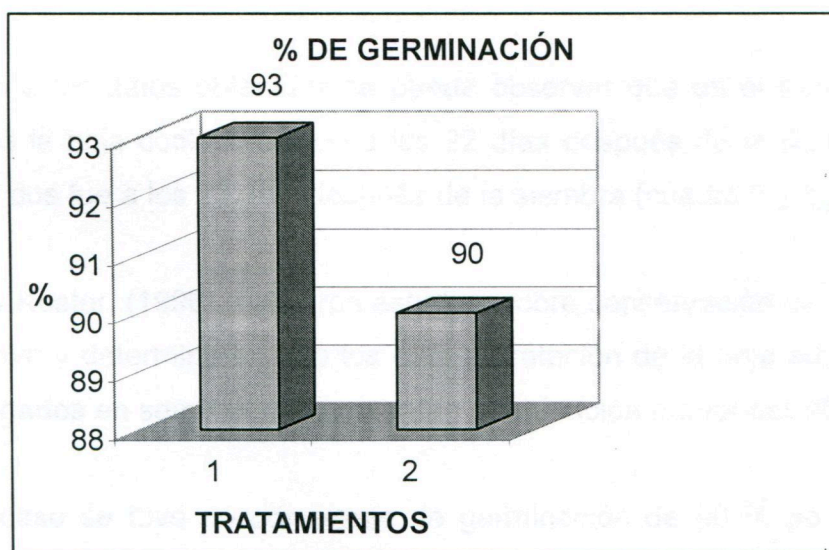


Figura. 1 Porcentaje de germinación de *Agave durangensis*. T1 = 24 horas de remojo T2 = sin remojo.

Cuadro 5. Comparación de medias para el porcentaje de germinación de semillas de *Agave durangensis* germinadas en medio de cultivo MS sin hormonas.

TRATAMIENTO	MEDIA
1	3.7222 A
2	3.6111 A

NIVEL DE SIGNIFICANCIA = 0.05

TUKEY = 0.3658

VALORES DE TABLAS (0.05), (0.01) = 2.88, 3.86

4.2. Días a brotación de la hoja cotiledonar

El análisis estadístico para esta variable no detectó diferencia significativa entre tratamientos (cuadro 8).

De acuerdo a los datos obtenidos se puede observar que en el tratamiento 1 la aparición de la hoja cotiledonar fue a los 22 días después de la siembra y en el tratamiento dos fue a los 23 días después de la siembra (cuadro 6 y figura 2).

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

Para este caso se tuvo un porcentaje de germinación de 90 % por lo cual se descarta el retraso de la brotación.

Cuadro. 6 Resultados obtenidos para días a brotación de la hoja cotiledonar de semillas de *Agave durangensis* germinadas en medio de cultivo MS.

Variable	Tratamiento 1	Tratamiento 2
Brotación de la hoja cotiledonar (DDS)	22	23

T1= Semillas con 24 horas de remojo T2= Semillas sin remojo, DDS = días después de la siembra.

Cuadro. 8 Comparación de medias para la brotación de la hoja cotiledonar de *Agave durangensis*, germinadas en medio de cultivo MS sin hormonas, con datos ordenados en un cuadro completamente al azar.

TRATAMIENTO	MEDIA
1	20.3889 A
2	20.1944 A

NIVEL DE SIGNIFICANCIA = 0.05

TUKEY = 2.1360

VALORES DE TABLAS (0.05), (0.01) = 2.88, 3.86

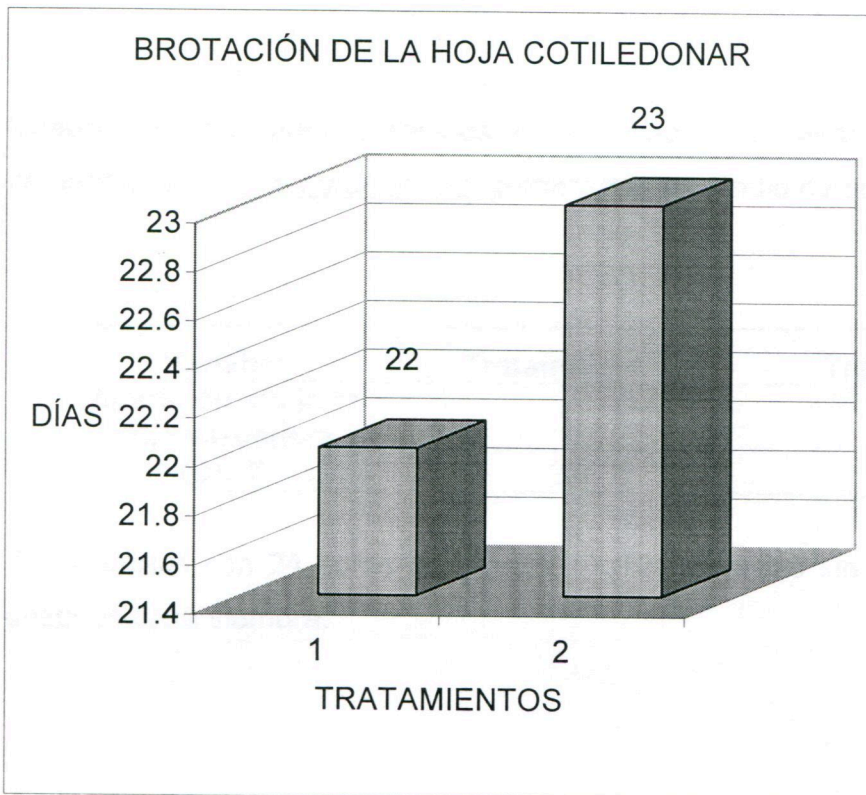


Figura. 2 Días de brotación de la hoja cotiledonar de semillas de *Agave durangensis*. T1 = 24 horas de remojo T2 = sin remojo

4.3. Días de aparición de la 1ª hoja verdadera

Con los resultados del análisis estadístico se determina que no existe diferencia significativa entre los tratamientos 1 y 2 con valores de 32.6 y 31.3 respectivamente (cuadro 11).

De igual modo se obtuvo un día de diferencia en la aparición de la 1º hoja verdadera entre tratamientos (cuadro 9 y figura 3).

Cuadro. 9 Resultados obtenidos en los días de aparición de la 1ª hoja verdadera de *Agave durangensis* germinadas en medio de cultivo MS.

Variable	Tratamiento 1	Tratamiento 2
Aparición de la 1ª hoja verdadera (DDS)	35	36

T1= Semillas con 24 horas de remojo T2= Semillas sin remojo DDS = días después de la siembra.

Cuadro. 11 Comparación de medias para la aparición de la 1ª hoja verdadera de *Agave durangensis*, germinadas en medio de cultivo MS sin hormonas, con datos ordenados en un cuadro completamente al azar.

TRATAMIENTO	MEDIA
1	32.6139 A
2	31.3472 A

NIVEL DE SIGNIFICANCIA = 0.05

TUKEY = 3.6633

VALORES DE TABLAS (0.05), (0.01) = 2.88, 3.86

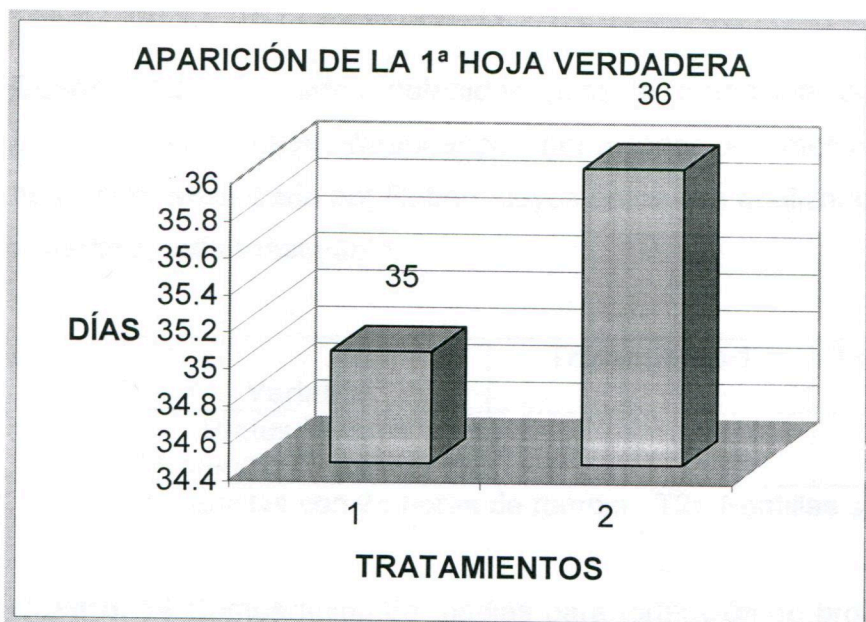


Figura. 3 Días de aparición de la 1ª hoja verdadera de de *Agave durangensis*. T1 = 24 horas de remojo T2 = sin remojo

4.4. Formación de brote

Con el análisis estadístico se determina que no existe diferencia significativa entre los tratamientos 1 y 2 con respecto a la formación de brote (cuadro 14 y figura 4), presentando un promedio de 1 para el tratamiento 1 y 0 para el tratamiento 2. (Cuadro 12).

La escasa presencia de brotes puede atribuírsele a que para esta especie la concentración utilizada de citocinina resulta alta y por lo tanto inhibe la formación de brotes axilares, y por el contrario estimuló la proliferación de callo (Barrón 1999)

Por otro lado la variación de la temperatura también puede ser factor para la escasa formación del brotes axilares, ya que la temperatura interna de los recipientes de cultivo puede ser de 2-4 °C más alto, y producir el efecto invernadero, factor que favorece también la formación de callo (Barrón 1999).

Cuadro. 12 Resultados obtenidos para la formación de brotes axilares en plantulas de Agave durangensis, germinadas en medio de cultivo MS con hormonas, modificado por Robert, cuyos datos son analizados individualmente, de acuerdo a cada tratamiento.

Variable	Tratamiento 1	Tratamiento 2
Brotes axilares (Promedio / tratamiento)	1	0

T1= Semillas con 24 horas de remojo T2= Semillas sin remojo

Cuadro. 14 Comparación de medias para formación de brotes axilares de Agave durangensis, germinadas en medio de cultivo MS con hormonas, modificado por Robert.

TRATAMIENTO	MEDIA
1	0.0556 A
2	0.0000 A

NIVEL DE SIGNIFICANCIA = 0.05

TUKEY = 0.0658

VALORES DE TABLAS (0.05), (0.01) = 2.88, 3.86

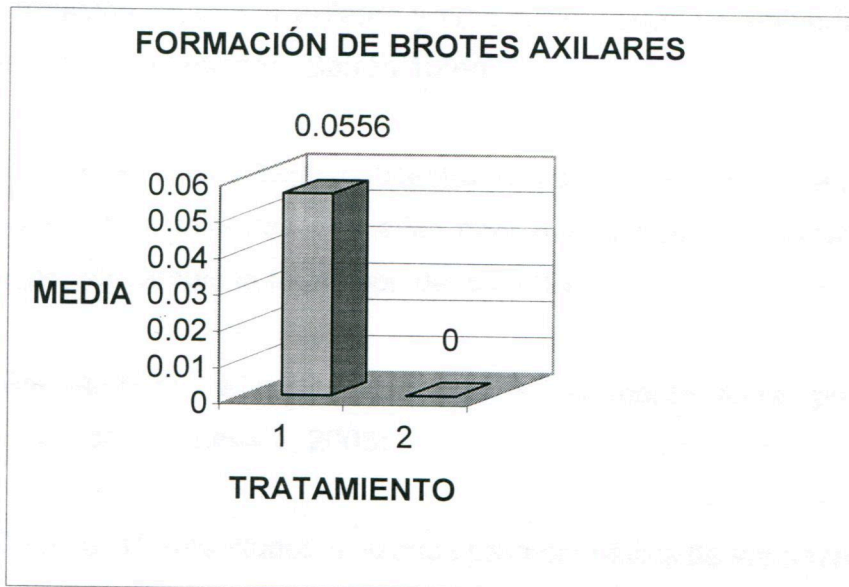


Figura. 4 Comparación de medias en la formación de brotes axilares de *Agave durangensis* T1= Semillas con 24 horas de remojo, T2= Semillas sin remojo

4.5. Formación de callo

Aunque la formación de callo no se consideró como una de las variables a analizar en el planteamiento de este experimento, se hace el análisis respectivo a cada tratamiento utilizando la escala descrita en la metodología.

Es conveniente mencionar que todos los tratamientos formaron callo. Mediante el análisis de varianza se determina que no existe diferencia significativa entre tratamientos (cuadro 17).

Analizando la figura (5) es posible determinar que el tipo de callo que se presenta en mayor proporción en ambos tratamientos es el tipo 2 (callo escaso), presentándose en mayor proporción en el tratamiento 2.

La formación de callo pudo deberse a una concentración inadecuada de los reguladores de crecimiento, como es el 2, 4D que pueden causar inhibición de la

formación de brotes axilares y adventicios, también inhibe la fotosíntesis y puede inducir a mutaciones (Barrón 1999).

La auxina, 2,4D a bajas concentraciones, induce también a la formación de raíces adventicias, mientras que altas concentraciones, no se producen raíces y tiene lugar, en cambio la formación de callo (Barrón 1999).

Así también a concentraciones relativamente altas, puede tener un efecto herbicida (Jankiewicz, 2003).

Cuadro. 15 Resultados utilizados para el análisis de varianza para la formación de callo en plantas de *Agave durangensis*, germinadas en medio de cultivo MS con hormonas, modificado por Robert.

	CALLO			
	Ausencia	Escaso	Abundante	Muy abundante
T1	0	0.3055	0.2222	0.125
T2	0	0.4444	0.0555	0.2083

Cuadro. 17 Comparación de medias para formación de callo en cada uno de los tratamientos en *Agave durangensis*, germinadas en medio de cultivo MS con hormonas, modificado por Robert.

TRATAMIENTO	MEDIA
1	0.1632 A
2	0.1770 A

NIVEL DE SIGNIFICANCIA = 0.05

TUKEY = 0.2915

VALORES DE TABLAS (0.05), (0.01) = 3.46, 5.24

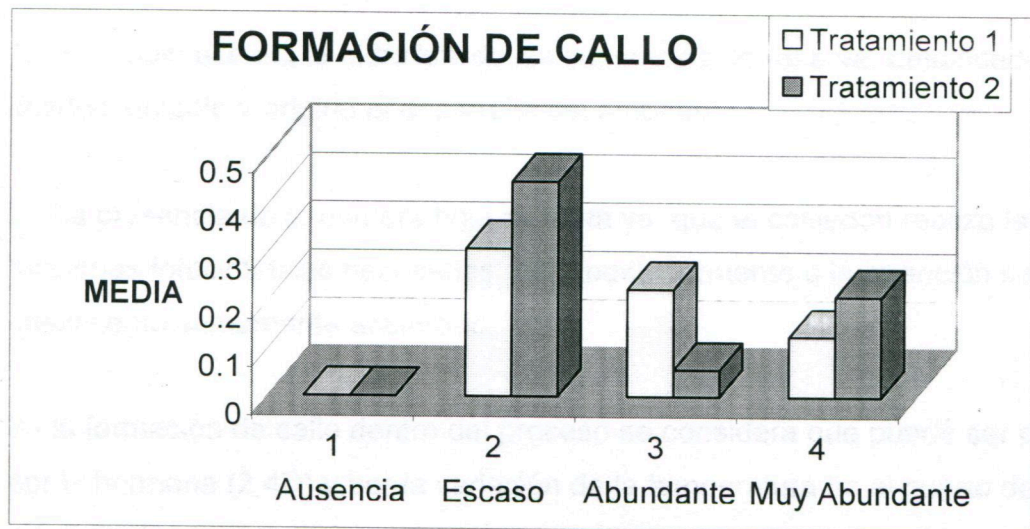


Figura. 5 Formación de callo en *Agave durangensis*. T1 = 24 horas de remojo
T2 = sin remojo

CAPITULO V

CONCLUSIONES

- 1.- El remojo acelera la hidrólisis de las sustancias de reserva, desencadenando el desdoblamiento y origina el desarrollo del embrión.
- 2.- La presencia de la primera hoja es lenta ya que el cotiledón realiza las funciones fotosintéticas necesarias, pero posteriormente a la aparición se tiene un crecimiento sumamente acelerado.
- 3.- la formación de callo dentro del proceso se considera que puede ser provocado por la hormona (2,4D) y por la variación de la temperatura en el cuarto de crecimiento.
- 4.- Lo anterior modifica la presencia o aparición de los brotes axilares.

CAPITULO VI

RECOMENDACIONES

Germinación

- 1.- A pesar de no haber diferencia significativa entre tratamientos, se sugiere el remojo por 24 horas de la semilla.
- 2.- Debido a que los reguladores de crecimiento funcionan de diferente manera dependiendo de la especie, y para continuar con la investigación en el cultivo *in vitro*, se recomienda determinar la combinación óptima para *Agave durangensis*, en base a concentraciones de BIA Y BAP.

BIBLIOGRAFÍA

- Barba, A. y colaboradores. Micropropagación de plantas.
México, D.F, Editorial Trillas, Primera edición, 2001, Pp. 11
- B, J. M. and B, C. C. The ecology life of *Agave virginica* L. In Tennessee cedar glades. The American Midland Naturalist, 1990. Pp. 449-452.
- Barron, M. L. "Desarrollo de un sistema de micropropagación de *Solanum cardiophyllum*".
Chihuahua, México, Editorial UACH, Primera edición, 1999, PP. 110-121
- Freeman, C. E. 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, 1994, Pp. 64-74.
- Grupo Reforma
2005-09-06 Ciudad de México
Sitio Web (URL) <http://www.reforma.com>
http://www.imacmexico.org/ev_es.php?ID=20988_201&ID2=DO_TOPIC
- Granados, D. y López, G. F. Ecología de Poblaciones Vegetales. Universidad México D.F. Editorial UACH, Primera edición, 2001, Pp. 43.
- Granados, D. Los Agaves en México
México D.F. Editorial UACH, Primera edición, 1999, Pp. 9.
- Goncalves de Lima. El Maguey y el Pulque en los Códices Mexicanos.
Fondo de cultura Económica. México. 1956.

- Hartmann, T;H. y K, E.D. Propagación de plantas, principios y practicas
CECSA. 2ª Ed. 1996. Pp. 161, 109-118, 193-195.
- Hurtado, D. V. y Merino, M. E. Cultivo de tejidos vegetales.
México, D.F, Editorial Trillas, sexta reimpresión, 2001, Pp.15-28.
- Jankiewicz, L.S. Reguladores del crecimiento, Desarrollo y resistencia en plantas,
Propiedades y acción.
México, D.F. Editorial UACH, Ediciones Mundi-Prensa, 2003, Pp. 24,29.
- Luna, P. Explotación actual y potencial del cultivo de *Agave tequilana* Weber en el
estado de Guanajuato.
Buenvista, Saltillo, Coahuila, México, Editorial UAAAN. Primera edición, 2003, Pp.
10, Tesis licenciatura.
- Martínez, J.L. nutricional de dos especies de maguey (*Agave atrovirens*. Kart) y
(*Agave salmiana*), en el sur del edo. De Coahuila.
Buenavista Saltillo, México, Editorial UAAAN, Primera edición, 1994, Pp. 6. Tesis
Licenciatura.
- Nobel, P.S Los incomparables Agaves y Cactus.
México, D.F. Editorial Trillas, Primera edición, 1998, Pp. 58.
- Nobel, P. S. Environmental Biology of agaves and cacti. University of California,
1991, Pp. 128-129.
- Ramírez, F. Respuesta a la fertilización y riego del maguey *Agave salmiana* para
uso forrajero en el cañón de San Antonio de las Alazanas.
Buenavista Saltillo, Coahuila, México, Editorial UAAAN, Primera edición, 1996,
Pp.6-11 Tesis licenciatura.

- Ramírez I. Biología celular.
México, D.F. Editorial Exodo, Primera edición, 1999, Pp. 63.
- Ramírez, J.A. Variación de constituyentes inorgánicos del medio de cultivo en savila (Aloe vera L.) In vitro.
México, D.F, Primera edición, Pp. 11,13. Tesis licenciatura.
- Raven, P. H. y C, H. Biología vegetal.
Barcelona, España, Ed. Omega S. A. 1985. Pp. 171,194-195.
- Robert, M.L. y Loyola, V.M. El cultivo de tejidos vegetales en México
México, D.F, Primera edición, Editorial CICY, 1985, Pp. 23.
- Soltero, R. Micropropagación de cactáceas raras, amenazadas y en peligro de extinción.
México, D.F, Editorial U. de G. Primera Edición, 1999.
<http://www.guanabios.org/circular/1-11/1-11-43.html>
- 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.
- Torres, M. Monografía, "el maguey" (Agave sp).
Buenaviasta, Saltillo, Coahuila, México, Editorial UAAAN. Primera edición, 1995, Pp. 63, 64. Tesis licenciatura.
- Weaver, R.J. Reguladores de crecimiento de las plantas en la agricultura.
México, D.F. Editorial trillas, S.A. segunda reimpresión, 1982.

Withers, L. A. Requisitos mínimos para recibir y mantener el material de propagación en cultivo de tejidos.

Reino Unido, Roma, Editorial Depto. De agricultura y horticultura, Universidad de Nottingham, Primera edición, 1985, Pp.1.

Valenzuela, J.F. Manual de Desarrollo Sustentable del Agave Mezcalero en Durango.

Durango, México, Editorial CIIDIR-IPN. Primera edición, 2003, Pp. 53, 58, 59.

Vázquez , C. y colaboradores. La Reproducción de las Plantas: Semillas y Meristemos.

México, D.F.Fondo de Cultura Económica, Primera edición, 1997, Pp. 26

ANEXO A

PREPARACIÓN DEL MEDIO MS MODIFICADO POR ROBERT.

Soluciones stock.

Macronutrientes.

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)	0.031 g
7.- Inositol	0.05 g

Preparación de la solución patrón

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

Cloruro de Calcio $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$

Se disuelve perfectamente 4.4 g. en 50 ml de agua destilada. Por cada litro de solución a preparar, tomar 10 ml de la solución de cloruro de calcio 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.

Solución B

Solución B (Macro)	Para 5 litros
1.-Mg SO ₄ (<i>Sulfato de Magnesio</i>)	4.62 g/lit

Preparación de la solución patrón

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

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

Preparación de la solución patrón

1. En un matraz Erlenmeyer de 500 ml agregar 50ml de agua destilada.
2. Poner en agitación.
3. Pesar cada uno de los reactivos y añadir de uno en uno (disolviendo perfectamente cada uno de ellos antes de agregar el siguiente).
4. Aforar a 100ml.
5. Guardar en frascos ámbar y etiquetar con el nombre de la solución, persona que la preparo y fecha de preparación.

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

Preparación de la solución patrón

1. Disolver cada uno de los reactivos por separado en 25 ml de agua destilada caliente.
2. Dejar enfriar.
3. Mezclar las dos soluciones en un matraz de aforación y completar a 100 ml.
4. Guardar en frascos ámbar y etiquetar con el nombre de la solución, persona que la preparo y la fecha de preparación.

Solución E (Vitaminas)

	g/lt.
Solución E	
1.- Glicina	0.0100 g/lt. * 10 =0.1
2.- Ácido nicotínico	0.0025 g/lt. * 10 =0.025
3.- Piridoxina	0.0025 g/lt. * 10 =0.02
4.- Tiamina	0.0200 g/lt. * 10=0.2
5.- Inositol	0.5 g/lt. En 10 ml. de agua destilada

Preparación de la solución patrón

1. pesar cada uno de los reactivos por separado.
2. Disolver en 5 ml de agua destilada.
3. Aforar a 10 ml y distribuir 1 ml. En 10 recipientes pequeños color ambar, estos se mantienen en congelación.

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

Auxinas.

2,4-D

2,4-Dichlorophenoxyacetic acid.

1. Pesar 0.002 g. y disolver en 0.5 de hidróxido de potasio 1 N (KOH). O alcohol etílico.
2. Agregar posteriormente un poco de agua destilada, aforar a 100 ml.
3. Tomar 1 ml. Para cada litro a preparar.

Citocininas.

6-Benzylaminopurina(Benziladenina)

Pesar 0.01g. y disolver en 0.5 ml de KOH (1N) agregar un poco de agua destilada y agregar al medio que se prepara, esta cantidad es para cada litro.

ANEXO B

PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO PARA GERMINACIÓN

- 1 En un matraz Erlenmeyer se puso de 2 Lts. 400 ml, de H₂O destilada y se procedió como sigue agitando constantemente.
- 2.- Añadir 100 ml de la solución A (macronutrientes)
- 3- Añadir 50 ml de la solución B (macronutrientes)
- 4- Añadir 1 ml de la solución C (micronutrientes)
- 5.- Añadir 5 ml de la solución D (micronutrientes)
- 6.- Añadir 1 ml de la solución E (vitaminas)
- 7.- Añadir 10 ml del Cloruro de calcio.
- 8.- Pesar aparte 30 gr. De sacarosa, disolver en la solución.
- 9.- completar el volumen a 900 ml con agua destilada.
- 10.- Ajustar PH a 5.7 – 5.8
- 11.- Aforar a 1 litro.
- 12.- Vaciar a 1 matraz de 2 lt.
- 13.- Agregar 8 gr. De agar.
- 14.- Tapar con una torunda de algodón.
- 15.- Clarificar en mechero o en horno de microondas.
- 16.- Distribuir el medio en recipientes gerber de 200 ml y esterilizar en autoclave a una presión de 15 libras durante 20-25 minutos.

ANEXO C

ANÁLISIS DE VARIANZA DE LOS TRATAMIENTOS 1 Y 2

Germinación

Cuadro. 4 Análisis de varianza para el porcentaje de germinación de semillas de *Agave durangensis*, germinadas en medio de cultivo MS sin hormonas.

FV	GL	SC	CM	F	P>F
TRATAMIENTOS	1	0.111115	0.111115	0.3820	0.547
ERROR	34	9.888885	0.290850		
TOTAL	35	10.000000			

C.V. = 14.71 %

Días a brotación de la hoja cotiledonar

Cuadro. 7 Análisis de varianza para la brotación de la hoja cotiledonar de *Agave durangensis*, germinadas en medio de cultivo MS sin hormonas, con datos ordenados en un cuadro completamente al azar.

FV	GL	SC	CM	F	P>F
TRATAMIENTOS	1	0.339844	0.339844	0.0343	0.848
ERROR	34	337.097656	9.914637		
TOTAL	35	337.437500			

C.V. = 15.52 %

Días de aparición de la 1ª hoja verdadera

Cuadro. 10 Análisis de varianza para la aparición de la 1ª hoja verdadera de *Agave durangensis*, germinadas en medio de cultivo MS sin hormonas, con datos ordenados en un cuadro completamente al azar.

FV	GL	SC	CM	F	P>F
TRATAMIENTOS	1	14.437500	14.437500	0.4951	0.507
ERROR	34	991.562500	29.163603		
TOTAL	35	1006.000000			

C.V. = 16.89 %

Formación de brote

Cuadro. 13 Análisis de varianza para la formación de brotes axilares de *Agave durangensis*, germinadas en medio de cultivo MS con hormonas, modificado por Robert, con datos ordenados en un cuadro completamente al azar.

FV	GL	SC	CM	F	P>F
TRATAMIENTOS	1	0.027778	0.027778	2.9565	0.091
ERROR	34	0.319444	0.009395		
TOTAL	35	0.347222			

C.V. = 348.95 %

Formación de callo

Cuadro. 16 Análisis de varianza para la formación de callo en *Agave durangensis*, germinadas en medio de cultivo MS con hormonas, modificado por Robert.

FV	GL	SC	CM	F	P>F
TRATAMIENTOS	1	0.000385	0.000385	0.0136	0.907
ERROR	6	0.170397	0.028400		
TOTAL	7	0.170782			

C.V. = 99.06 %