

2ej 106



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

"COMPARACION FISIOLÓGICA ENTRE PLANTAS NORMALES Y VITRIFICADAS DE AGAVES MICROPROPAGADOS CON ENFASIS EN RELACIONES HIDRICAS"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A ;
IGNACIO RODRIGUEZ ISLAS FLORES

México, D. F.

Octubre de 1989

FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CONTENIDO:	PAGINA:
RESUMEN.	9
I. INTRODUCCION.	11
1.1. IMPORTANCIA DEL CULTIVO DE <u>Agave</u> PARA EL- PAIS.	13
1.2. IMPORTANCIA DE LA INDUSTRIA TEQUILERA.	13
1.3. IMPORTANCIA DE LA MICROPROPAGACION DE <u>Agave</u> <u>tequilana</u>	14
1.4. IMPORTANCIA DE RESOLVER EL PROBLEMA DE VI- TRIFICACION.	15
II. ANTECEDENTES.	17
11.1. CICLO DE VIDA DEL GENERO <u>Agave</u>	17
a). UBICACION TAXONOMICA DEL GENERO <u>Agave</u> - <u>ve</u>	18
b). DESCRIPCION MORFOLOGICA DE <u>Agave te-</u> <u>quilana</u>	19
11.2. MICROPROPAGACION.	21
a). FACTORES ASOCIADOS A VITRIFICACION.	22
11.3. VITRIFICACION.	27
a). FACTORES ASOCIADOS A VITRIFICACION.	31
b). VITRIFICACION EN <u>Agave Tequilana</u>	39
III. PARTE EXPERIMENTAL.	43
III.1. OBJETIVO E HIPOTESIS.	43
III.2. DISEÑO EXPERIMENTAL.	43

III.3 METODOLOGIA.	43
a). MATERIAL BIOLÓGICO.. . . .	45
b). CONDICIONES DE CULTIVO.. . . .	46
c). MEDIOS DE CULTIVO.	47
d). PARAMETROS A MEDIR.. . . .	47
IV. RESULTADOS.	57
IV.1. CARACTERIZACION DE LOS MEDIOS.. . . .	59
IV.2. ALTERACIONES EN LAS PROPIEDADES DE LOS ME DIOS DURANTE EL CULTIVO DE EXPLANTES. .	62
IV.3. COMPORTAMIENTO DE EXPLANTES.. . . .	66
a). RELACIONES HIDRICAS.. . . .	66
b). CAMBIOS METABOLICOS.. . . .	70
IV.4. COMPORTAMIENTO DE BROTES.	72
a). RELACIONES HIDRICAS.. . . .	72
b). CAMBIOS METABOLICOS.. . . .	75
V. DISCUSION Y CONCLUSIONES.	79
VI. BIBLIOGRAFIA.	86

LISTA DE FIGURAS.

PAGINA:

Fig. 1. Cinética de deshidratación y de liberación de iones medida como cambios en conductividad de los medios de cultivo vitrificantes y no vitrificantes.	61
Fig. 2. Cambios en el potencial hídrico y conductividad de medios de cultivo vitrificantes y normales a lo largo de 12 semanas de cultivo.	63
Fig. 3. Número de brotes/explante producidos en la condición vitrificante y normal de la 7a. a la 14ava. semana de cultivo.	65
Fig. 4. Potencial hídrico, osmótico y de turgencia de explantes cultivados en condición vitrificante y normal durante 12 semanas de cultivo.	68
Fig. 5. Ajuste osmótico y contenido relativo de agua en explantes cultivados en condición vitrificante y normal a lo largo de 12 semanas de cultivo.	69
Fig. 6. Tasas fotosintéticas y respiratorias de explantes cultivados en medio vitrificante y normal a lo largo de 12 semanas de cultivo.	71

- Fig. 7. Potencial hídrico, osmótico y de turgencia de brotes obtenidos y crecidos en condición vitrificante y normal durante las semanas 10, 12 y 14. 74
- Fig. 8. Capacidad fotosintética y respiratoria de brotes obtenidos y crecidos en condición vitrificante y normal durante las semanas 10, 12 y 14. 77

LISTA DE FOTOS. PAGINA:

FOTO 1. Comparación entre los explantes de Agave Tequilana colocados en la condición vitrificante y normal. 39

FOTO 2. Comparación entre el consumo y la evolución de oxígeno efectuado por plántulas de Agave tequilana vitrificadas y normales. 56

LISTA DE TABLAS. PAGINA:

TABLA 1. Probables agentes causales de vitrificación. 32

TABLA 2. Resultados del análisis estadístico.

TABLA 3. Comparación entre las propiedades hidricas y mecánicas de los medios de cultivo. 60

TABLA 4. Número de brotes por explante, % de vitrificación y potencial hídrico inicial de condiciones vitrificantes y normales en la semana 14 de cultivo. 64

TABLA 5. Contenido de clorofilas totales y relación de clorofila A/B en explantes y brotes en condiciones vitrificantes y normales. 78

P F S U M E N .

Agave tequilana es una planta de importancia para el -- país, ya que de ella se extrae el tequila, producto cuya exportación genera ingresos de importancia. Existe una gran demanda de material para nuevas plantaciones, sin embargo es difícil satisfacer esta demanda de material para nuevas plantaciones con las técnicas de propagación tradicionales por ser, en este tipo de plantas, relativamente poco eficiente. En ésta y otras especies perennes, la micropropagación se ha sugerido como una alternativa. Sin embargo durante la multiplicación in vitro de Agave tequilana, como en otras especies, se presenta un fenómeno llamado vitrificación que disminuye la eficiencia de la micropropagación al morir gran cantidad de plántulas con este síndrome, en las etapas subsecuentes al desarrollo in vitro.

El presente trabajo constituye una aportación al conocimiento de los cambios en términos de relaciones hídricas y tasas metabólicas que sufren los tejidos de Agave tequilana durante diferentes etapas de vitrificación inducida.

Los resultados sugieren que existen desajustes en las relaciones hídricas de los explantes colocados bajo condiciones de cultivo vitrificantes. Estos desajustes en etapas pre-

I. INTRODUCCION.

El género Agave, conocido comunmente como maquey en la zona central del país, y henequén o sisal en la zona sureste, es típico de la flora mexicana y se encuentra distribuido ampliamente por todo el territorio nacional.

Los agaves han tenido múltiples aplicaciones, tanto en la medicina popular (Lezama 1957), como fuente de alimento -- (Callen, 1965), en la fabricación de armas y utensilios (Sheldon, 1980) en la industria textil y artesanal (Romo, 1977) y como bebida ya sea en forma fresca (Aguamiel; Granados 1981), fermentada (pulque) ó destilada (tequila; Halffter 1957, Gentry 1982).

Actualmente el estudio de los agaves empieza a cobrar mayor relevancia por su alto potencial explotable (fibras, tequila, pulque, alcohol, etc.) y el descubrimiento de nuevos productos derivados de los mismos: esteroides, enzimas proteolíticas, saponinas, celulosas, biomasa de levaduras, producción de madera sintética o bien para la obtención de hidrolizados y dextranas (Cruz, 1987; González, 1956; Sánchez, 1979; Romo, 1977; Bravo, 1978). Halffter (1957) clasifica a los -- agaves de acuerdo con su utilidad práctica en tres grupos dependiendo del producto final al que sean destinados: A).- -- aguardiente, como en el caso de Agave tequilana Weber. B).- fibra dura como el Agave fourcroydes Lem. y el A. sisalana y C).- pulque; tal es el caso de Agave salmiana y A. artrovi---

rens Karw.

Dentro de los diferentes usos que se les da a los agaves, destaca la fabricación de licor a partir de diferentes variedades de la especie Agave tequilana. (Como lo es la variedad conocida comunmente como "azul" o la variedad conocida como "pata de mula"). De ésta especie de Agave y otras en particular (Agave salmiana, Agave artrovirens Karw), se producen -- dos tipos distintos de bebidas. Las primeras provienen directamente de la savia extraída de las plantas vivas y se consumen frescas como aguamiel o fermentadas como pulque. Las segundas son los licores destilados, conocidos como mezcal o tequila, que fueron desarrollados subsecuentemente a la ocupación Europea en México.

El tequila es un producto derivado de la especie Agave-tequilana W. que existe en la región occidental de Jalisco. Este licor destilado se obtiene separando el meristemo y las partes blancas de la base de las hojas del total de la planta, al iniciarse la floración. Los meristemas (llamadas "cabezas") - que pesan entre 25 y 50 Kg. Estas "cabezas" son primero hervidos por 30 o 40 horas para hidrolizar el almidón a azúcar y -- posteriormente se maceran y se colocan en fermentadores en donde los azúcares son convertidos a alcohol por vía bacteriana y el jugo alcohólico es separado por destilación. Esta manufactura ha sido desarrollada en Tequila, Jalisco, de donde los -- productos toman su nombre oficial.

IMPORTANCIA DEL CULTIVO DEL Agave
PARA EL PAIS.

El área que ocupan las tierras cultivables en el mundo es de 1091.33×10^6 hectáreas. De este total el 6.2×10^6 hectáreas son tierras áridas o semiáridas. En México, cerca del 45% del territorio es de tipo árido o semiárido y se destina -- principalmente a los cultivos tradicionales como maíz, arroz, trigo, frijol, etc. Sin embargo los agaves, plantas adaptadas a condiciones semidesérticas, debido a que poseen un metabolismo de tipo CAM (Metabolismo ácido de las crasuláceas), que les permite cerrar sus estomas durante el día, evitando pérdidas excesivas de agua por transpiración y ser capaces de fijar CO_2 atmosférico por la noche cuando mantienen los estomas abiertos, para acumularlo en las vacuolas celulares de la hoja como malato. Esta ventaja de los agaves debe considerarse en la explotación de terrenos agrícolas marginados, que redituaría no solo en la explotación de sus productos tradicionales (fibra, tequila, pulque), sino también en su utilización como fuente alternativa de metabolitos como los esteroides, fructuosa, enzimas proteolíticas y dextranas.

IMPORTANCIA DE LA INDUSTRIA TEQUILERA.

En el año de 1983 había cerca de 15,000 familias dedicadas al cultivo de Agave tequilana y cerca de 3,000 laborando en

gen rizómico. Sin embargo la micropropagación pudiera aumentar la eficiencia de producción de dicho material de replante. Actualmente se cuenta con la metodología para la propagación in vitro de Agave fourcroydes Lem. y Agave tequilana-Weber, desarrollado por Robert et al (1986). Se ha calculado que de una planta madre de Agave Fourcroydes se pueden obtener 3750 plántulas in vitro mientras que en el campo la -- producción máxima de plántulas que se pueden obtener a través de la reproducción rizómica es de 10 plántulas por planta madre durante todo su ciclo de vida (Castorena, 1985). -- Una de las ventajas que presentan las plántulas micropropagadas con respecto a las generadas en la naturaleza es un incremento mayor en biomamasa, longitud y grosor, según las -- evaluaciones registradas hasta ahora (F. Contreras 1989, comunicación personal). Esto habla claramente del alto potencial que puede tener la micropropagación de Agave Tequilana en la producción de material de replante en un corto periodo de tiempo.

IMPORTANCIA DE RESOLVER EL PROBLEMA DE VITRIFICACION.

La búsqueda de una solución al problema de vitrificación cada día adquiere mayor trascendencia. El encontrar una solución y poder generalizarla a las demás especies eliminaría uno de los mayores problemas a los que se enfrenta la técnica de micropropagación en el mundo. También reduciría las grandes pérdidas de material biológico que ocasiona este fenómeno, haciendo más rentable la aplicación del cultivo in vitro y --

II. ANTECEDENTES.

Ciclo de vida del género Agave.

Poco es lo que se sabe de la biología del género Agave. Gentry (1982) los considera como rosetas perennes y monocárpicas, donde el crecimiento y acumulación de reservas progresan conjuntamente con el ciclo de maduración que es variable para las diferentes especies pero en general abarca de 8 a 20 años. Una vez alcanzado este período se inicia la floración, la cual ocurre solo una vez en la vida de la planta. Al término de la misma, la planta reduce todas sus funciones, degenera y muere.

El ciclo reproductivo de los agaves comprende dos vías asexuales y en casos excepcionales reproducción sexual, formando semillas que muestran un grado de germinación bajo, del 1 al 5% (Castorena, 1985). Sin embargo, Lundell (1937) reporta el caso del Agave Híbrido 11648 cuyo % de germinación es alto (55 a 60%), por lo que no es general en todas las especies la baja fertilidad y la falta de viabilidad en las semillas. Sin embargo, Bolio (1914) indica que las semillas que germinan producen plántulas de lento crecimiento, que degeneran en calidad y producción debido a la gran variación fenotípica que presentan, siendo esta una desventaja con respecto a las plántulas que se obtienen a través de vástagos asexuales.

Las 2 vías de reproducción asexual a partir de las cuales se pueden obtener plántulas están separadas en el tiempo; la primera es a través de vástagos que proceden de rizomas -- subterráneos que tienen origen en la base del tallo. Dicho rizoma tiene la forma de un cilindro sólido y longitud variable, está recubierto por brácteas de 1.5 a 3 cm. de diámetro, crece horizontal al suelo. Durante su crecimiento logra emerger a la luz y produce plántulas. A partir del primer año la planta produce de 5 a 10 rizomas durante su vida.

La segunda forma de reproducción vegetativa es por medio de bulbillos que aparecen en la base de las flores cuando éstas han caído prematuramente. A partir de una pequeña yema, se desarrollan plántulas muchas veces con cierto desarrollo radicular, las cuales sólo requieren llegar al suelo para continuar con su crecimiento y desarrollo (Castorena, 1985).

Ubicación taxonómica del género Agave.

A pesar de su importancia, la ubicación taxonómica de la familia agavaceae, así como de los géneros que la componen no es clara. Sin embargo, recientemente el género Agave ha sido colocado como perteneciente a la familia Agavaceae (Stanley, 1930; Wiggins 1980). Por tanto la clasificación más acep-

tada es:

Reino	Vegetal.
División.	Embriophyta.
Subdivisión.	Angiospermae.
Clase.	Monocotyledonae.
Orden.	Agavales.
Familia.	Agavaceae.
Tribu.	Agaveae.
Género.	<u>Agave.</u>
Especie.	<u>tequilana</u> Weber.

De acuerdo a Lawrence (1951); Traub (1935); Hutchinson (1964); Takhtajan (1980).

Descripción morfológica de Agave tequilana.

Agave tequilana es una planta suculenta que se extiende radialmente de 1.2 a 1.8 metros de alto, posee un tallo -- corto y grueso en la madurez (30 a 50 cm. de grosor). Hojas de 90 a 120 x 8 a 12 cm. de ancho, lanceoladas, acuminadas, -- firmes y fibrosas. Las hojas son anchas en la parte media, -- luego se estrechan y se engruesan hacia la base. Generalmente son azulosos o gris verdosas y poseen dientes laterales -- con un tamaño de 3 a 6 mm de largo, las puntas son delgadas y flexionadas de la base piramidal hacia abajo, de color café a

MICROPROPAGACION.

Micropropagación, cultivo de tejidos y propagación in vitro son sinónimos de una técnica que permite el incremento mediante reproducción asexual del número de individuos en condiciones artificiales, asépticas, con nutrición, luminosidad y temperatura controlados.

La micropropagación ha demostrado su utilidad en especies de multiplicación deficiente o relativamente lenta (orquídeas, espárrago, algunas cactáceas, etc.) y en plantas que aunque sean fácilmente propagables asexualmente, su número se aumenta considerablemente al ser cultivadas in vitro, con respecto a las cantidades obtenidas a través de los métodos tradicionales de esqueje, estolón, bulbo, etc. La micropropagación ofrece una ventaja adicional, ya que se puede obtener mayor uniformidad genética del material de replante, evitándose la variación genotípica propia de poblaciones generadas por semilla.

La micropropagación se aplica actualmente con buenos resultados tanto en plantas anuales como bianuales (frutales, hortalizas, plantas de ornato). Por el contrario, en especies perennes no ha tenido el mismo avance, puesto que este tipo de plantas presentan inconvenientes para la propagación in vitro como por ejemplo la edad de los tejidos y órganos, ya que conforme avanza su madurez resultan menos susceptibles de ser propagados.

especie. Esto ha llevado a formular combinaciones con menor o mayor cantidad de sales, surgiendo así los medios modificados. Una concentración alta de sales puede tener un efecto tóxico sobre el tejido mientras que una disminución en la formulación puede limitar o anular la micropropagación, dependiendo de la especie (Skirving, 1961; López, 1976; Seabrook, 1980).

Inóculo.

También llamado explante, es un fragmento extraído de la planta donadora, con el propósito de cultivarlo asepticamente. Cuanto más pequeño sea, menos probabilidades hay de contaminación del medio por microorganismos adheridos al inóculo, pero también existen menos probabilidades de desarrollo. El lugar de la planta de donde se extrae también es importante, según sea el propósito de la siembra (raíz, tallo, hoja, antera, etc.). Para la micropropagación se prefieren órganos o fragmentos cuyo tamaño es variable, llenando desde mm. hasta cm. (ápices, yemas y ramas]. La edad fisiológica determina el tipo y la velocidad de morfogénesis en relación con el tipo de medio de cultivo en que se siembre, pues generalmente los tejidos jóvenes tienen mayor capacidad de diferenciación que los tejidos maduros (Hughes; 1981). Como regla general, las plantas jóvenes proveen los mejores explantes para micropropagar, puesto que las plantas maduras presentan un

cultivo es absolutamente necesaria para todos los tejidos cultivados in vitro ya que estos se encuentran bajo condiciones heterotróficas (Seabrook, 1980; López 1976).

La fuente de carbono más comunmente utilizada es la sacarosa en concentraciones de 2 a 3% (Seabrook, 1980). La glucosa y la fructuosa pueden sustituir en algunos casos a la sacarosa (Hughes, 1981). A los carbohidratos se les atribuyen dos funciones en los medios de cultivo: proveer la fuente de energía y mantener un potencial osmótico en el medio de cultivo, por lo que la dosis y tipo de fuente de carbono puede causar trastornos en micropropagación (Skirvin, 1961).

Estado físico del medio de cultivo.

El agar es el material más utilizado para gelificar los medios de cultivo, las cantidades utilizadas varían considerablemente. Como se explicará más adelante, altas concentraciones de agar pueden inhibir el crecimiento de los cultivos debido al potencial iónico elevado y a la reducción en la disponibilidad de nutrientes y materia orgánica a los tejidos (Skirvin, 1981). Por otro lado, concentraciones reducidas de agar provocan un incremento en la liberación de agua en el medio de cultivo, por lo que la concentración de agar adecuada para cada situación, deberá ser determinada experimentalmente para ca

da situación en particular. Sin embargo, una concentración de 0.8% es generalmente suficiente para la mayoría de los - propósitos de cultivo (Seabrook, 1980).

II.3. VITRIFICACION.

Una de las alteraciones más importantes que se presenta en micropropagación es la vitrificación. Este fenómeno, es definido como un conjunto de alteraciones fisiológicas y bioquímicas que se reflejan en la pérdida de grandes cantidades de material biológico durante las etapas sucesivas al desarrollo in vitro (Debergh et al., 1981; Kevers, 1987).

Este fenómeno no es exclusivo de una especie (Ziv, --- 1987), pues ha sido reportado para varias especies tanto herbáceas como leñosas y ornamentales: Prunus malus (Poxus et al., 1978); Cynara scolymus (Debergh et al., 1981), Salix babilonica (Letouze et al 1983; Bechausne, 1981) Dianthus caryophyllus (Ziv, 1983; Kevers, 1987). Dentro de las características más evidentes de este fenómeno podemos mencionar el aspecto suculento, hiperhidratado y translúcido que presentan los brotes durante su desarrollo. El aspecto translúcido parece estar asociado a una menor cantidad de clorofila (Phan y Letouze, 1983). Las hojas y tallos generalmente son quebradizas o se curvan hacia sus partes internas. Sus tallos son gruesos y translúcidos, algunas veces con hábito de crecimiento arbustivo (Vieth et al., 1983; Kevers et al., 1984). Se ha tratado de encontrar la causa de este desorden y los estudios efectuados han mostrado una serie de anomalías en las plantas. Kevers y Gaspar (1985) encontraron que en general las plantas

afectadas presentan una baja capacidad de lignificación en vasos y traqueidas acompañado por una deficiencia de celulosa en pared celular.

En estudios realizados con plantas vitrificadas de Dianthus Caryophyllus se encontró que no existían ceras cuticulares y que los estomas no eran funcionales, pues no respondieron a los estímulos (obscuridad, ABA y Ca++) que se sabe afectan el turgor de las células guarda, responsables principales del cierre estomatal (Werker y Leshem, 1987; Ziv et al., 1987). Esta falta de control estomático trae consigo un nulo control de transpiración, razón por la cual cuando las plantas son llevadas a condiciones de invernadero presentan una sobrevivencia muy baja o nula (Vieitez et al., 1985). La densidad de los estomas en las plantas vitrificadas es variable de planta a planta, siendo en algunos casos similar a la de las plantas normales y en otros muy bajo con respecto a estas últimas (Gersani et al., 1986; Werker et al., 1987). Además se presentan anomalías en las células guarda, como la reducción en el número de cloroplastos acompañado de un aumento en el volumen de los mismos. Otro desorden observado es que los estomas están sobre el nivel de la epidermis, mientras que en las hojas normales de edad similar, los estomas se encuentran ubicados al mismo nivel de las células epidérmicas o incluso ligeramente hundidos (Werker et al., 1987; Ziv et al., 1987).

Otros estudios morfológicos reportan anomalías como son la desintegración del núcleo y la pérdida de la organización citoplásmica (Bornman y Volgemann, 1987).

Werker y Leshem (1987) al comparar plantas normales con plantas que presentan vitrificación durante varias etapas de desarrollo encuentran las siguientes diferencias:

- A). Reducción del período en el cual las células meristemáticas permanecen dividiéndose y creciendo en el brote.
- B). Hipertrofia de las células, disminuyéndose la elongación del eje en el cambium.
- C). Paredes celulares defectuosas, en ciertas regiones se forman cavidades debido fundamentalmente a la desintegración de la lámina media.

En estudios anatómico-estructurales realizados durante el proceso de vitrificación en Dianthus caryophyllus se ha podido observar que el número de células que se encuentran en la circunferencia del tallo es mayor en las plantas vitrificadas que el existente en las plantas normales. (Werker y Leshem, 1987).

En las plantas vitrificadas se han encontrado grandes espacios intercelulares entre las células del tallo y en el eje del primordio foliar, lo que trae como consecuencia una comunicación deficiente entre el ápice del brote y el resto del tallo (Werker y Leshem, 1987). También presentan un anillo perivascular de esclerenquima muy pequeño, reducido o ausente, mientras que el tejido del xilema se encuentra poco diferenciado y pobremente lignificado. En los ápices de plantas vitrificadas las regiones meristemáticas no se reconocen fácilmente, pues sus células son largas y algunas veces vacuoladas. En este tipo de ápices solamente las células madre y las células de dos capas de la tónica permanecen evidentemente meristemáticas; mientras que en las plantas sanas el meristemo permanece intacto y 4 o 5 capas de células toman parte en la formación del primordio foliar (Veitez et al., 1985).

En plantas vitrificadas los primordios foliares mantienen un patrón de maduración diferente al de las hojas normales, pues las primeras detienen su maduración estructural y división justo abajo del ápice del primordio, mientras que las hojas normales mantienen divisiones tanto abajo del ápice como en todo el primordio (Werker et al., 1986). Las hojas de los brotes vitrificados se caracterizan por la carencia de una diferenciación clara entre el parénquima en empalizada y el parénquima esponjoso. (Werker et al., 1986; Veitez et al., 1985).

Factores asociados a vitrificación.

Se han sugerido una serie de factores que causan vitrificación en diferentes especies (tabla 1).

Potencial de agua.

Fue el potencial de agua (en su componente de matriz) - el primer agente que se manejó como causante de vitrificación, asociado a las bajas concentraciones de gelificante que se encuentran en el medio de cultivo (Debergh, 1983; Kevers, et al. 1984).

El potencial hídrico de un sistema es considerado como la energía química disponible en el mismo para realizar un -- trabajo mecánico. Dicho potencial, llamado también potencial químico, depende de la suma total de las diversas componentes que guardan una dependencia directa con la energía disponible en el sistema con respecto a la del agua pura que es considerada igual a cero bajo condiciones constantes (a una atmósfera de presión y 25°C).

TABLA 1. Probables agentes causales de vitrificación.

AGENTES CAUSALES DE VITRIFICACION		
ESPECIES	INDUCTORES PROBABLES	AUTORES
<u>Dianthus caryophyllus</u>	Medio líquido	Hauzinka 1974, Davies 1977, Sutter and Langhans 1979
<u>Prunus sp.</u>	Iones cloro	Quoirin and Leproivre 1977.
<u>Orunus sp.</u> <u>Malus sp.</u>	Inespecifico	Boxus et al., 1978.
<u>Prunus sp.</u>	Inespecifico	Zuccherelli 1979.
<u>Malus doméstica.</u>	Contaminantes del medio.	Pasqualetto et al., - 1988.
<u>Cucumis melo.</u>	Altas cantidades de citocininas.	Leshem et al., 1988.
<u>Salix babilónica.</u>	Altas cantidades de auxinas o citocininas.	Bechausne 1981.
<u>Pices abies</u>	Potencial de matriz.	Von arnold et al., - 1984.
<u>Cynara scolymus</u> <u>Forsythia intermedia</u> <u>Gerbera nymph.</u> <u>Gerbera jamesonii</u>	Potencial de matriz. Alta cantidad de citocininas.	Debergh et al., 1981 Debergh 1983.

ESPECIES	INDUCTORES PROBABLES	AUTORES
<u>Dianthus caryophyllus</u>	Potencial de matriz y cierre de frascos, Altas cantidades de auxinas.	Debergh et al., 1981. Hakkaart and Versluijs 1983. Leshem et al., 1985.
<u>Salix babilónica</u>	Iones NH ⁴	Letouzé and Daguin -- 1983.
<u>Dianthus caryophyllus</u> .	Potencial hídrico del medio. Humedad relativa de los frascos.	Hakkaart and Versluijs 1983; Ziv et al., 1983 Bottcher et al., 1988.
<u>Dianthus caryophyllus</u> .	Etileno.	Kevers et al., 1985.

Modificada de Kevers et al., 1984.

La ecuación que describe la relación entre las diversas componentes es la siguiente:

$$P_w = P_{\pi} + P_m + P_t$$

Donde:

P_w = Potencial hídrico.

P_{π} = Potencial osmótico.

P_m = Potencial matricial.

P_t = Potencial de turgencia.

El potencial de turgencia se refiere a la presión generada por el agua al ingresar al interior celular y que comprime la membrana plasmática contra la pared celular (López, --- 1984).

El potencial de matriz es aquel que se genera debido a la adsorción de las moléculas de agua a superficies y coloides que presentan la posibilidad de una retención adicional y cuya capacidad retentiva crea este potencial.

El término de potencial osmótico se refiere al incremento o disminución del potencial de agua debido principalmente a los solutos capaces de unirse o entrar en disolución con el agua disminuyendo su actividad, ejemplo de esto son los --

carbohidratos y otros osmolitos (López, 1984).

Al parecer un alto potencial de matriz facilita una mayor disponibilidad de nutrientes del medio al explante en cultivo. Kevers et al., (1984).

Mucho se ha escrito sobre la importancia que tiene la consistencia del medio de cultivo y la concentración de gelificante utilizado para que se presente o no vitrificación. La concentración del gelificante contribuye al potencial de matriz del medio, por lo que se ha señalado al potencial de matriz como un factor importante en la inducción de vitrificación (Debergh, 1983). Así para Picea Abies L. Karst Arnold y Erikson et al., (1984), describen el efecto de varias concentraciones de agar y su influencia sobre los tejidos, donde a bajas concentraciones de agar se presenta un alto porcentaje de vitrificación y conforme se incrementa la concentración de agar la vitrificación disminuye. Sin embargo cabe destacar que al aumentar la concentración de agar también disminuye el número de plántulas obtenidas. Estos resultados son consistentes con lo observado por Debergh (1983), en estudios realizados con Cynara scolymus.

En Dianthus caryophyllus se ha identificado al componente de matriz del potencial hídrico y al sellado hermético de-

los frascos de cultivo como responsables de la vitrificación (Hakkart, 1983; Ziv, et al., 1983).

La humedad relativa ha estado estrechamente relacionada con la vitrificación (Ziv et al., 1983; Pottcher et al., - 1988). Estudios con Dianthus chinensis L. y Cynara scolymus mostraron que variando las propiedades físicas del medio de cultivo y la humedad relativa se puede inducir o revertir la vitrificación, aunque dicha reversión queda limitada únicamente al surgimiento de hojas nuevas y no a los tejidos ya vitrificados.

Amonio.

El amonio fue otro de los compuestos sugeridos como -- probables agentes causales de vitrificación. Dagein et al., - (1986), estudiando cultivos in vitro de Salix babilonica en -- medios con diferentes concentraciones de nitrato de amonio --- (6.2, 12.5 y 20.6 mM) encontraron que conforme se incrementa la concentración de este compuesto se inducen los síntomas de vitrificación. Esto también fue observado por Kevers et al., (1984).

Kevers et al., (1984) reporta vitrificación en Dianthus caryophyllus como un fenómeno asociado a la enzima fenilamonio liasa (PAL), enzima relacionado con la lignificación de la pa-

red celular, al encontrar que tanto el contenido de lignina - como la actividad de (PAL) se encuentran disminuidos en plantas crecidas en condiciones vitrificantes (cultivo líquido) - con respecto a aquellas crecidas en condiciones normales.

Contaminantes del agente gelificante.

Debergh (1983), trabajando con Cynara scolymus encontró que al igual que la concentración, la marca del agente gelificante juega un papel importante en la aparición de la vitrificación, pues las diferentes marcas contienen diferentes contaminantes (Ca, Mg, K, Na, P, Fe, Mn, Zn, Cu) que pueden actuar como inhibidores de la vitrificación, pues de acuerdo a la concentración de gelificante se encontrará disponible en mayor o menor cantidad cada uno de los elementos que pudiera adsorber al agente que induce vitrificación, si éste no está determinado por el material biológico.

Pasqualeto et al., (1988), trabajando en la micropropagación de manzana, donde la vitrificación es un fenómeno común, encontraron que en los gelificantes utilizados en el medio de cultivo (Gelrite y Bacto-agar) existían cantidades muy diferentes de cationes. Un análisis más detallado de los gelificantes mostró que las concentraciones de potasio (K) y Magnesio (Mg) existentes en Gelrite con respecto a las existentes en --

Racto-agar eran 30 a 40 veces mayores en Gelrite (Pasqualetto, datos no publicados).

Fitorreguladores.

Otros factores propuestos como inductores de vitrificación han sido los reguladores de crecimiento, como son las --- auxinas, citocininas y etileno (Debergh, 1983; Leshem et al., - 1985-1988). Se ha reportado que las citocininas como la 6- - Bencil aminopurina (BAP) colocadas exógenamente en los culti-- vos in vitro de melón, causan vitrificación (Leshem et al., -- 1988). De igual forma, Gaspar et al., (1987) encontró que el BAP disponible en el medio de cultivo induce vitrificación en manzana. Leshem et al., (1988) encontró que altas concentra-- ciones de auxina como el ácido naftalenésctico (ANA), en el me dio de cultivo incrementa la proporción de brotes vitrificados.

El etileno es otro regulador asociado con vitrificación (Kevers et al. 1985), se ha propuesto que tiene un efecto regu latorio sobre algunas de las enzimas que actúan en el proceso de lignificación. Estudios preliminares indicaron cambios im portantes en la liberación de etileno en respuesta a un medio vitrificante con respecto de uno no vitrificante; en el medio vitrificante la producción de etileno fue superior a la produ cida por las plantas colocadas en medios de cultivo normales -

para tejidos de Dianthus caryophyllus.

Vitrificación en Agave tequilana.

Durante la micropropagación de Agave tequilana, al igual que en las demás especies hasta ahora reportadas, se presenta el fenómeno de vitrificación que disminuye seriamente la cantidad de plantas que se pueden obtener por esta técnica (Foto 1, - Robert et al., datos no publicados).



Foto 1. Comparación entre la condición vitrificante y normal, donde se cultivaron ex plantes de Agave tequilana.

Existen algunos trabajos que se iniciaron en el Centro de Investigaciones Científica de Yucatán para tratar de encon

trar la solución del problema en esta especie y de manera alternativa encontrar algún tipo de marcador que indicara el inicio del proceso de vitrificación.

Peraza (1988) hipotetizó que la vitrificación pudiera estar asociada a una baja concentración de oxígeno en los medios de cultivo, por lo que realizó un estudio del comportamiento de la enzima lactato deshidrogenasa (F.C. 1.1.1.27), indicadora del metabolismo anaerobio de los carbohidratos, durante el cultivo in vitro de Agave tequilana bajo condiciones vitrificantes, asumiendo que en ellas se encontraban afectadas tanto la aereación como la captación de nutrientes (sacarosa). Para la condición vitrificante (deficiente en oxígeno) utilizó como agente gelificante Gelrite en una concentración de 0.15%, mientras que para la condición no vitrificante (aereación adecuada) utilizó Agar-Agar en concentración 1% como agente gelificante.

De acuerdo a sus resultados, la actividad de la enzimas más elevada en los explantes colocados en la condición normal (con buena aereación), lo que no apoya que haya menos cantidad de oxígeno en la condición vitrificante. También pudo observar que la velocidad de captación de sacarosa ocurre mucho más rápidamente en el tratamiento vitrificante que en la condición normal, a juzgar por los resultados de reductores to

tales que obtuvo en las primeras semanas, sugiriendo que la consistencia física del medio de cultivo determina la velocidad de captación de nutrientes.

Probablemente el alto potencial de agua de la condición vitrificante "anaerobia" es un factor que afecta de manera importante muchas actividades celulares (Kumar and Singh 1979).- Esto es consistente con el hecho de encontrar bajas actividades en la condición vitrificante cuando se esperaba lo contrario.

Por otra parte, Maldonado (1988) cuantificó la actividad de la glucosa 6 fosfato deshidrogenasa durante la micropropagación de Agave tequilana bajo una condición vitrificante, hipotetizando que ésta enzima pudiera actuar como un marcador bioquímico del fenómeno de vitrificación.

En su sistema experimental, para la condición vitrificante usó gelrite 0.12% y para la condición normal utilizó gelrite 1.2%. Su estudio comprendió el análisis del comportamiento de la enzima en explantes y brotes adventicios. Sus resultados mostraron que la actividad de la glucosa 6 fosfato deshidrogenasa fue significativamente más alta en los explantes de la condición vitrificante que la registrada en los explantes de la condición normal. Además notó un incremento en la actividad de la enzima en los explantes de ambas condiciones a los treinta días (previo al surgimiento de los brotes). La actividad específica de la glucosa 6 fosfato deshidrogenasa en los brotes vitrificados se encuentra disminuída con respecto de la

actividad registrada en los brotes normales. Estos resultados le permiten sugerir que la enzima está jugando un doble papel en la micropropagación de Agave tequilana, uno durante la inducción de brotes y el otro durante el surgimiento de -- los mismos, y que dicha disminución de actividad registrada en los brotes vitrificados disminuye el aporte de los equivalentes reductores y esqueletos carbonados (eritrosa-4-fosfato) para la síntesis de compuestos fenilpropanoides, lo que probablemente reduce el proceso de lignificación durante organogénesis y crecimiento de brotes en la condición vitrificante.

Además, sugiere que la elevada actividad de la glucosa 6 fosfato deshidrogenasa observada en los explantes colocados en condición vitrificante puede utilizarse como un posible -- marcador de vitrificación.

A pesar de estos avances aún no se cuenta con marcadores fisiológicos y bioquímicos que nos permitan prevenir vitrificación en Agave tequilana.

III. PARTE EXPERIMENTAL.

OBJETIVO.

Contribuir al conocimiento del fenómeno de vitrificación desde el punto de vista de relaciones hídricas, mediante el estudio de los cambios en las relaciones hídricas de medios-vitrificantes y normales a través del tiempo de cultivo, y cómo se reflejan dichos cambios en las relaciones hídricas y tasas metabólicas de los tejidos crecidos bajo condiciones vitrificantes.

HIPOTESIS.

Si el medio vitrificante presenta un mayor potencial de matriz es de esperarse que exista una mayor disponibilidad de agua y componentes del medio hacia los tejidos crecidos en esta condición. Esta mayor disponibilidad debe reflejarse en un potencial hídrico elevado en los tejidos y en una mayor toma de iones del medio de cultivo vitrificante a los explantes crecidos en esta condición. Estos altos contenidos de iones y los potenciales hídricos elevados en los tejidos, deben ocasionar cambios en los procesos metabólicos que lleven de manera indirecta a vitrificación.

DISEÑO EXPERIMENTAL.

Experiencias previas en este laboratorio han mostrado --

que los medios de cultivo gelificados con gelrite 0.15% inducen la formación de brotes con un 100% de vitrificación mientras que los medios de cultivo gelificados con agar 1% inducen la formación de una alta proporción de brotes normales. De acuerdo con estos resultados se decidió utilizar este sistema como modelo experimental en nuestra investigación.

Se cultivaron explantes en ambas condiciones (vitrificantes y normales) y se monitorearon a intervalos semanales las relaciones hídricas tanto de los medios como de los tejidos colocados en ellos, así como los cambios sufridos en las tasas metabólicas de explantes y brotes durante 14 semanas. Los resultados provienen de dos experimentos independientes y en cada uno se utilizaron muestras por triplicado para cada medición.

La primera parte de este trabajo consistió en la caracterización de las propiedades mecánicas de los medios de cultivo de condición vitrificante y normal, con el propósito de conocer el comportamiento del gel formado por la adición de diferentes cantidades de polímero. También se decidió evaluar las relaciones hídricas de los medios de cultivo vitrificante y normal al inicio del experimento a fin de obtener información sobre la capacidad retentiva del gel y la capacidad de disponibilidad de agua en los mismos.

La segunda parte de este trabajo consistió en evaluar las relaciones hídricas (potencial hídrico, osmótico, turgencia y contenido relativo de agua) de los tejidos (explantos y brotes) de Agave tequilana cultivados en condiciones vitrificantes y normales, para conocer los cambios hídricos asociados a ambas condiciones.

En esta etapa, se evaluaron los cambios metabólicos de explantes y brotes cultivados en condiciones vitrificantes y normales. Los parámetros estudiados fueron capacidad respiratoria y fotosintética, contenido de clorofilas totales y proporción de clorofila A/B.

Se monitorearon también el potencial hídrico y la conductividad de los medios durante el transcurso del cultivo in vitro, con el fin de conocer los cambios que ocurren en los medios vitrificantes y normales al cultivar explantes en ---ellos.

Metodología.

Material biológico.

Plantas de Agave tequilana Weber, colectadas en Tequila, Jalisco y adaptadas en los viveros del Centro de Investigación Científica de Yucatán fueron utilizadas para el presente trabajo. Las edades promedio de las plantas fue de un año dos meses, con una talla entre los 50 y 60 cm; las plantas --fueron arrancadas del suelo y deshojadas manualmente. La "piña" o parte meristemática se trasladó al laboratorio, se lavó con agua corriente de llave durante 10 minutos.

Se cortaron las partes externas de la "piña" hasta formar un cubo; este tejido se lavó con agua destilada tres veces. Inmediatamente después, en una campana de flujo laminar se sometió a esterilización con cloro comercial al 30% durante --- treinta minutos, se decantó la solución y el tejido se enjuagó nuevamente tres veces con agua estéril.

El cubo de tejido se colocó en una caja de Petri, procediendo a seccionarlo hasta tener explantes de 1 cm³. Los explantes obtenidos de la parte superior (meristématica) fueron nuevamente desinfectados con una solución de cloro al 10% durante 5 minutos bajo agitación constante. Posteriormente los cubos fueron lavados con agua estéril por tres veces. Los cubos fueron sembrados en los medios de cultivo siguientes:

Para inducir vitrificación se utilizó un medio de cultivo solidificado con Gelrite de la compañía Scott en una concentración de 0.15%. Para las condiciones normales se usó como agente gelificante Agar-Agar de la casa Merck en concentración 1%.

Condiciones de cultivo.

Los explantes fueron colocados en un cuarto de cultivo bajo iluminación constante a una intensidad lumínica de 4800 - luxes proporcionados por lámparas fluorescentes Slimline de 39-

Watts. La temperatura fue de $26 \pm 2^\circ\text{C}$.

Medios de cultivo.

El medio de cultivo utilizado en el experimento fue el reportado por Murashige y Skoog (1962) y modificado por Robert et al., (1987] para el cultivo in vitro de Agave fourcroydes - Lem., dicha modificación consiste en la adición de 5 mM de --- KNO_3 , 18 mM de NH_4NO_3 , 10 mg/l de 6 BAP y 0.25 mg/l de 2-4 D.

Parámetros a medir.

Caracterización mecánica de los medios de cultivo.

La caracterización mecánica (viscosidad, elasticidad), - se realizó con un Rheotrón (G.W. Brabender) conectado a un registrador de carta X-Y, cuya velocidad fue de 120 cm/min. La muestra se colocó en láminas cónicas con un ángulo de 3.2 grados, diámetro de 2 cm. y se aplicó una fuerza de deformación - de 0.1 rpm.

Conductividad de los medios.

La conductividad de los medios se midió con un conductímetro de la marca Cole Parmer modelo 4070. La medición se llevó a cabo cada dos semanas. Se tomaron muestras del medio, se colocaron en el electrodo del conductímetro y se registró la lectura. Los medios se agitaron y se vertieron en el electro

do hasta saturar su capacidad.

Relaciones hídricas.

El potencial hídrico del medio se midió con un higrómetro de punto de rocío Wescor H-33T conectado a cámaras de muestra C-52. Este es un aparato que tiene en las cámaras de muestreo un termopar consistente de dos cables de diferente potencial de resistencia, uno de cobre y otro de constantano conectados entre sí. Cuando los alambres de cobre y constantano -- tienen la misma temperatura, la diferencia en potencial es cero. Si la temperatura es modificada por medio de una corriente, se genera una diferencia de potencial en la unión de los -- alambres. Esta diferencia de potencial puede ser detectada -- con un microvoltímetro diseñado para detectar los pequeños cambios que se generan en la humedad relativa de las cámaras donde se encuentran las muestras.

Utilizando termopares para medir la temperatura y la -- presión de vapor o humedad relativa, se puede determinar el potencial de agua del aire o de cualquier material.

$$P_w \text{ aire} = \frac{RT}{V} \quad 2.3 \text{ Log } \frac{P}{P^0}$$

donde:

P_w = Potencial de agua del aire en bars.

R = Constante de los gases (0.0831 litros bars/moles
X°C.

T = Es la temperatura absoluta (X°C + 273.16).

V = Es el volúmen molar del agua en el aire.

P = Presión de vapor del agua en el aire.

P* = Presión de vapor del aire saturado con agua a una
temperatura dada.

La humedad relativa del aire (HR) es por definición ---
igual a $100 P/P^*$, así que sustituyendo:

$$P_w \text{ aire} = \frac{RT}{V}$$

$$2.3 \text{ Log } \frac{HR}{100} = - 10.6 T \text{ Log } \frac{100}{HR}$$

De acuerdo con esta ecuación, conforme la HR es mayor, -
el potencial de agua aumenta. Esta relación es la que se usa
para estimar potenciales de agua de suelos y plantas, utilizan
do termopares higrométricos.

El instrumento que se utilizó en nuestros experimentos-
mide la humedad relativa en equilibrio con el tejido por medio
del "rocío" que se deposita cuando se hace incidir corriente -
en la dirección adecuada (efecto Peltier) sobre el termopar y-
se empieza a evaporar a una velocidad dependiente de la HR de-

la atmósfera interna de la cámara de muestreo, que a su vez es ta controlado por el potencial de agua del tejido.

La evaporación del agua enfría el termopar por debajo - de la temperatura del termopar seco localizado afuera de la ca mara y por lo tanto una pequeña corriente proporcional a la de presión en temperatura corre entre los termopares. Esta depre sión se mide con un microvoltímetro, indicando la HR entre el potencial del agua del aire y el potencial del agua de la hoja. El voltaje debe ser convertido a unidades de potencial de agua, calibrando el instrumento con soluciones estándares de concentraciones conocidas.

Se tomaron muestras de 4 a 6 mm de espesor con un saca- bocado de 6 mm de diámetro y fueron colocadas en las cámaras - dejando un tiempo de equilibrio de 30 minutos, a una temperatu ra de $20 \pm 2^\circ\text{C}$.

El potencial osmótico del medio se determinó con un os- mómetro modelo 3LF para lo cual se prepararon medios de culti- vo, a los que se les adicionó el gelificante, se agitaron du- rante 24 horas, se tomaron alícuotas de 5 mililitros y se pro- cedió a la medición en las celdas de lectura.

El potencial de matriz se obtuvo a través del cálculo - de las diferencias entre los potenciales hídrico y osmótico de

los medios de cultivo, asumiendo la ausencia de potencial de turgencia.

Para obtener las curvas de retención de agua se preparó medio, se colocó en el autoclave durante 20 min. a 1.1 kg/cm² y 24 horas después se tomaron muestras y se colocaron en bolsas de diálisis del número 30 de 10 cm. de longitud y cerradas por sus extremos. Las bolsas conteniendo los medios fueron colocadas en una estufa a 30°C y cada 30 minutos fueron pesadas en una balanza analítica marca Bosch modelo S 2000.

Contenido relativo de agua de los tejidos.

El contenido relativo de agua de los tejidos fue determinado como:

$$\text{CRA} = \frac{\text{peso fresco} - \text{peso seco}}{\text{peso turgente} - \text{peso seco}} \times 100$$

El peso turgente se obtuvo poniendo a flotar los tejidos en agua durante 20 horas. Dicho tiempo fue determinado mediante curvas de hidratación realizadas previamente para este tejido, el peso previo a la flotación fue tomado como peso fresco; mientras que para el peso seco, el tejido fue puesto a secar en una estufa a 60°C durante 12 horas y enfriado en sílica gel anhidra antes de registrar el peso final.

Retención de iones en los medios.

La retención de iones en ambas condiciones se midió a través del aumento en conductividad del agua al sumergir los medios de cultivo. Se preparó medio de cultivo modificado por Robert et al., (1987), se esterilizó en autoclave durante 20 min. a 1.1 Kg/cm² y se dejó enfriar durante 24 horas. Se tomaron muestras y fueron pesadas en una balanza analítica Bosch - S 2000, depositadas en bolsas de diálisis del número 30, selladas en sus extremos y colocadas en agua deionizada y bidestilada cuya conductividad inicial fue de 3 uScm a 25°C. El incremento en conductividad del agua fue registrado cada 5 minutos.

Tasas metabólicas de tejidos en cultivo.

Las capacidades respiratoria y fotosintética fueron analizadas con un oxígrafo Gilson 5/6 conectado a un electrodo de oxígeno tipo Clark (un electrodo de oxígeno es una forma especial de celda electroquímica en la cual se genera una corriente que es proporcional a la actividad del oxígeno presente en una solución).

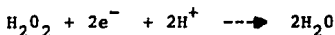
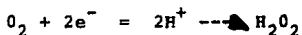
Su principio básico de operación son dos alambres, uno de platino y otro de plata recubierto de cloruro de plata. Estos alambres se encuentran sumergidos en una solución electrolítica por ejemplo de KCl. Se aplica a través de los alambres un potencial eléctrico, haciendo el electrodo de platino nega-

tivo respecto al de plata, ocasionando que se produzcan las siguientes reacciones electrolíticas:

En el electrodo de plata:



En el electrodo de platino:



Si los alambres están conectados a una pila eléctrica, la corriente fluirá de la plata al platino. En condiciones apropiadas, la magnitud de la corriente será linealmente proporcional a la actividad del oxígeno en solución. Si no hay oxígeno presente no ocurrirá reacción en el electrodo de platino y no deberá fluir corriente. El electrodo posee una membrana que es permeable al oxígeno pero impermeable a las demás sustancias. La membrana puede ser de celofán, colodión, politeno, mylar, etc. El cátodo de platino consume oxígeno y a fin de mantener un gradiente estable de oxígeno a través de la membrana se agita la solución a unas 500-600 rpm.

Si la producción de corriente del electrodo a una actividad dada del oxígeno se grafica contra el voltaje polarizador,-

se encuentra que llega a un máximo entre 0.4V y 0.8V (negativa al platino respecto del electrodo de referencia). Si se escoge un voltaje polarizador cerca del óptimo (-0.7V), entonces la producción de corriente del electrodo de oxígeno será linealmente proporcional a la tensión del oxígeno en la solución.

La producción de corriente generada por un electrodo de oxígeno está gobernada por la cantidad de oxígeno que llegue al cátodo de platino y por el área catódica. En consecuencia, para una tensión de oxígeno y una membrana dada, un disco grande de platino dará una producción grande de corriente, pero consumirá oxígeno de la solución en cantidades medibles.

Se pesaron 200 mg. de tejido cortado en porciones de aproximadamente 1 mm³, se colocaron en la cámara de muestra del oxígrafo con 1.6 ml. de buffer Heppes pH 7. Para cuantificar la actividad respiratoria, la cámara se cubrió con una tela oscura y el tejido se agitó a 500-600 rpm/min. La actividad fotosintética se observó haciendo incidir sobre la cámara un haz luminoso de 43,000 luxes proporcionados por una lámpara de fibra óptica Cole Parmer modelo 9741-50 y agregando 40 μ l. de solución de bicarbonato (10 mg/ml.). El oxígrafo está conectado a un graficador X-Y cuya velocidad es de 0.01 mm/seg. (0.01 rpm/min.). El cálculo de respiración y fotosíntesis se efectúa a través de las pendientes obtenidas en las gráficas -

(ver foto 2), expresándose como μ Moles de O_2 desprendido o consumido por miligramo de tejido.

Contenido de clorofilas.

La extracción de clorofila se realizó de acuerdo al método de Arnon (1949) y el contenido de clorofila en el tejido se calculó por medio de la siguiente fórmula:

$$\text{Clorofila a} = (11.63 \times \text{abs } 663\text{nm}) - (2.39 \times \text{abs } 645\text{nm}) \\ \times \text{ ml de solvente } \times \text{ gramo de tejido} = \mu\text{g de clorofila por gramo de tejido.}$$

$$\text{Clorofila b} = (20.11 \times \text{abs } 645 \text{ abs}) - (5.18 \times \text{abs } \text{---} \\ 663 \text{ nm}) \times \text{ ml. de solvente } \times \text{ gramo de tejido} \\ = \mu\text{g de clorofila por gramo de tejido.}$$

Se colocaron cantidades iguales de tejido vitrificado y normal en una solución de acetona 80% (v/v), se maceró el tejido en mortero a 4 grados centígrados y se centrifugó a 4000-rpm. X 10 min. recuperando el sobrenadante, el pellet fue resuspendido en otro volumen de acetona y centrifugado, realizándose este paso tres veces. Se leyó su absorbancia a 645 y 663 nm. en un espectrofotómetro DU 6 Beckman.

Análisis estadístico de los datos obtenidos.

Los datos reportados son promedio de dos experimentos -

independientes, realizados por triplicado. Se analizaron como modelo bifactorial y se realizaron análisis de varianza (prueba de F). Las diferencias entre semanas se evaluaron mediante la prueba de Duncan realizado con un nivel de significancia -- del 5%. (ver tabla 2).



FOTO 2. Comparación entre el consumo y la evolución - de oxígeno, efectuado por plántulas de Agave tequilana vitrificadas y normales, evaluado- como la pendiente de orden negativo o posi-ti vo obtenidas en las gráficas.

IV. RESULTADOS.

Los resultados del análisis de varianza de los parámetros medidos se resumen en la tabla 2:

Tabla 2. Resultados del análisis estadístico.

PARAM.	F	TRATAMI. PROB (F)	F	SEMANAS PROB(F)	F	INTERACC. PROB (F)
CONDUCT. DE MEDIOS	123.6	0.0000XX	1113.32	0.0000XX	18.93	0.0000XX
POTENC. Ψ DE MEDIOS	129.4	0.0000XX	21.74	0.0000XX	15.00	0.0000XX
RETENCIONES DE IONES EN LOS MEDIOS DE CULTIVO	64.73	0.0000XX	215.94	0.0000XX	2.55	0.0000XX
POTENCIAL Ψ DE EXPLAN- TES.	3.61	0.06526 δ	22.56	0.0000XX	4.59	0.0024X
POTENCIAL π DE EXPLANTES	0.971	0.341 δ	19.6	0.0000XX	2.344	0.0610 δ
FOTOSINTESIS EXPLANTES	21.74	0.0016XX	10.91	0.0034X	1.36	0.3225 δ
RESPIRACION DE EXPLANTES	0.376	0.557 δ	8.86	0.0010XX	1.48	0.265 δ
TURGENCIA DE EXPLANTES	0.005	0.944 δ	3.89	0.0063 δ	8.85	0.0000XX
CONTENIDO RELATIVO DE H ₂ O EXPLANTES	0.999	0.338 δ	1.00	0.438 δ	1.00	0.4389 δ

PARAM.	F	TRATAMI. PROB (F)	F	SEMANAS PROB (F)	F	INTERACC. PROB (F)
POTENC. Ψ DE BROTES	3.25	0.088&	0.293	0.748&	0.444	0.647&
POTENC. \Uparrow DE BROTES	2.48	0.132&	8.55	0.024X	1.551	0.239&
FOTOSINTE- SIS DE BRO TES.	6.635	0.042X	1.376	0.322&	0.744	0.514&
RESPIRACION DE BROTES	0.5681	0.487&	2.659	0.148&	0.850	0.473&

XI Altamente significativo.

X Significativo.

& No significativo.

Al. Caracterización de los medios.

Potencial hídrico.

Como se observa en la tabla 3, el medio vitrificante (V) presentó un potencial hídrico de aproximadamente la mitad del potencial encontrado en el medio normal (no vitrificante; NV). El principal componente de estas diferencias en potenciales lo constituye el potencial matriz, ya que no se encontraron diferencias en el potencial osmótico de ambos medios.

Características mecánicas.

El medio vitrificante tiene una menor viscosidad y una menor elasticidad que el medio no vitrificante (tabla 3). Por lo que el medio vitrificante tiene menor consistencia y puede romperse con mayor facilidad. Los datos de viscosidad y elasticidad fueron obtenidos por el M. en C. Manuel Aguilar y el Ing. Ivan Chi, del departamento de Polímeros de este Centro de Investigación.

TABLE 3. Comparación entre las propiedades hídricas y mecánicas de los medios de cultivo.

	MEDIO VITRIFICANTE	MEDIO NO VITRIFICANTE
POTENCIAL HIDRICO	-0.498 Mpa	-0.913 Mpa
POTENCIAL OSMOTICO	-0.328 Mpa	-0.323 Mpa
POTENCIAL DE MATRIZ	-0.170 Mpa	-0.590 Mpa
VISCOSIDAD	1×10^{-4}	3×10^{-4}
ELASTICIDAD	1.43×10^{-5}	2.5×10^{-5}

Capacidad de retención de agua y iones.

Los medios vitrificantes tienen una menor capacidad de retención de agua que los medios normales como lo indican las cinéticas de deshidratación de ambas condiciones (fig. 1a.).

De igual forma, durante los primeros ochenta minutos de una cinética de difusión de iones de los medios a través de una membrana de diálisis, los medios vitrificantes presentaron una menor capacidad de retención de iones que la de los medios normales. Sin embargo, después éstas diferencias tienden a desaparecer (fig. 1b.).

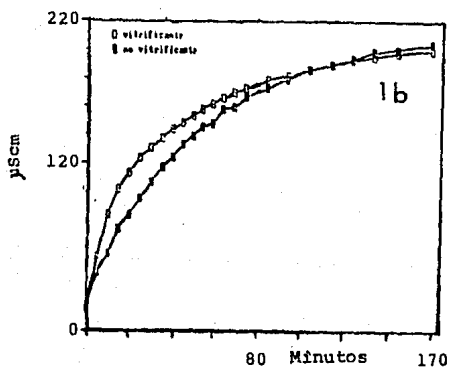
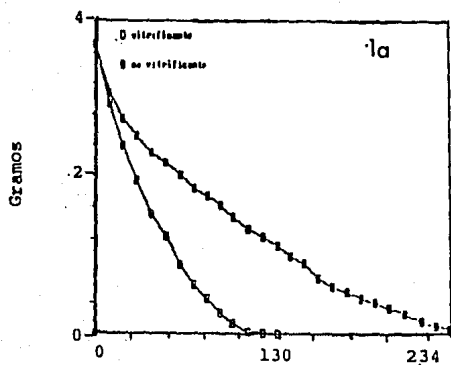


FIG. 1. Cinética de deshidratación (1a) y de liberación de los iones (1b), medida como cambios en conductividad de los medios de cultivo vitrificante y no vitrificante.

El. Alteraciones en las propiedades de los medios durante el cultivo de explantes.

Potencial hídrico de los medios durante el cultivo.

Después de colocados los explantes en los medios, los potenciales hídricos iniciales se modificaron conforme transcurrió el tiempo de cultivo. Pasando de -0.498 Mpa y -0.913 Mpa para el vitrificante y normal respectivamente a tiempo 0, a valores de -0.313 y -0.591 Mpa después de 12 semanas de cultivo. El potencial hídrico del medio vitrificante fue menor que el del medio no vitrificantes durante la mayoría del ciclo de cultivo con excepción de las semanas 3 y 5 (Fig. 2a.).

Cambios en la Conductividad de los medios durante el cultivo.

Conforme transcurrieron las semanas de cultivo, la conductividad de los medios tendió a disminuir de $3667 \mu\text{Scm}^{-1}$ en la semana 0 a valores de $628 \mu\text{Scm}^{-1}$ después de 12 semanas. La conductividad de los medios de la condición vitrificante tendió a caer más rápidamente que la de la condición normal (fig. 2b.).

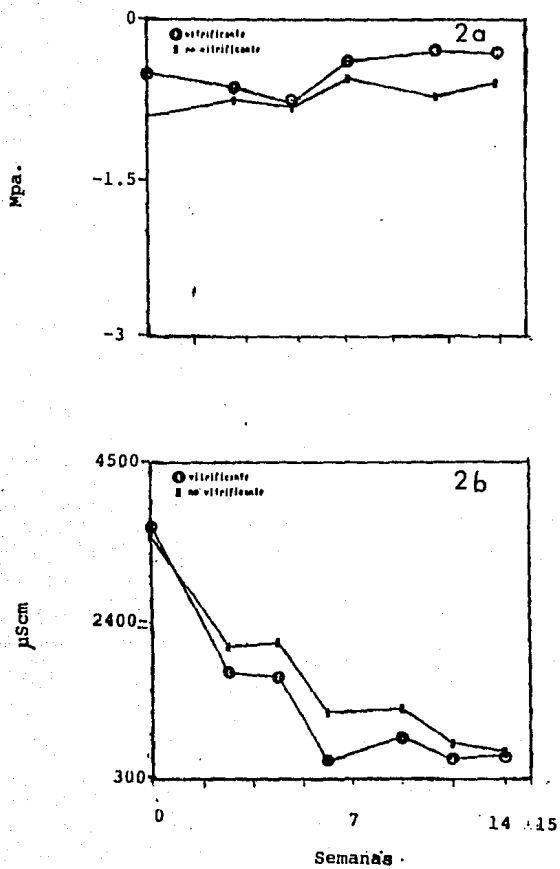


FIG. 2. Cambios en el potencial hídrico (2a) y conductividad (2b) de medios de cultivo vitrificantes y normales a lo largo de 12 semanas de cultivo.

Número de brotes y grado de vitrificación.

La figura 3, muestra el número de brotes/explante producidos en la condición no vitrificante con respecto a los producidos en la condición normal. El número de brotes/explante es mayor en la condición normal de la 7a. semana a la 12ava, semana. Sin embargo, en las últimas dos semanas el número de brotes/explante de la condición vitrificante se incrementa superando el número alcanzado en la condición normal.

El 100% de los brotes producidos en la condición vitrificante resultaron vitrificados mientras que sólo un 21.7% de los brotes producidos bajo la condición normal resultaron vitrificados (tabla 4). En la siguiente tabla se anotan las características encontradas en la 14ava. semana de cultivo en condiciones vitrificantes y normales.

Tabla 4. Número de brotes por explante, % de vitrificación y potencial hídrico inicial de condiciones vitrificantes y normales en la semana 14 de cultivo.

CONDICION Medios	POT. HIDRICO sem. 0	Brotes/expl.	% Vitrific.
Gel-rite 0.15% ("Vitrificante")	- 0.498Mpa	101	100%
Agar 1.0% ("Normal")	- 0.913Mpa	74	21.7%

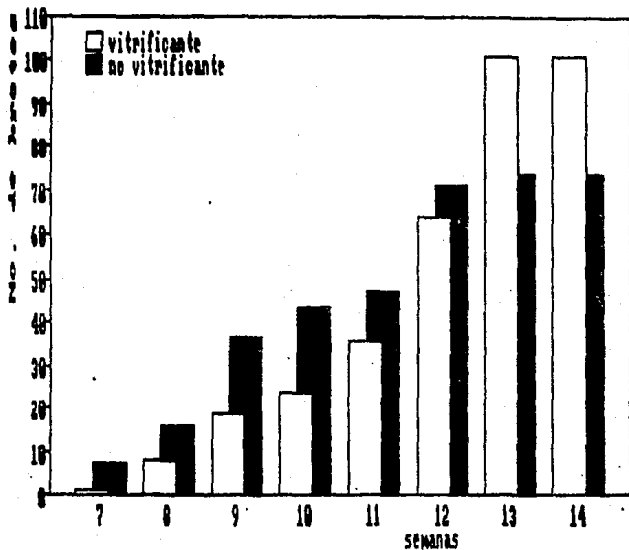


FIG. 3. Número de brotes producidos en la condición vitrificante y normal de la 7ma. a la 14ava. semana.

Comportamiento de explantes.

Relaciones hídricas.

Potencial Hídrico.

El potencial hídrico de los explantes cultivados en condiciones normales tiende, en general, a mantenerse a lo largo de 12 semanas de cultivo a excepción de un ligero descenso detectado en la semana 5. En contraste, el potencial hídrico de los explantes cultivados en condiciones vitrificantes desciende en forma mas marcada durante las primeras semanas del cultivo (3era., 5ta., 7ma.) para después elevarse hasta valores más altos que los detectados al colocar los explantes en el medio. Presentando de esta forma valores mas altos que los de la condición normal en las dos últimas semanas de cultivo (fig. 4a.).

Potencial osmótico.

Los potenciales osmóticos de los explantes cultivados en ambas condiciones muestran un comportamiento similar durante las primeras 10 semanas de cultivo. En ambos casos el potencial osmótico de los explantes desciende marcadamente en la 5a. semana para después alcanzar valores cercanos a los iniciales (semana 0) hacia la semana 10. Sin embargo, los potenciales osmóticos de los explantes cultivados en condiciones vitrificantes tienden a elevarse por encima de los valores iniciales en -

la semana 12 llegando a ser significativamente menores que los de la condición normal (fig. 4b.).

Potencial de turgencia.

Los explantes cultivados bajo condiciones vitrificantes presentaron menor turgencia que los explantes cultivados bajo condiciones normales durante las primeras 8 semanas de cultivo. Sin embargo, en la 10a. y 12ava. semanas, mientras que la turgencia de los explantes de la condición vitrificantes se eleva, la de los explantes cultivados en condiciones normales decrece marcadamente (fig. 4c).

Ajuste osmótico.

La capacidad de ajuste osmótico mostrado por explantes-crecidos en condición vitrificante y normal fue muy similar, presentándose un pico hacia la semana 5 para después descender en las semanas 10a. y 12ava. en los explantes de ambos tratamientos (Fig. 5a).

Contenido relativo de agua de los explantes.

El contenido relativo de agua en los explantes muestra una tendencia muy parecida en ambas condiciones durante las 12 semanas de cultivo. Sin embargo, el contenido relativo de agua de los explantes cultivados en condiciones no vitrificantes tienen un comportamiento más consistente (Fig. 5b).

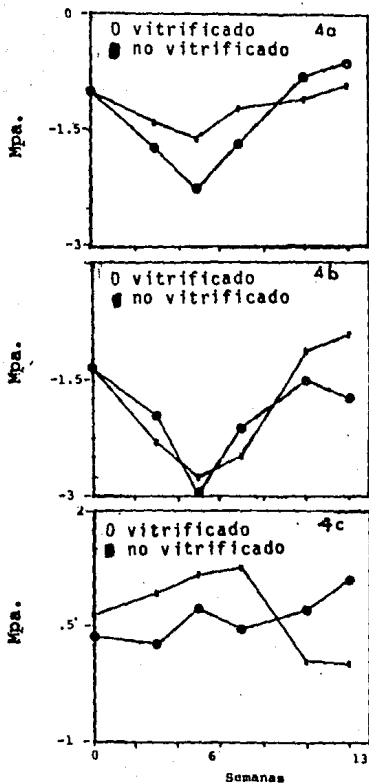


FIG. 4. Potencial hídrico (4a), osmótico (4b) y de turgencia (4c) de explantes cultivados en condición vitrificante y normal durante 12 semanas de cultivo.

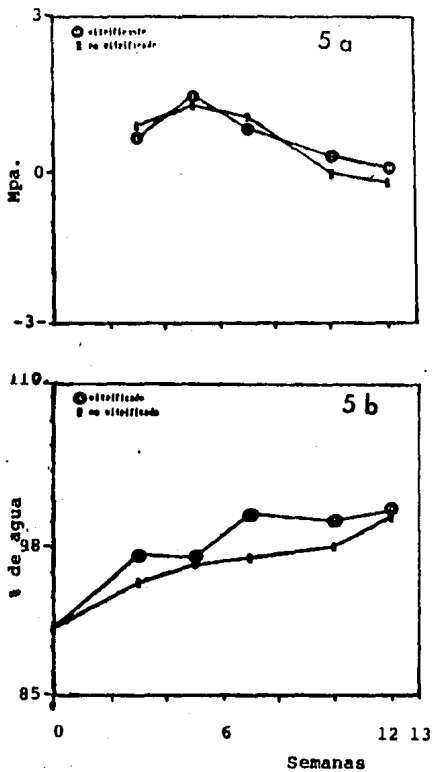


FIG. 5. Ajuste osmótico (5a) y contenido relativo de agua (5b) en explantes cultivados en condición vitrificante y normal a lo largo de 12 semanas de cultivo.

Cambios metabólicos.

Los explantes cultivados en condiciones vitrificantes presentaron una menor capacidad fotosintética que los cultivados bajo condiciones normales durante las primeras 10 semanas de cultivo. No obstante, en la semana 12 se registró un incremento en la capacidad fotosintética de los explantes cultivados bajo condiciones vitrificantes alcanzando valores similares a los de los explantes cultivados en condiciones normales (Fig. 6a.).

En cuanto a la capacidad respiratoria, los explantes cultivados en ambas condiciones mantienen una tendencia similar mostrando un incremento en las semanas 3a. y 5a., para posteriormente descender (Fig. 6b).

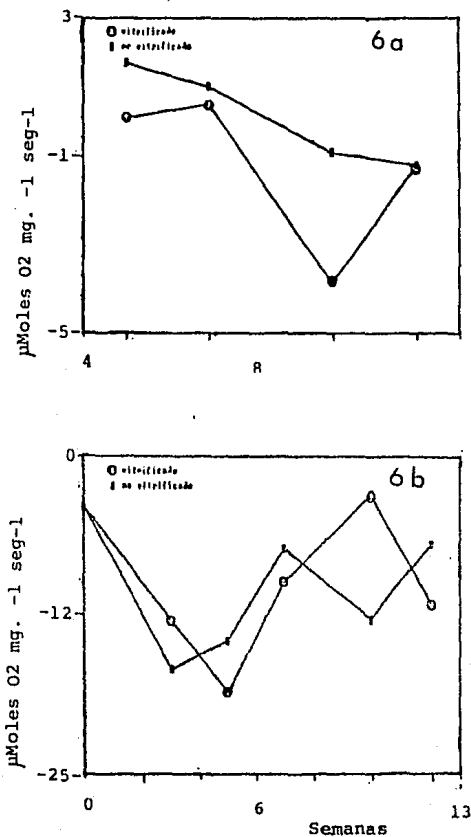


FIG. 6: Tasas Fotosintéticas (6a) y respiratorias (6b) de explantes cultivados en medio vitrificante y normal a lo largo de 12 semanas de cultivo.

Comportamiento de brotes.

Se observó organogénesis cinco semanas después de colocados los explantes en los medios de cultivo. Sin embargo, - los brotes alcanzaron un tamaño adecuado para realizar determinaciones hasta la semana 10, por lo que a continuación se reportan una serie de parámetros determinados en brotes a partir de ese estadio de desarrollo.

Potencial hídrico.

Los potenciales hídricos de brotes producidos bajo condiciones vitrificantes son similares a aquellos de brotes obtenidos bajo condiciones normales, manteniéndose sin alteraciones durante las cuatro semanas de observación (fig. 7a). - Cabe hacer notar que los potenciales hídricos encontrados en los brotes son similares a aquellos detectados en los explantes originales a la semana 10a. y 12ava., aunque son considerablemente menores a los registrados en dichos explantes a la 5a. semana.

Potencial osmótico.

Los potenciales osmóticos medidos en brotes vitificados y normales fueron similares a lo largo del período de observación (fig. 7b). Los valores de potencial osmótico encontrados en brotes son equivalentes a los registrados en los explantes originales en la semana 12.

El potencial de turgencia de brotes vitrificados y normales fue similar de la 10a. a la 14ava. semanas (fig. 7c). -- Los valores de turgencia obtenidos para los brotes son marcadamente inferiores a los registrados en los explantes originales.

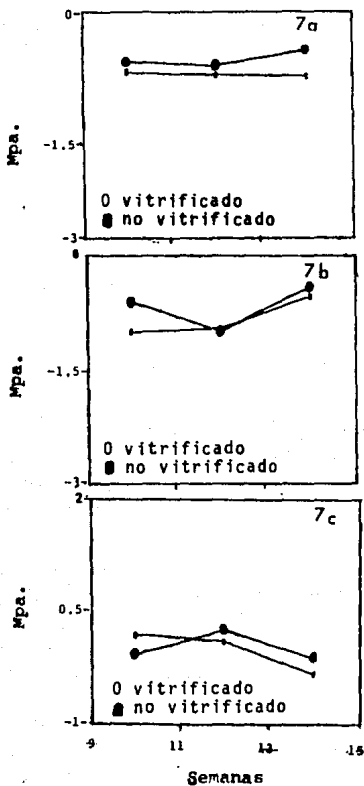


FIG. 7. Potencial hídrico (7a), osmótico (7b) y de turgencia (7c) de brotes obtenidos y crecidos en condiciones vitrificante y normal durante las semanas 10, 12 y 14.

Cambios metabólicos.

La capacidad fotosintética de los brotes producidos bajo condiciones vitrificantes fue ligera, pero significativamente menor a la de los brotes cultivados en condiciones normales en las semanas 10a. y 12ava., aunque en la semana 14ava. parecen igualarse (Fig. 8a). La capacidad fotosintética de los brotes producidos bajo ambas condiciones se mantienen durante el período de observación y los valores son superiores a los registrados en los explantes originales.

La respiración de los brotes vitrificados y normales muestra una tendencia similar, aunque los brotes vitrificados tienen menor capacidad respiratoria que los brotes normales en la semana 10a. (fig. 8b).

La cantidad de clorofila detectada en los explantes de la condición vitrificante es aproximadamente la mitad de la detectada en los explantes de condición normal en la 4a. y 5a. semana. Sin embargo, en las semanas 6a. y 7a. las cantidades obtenidas en los explantes de ambas condiciones son muy similares.

El contenido de clorofila encontrado en los brotes normales en general, es el doble del detectado en los brotes vitrificados, excepto en la 12ava. semana, donde el contenido de clorofila en los brotes de ambos tratamientos parecen ser los

mismos. La relación de clorofila A/B, en promedio se mantiene tanto en explantes como en brotes sin mostrar diferencias entre ambos tratamientos.

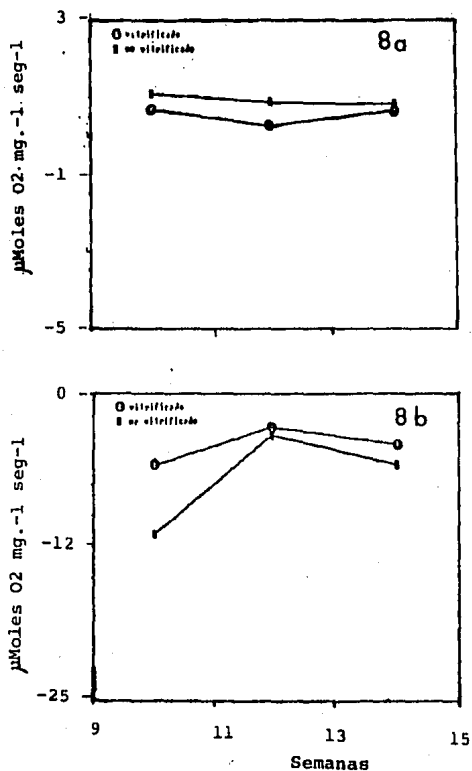


FIG. 8. Capacidad fotosintética (8a) y respiratoria (8b) de brotes obtenidos y crecidos en condición vitrificante y normal durante las semanas 10, 12- y 14.

TABLA 5. Contenido de clorofilas totales y relación de clorofila A/B en explantes y brotes en condiciones vitrificantes y normales.

VITRIFICANTE			NO VITRIFICANTE		
E X P L A N T E S					
SEMANA	TOTAL	A/B	SEMANA	TOTAL	A/B
4	93.7	3.05	4	156.19	4.3
5	60.99	3.55	5	121.77	3.8
6	201.76	4.06	6	180.71	3.02
7	175.5	4.28	7	197.7	2.0

$\bar{X} =$	132.98	3.73	$\bar{X} =$	164.09	3.3
$G_{n-1} =$	66.49	0.55	$G_{n-1} =$	32.96	0.99

B R O T E S					
10	135.52	2.34	10	300	2.9
12	129.67	3.35	12	162.69	3.3
13	100.00	2.97	13	217.13	2.7

$\bar{X} =$	121.73	2.88	$\bar{X} =$	226.60	2.96
$G_{n-1} =$	19.0	0.51	$G_{n-1} =$	69.14	0.30

V. DISCUSION Y CONCLUSIONES.

El medio vitrificante tiene menor viscosidad y menor elasticidad que el medio no vitrificante. Estas diferencias -- pueden ser muy importantes desde el punto de vista de la rigidez de dichos medios para soportar los explantes cultivados en ellos. De hecho, los explantes crecidos en condiciones vitrificantes se observaron sumergidos en su parte basal.

El potencial hídrico del medio vitrificante corresponde a la mitad del detectado en los medios normales. El componente de matriz es el que está contribuyendo principalmente a estas -- diferencias, ya que no se encontraron diferencias en sus potenciales osmóticos. Esto confirma la relación entre vitrificación y potencial de matriz reportada anteriormente (Debergh et al., 1981; Hakkart y Versluijs 1983; Ziv et al., 1983, etc.).

Las cinéticas de rehidratación y de liberación de iones del medio sugieren que los medios vitrificantes poseen menor capacidad de retención de agua y iones que los medios no vitrificantes, por lo que en principio, los explantes crecidos en esta condición tienen mayor disponibilidad de agua y nutrientes.

Sin embargo, al analizar las relaciones hídricas de los tejidos, encontramos que los explantes crecidos bajo condiciones vitrificantes no reflejan un estatus hídrico superior al de los explantes crecidos bajo condiciones normales. Por el con--

trario, parecen estar bajo un estrés de déficit hídrico. Esta aparente contradicción pudiera tener al menos dos explicaciones:

1). Aunque haya existido una toma mayor de agua y iones en el medio vitrificante, una pared poco lignificada resultaría en una carencia de presión hidrostática que se vería reflejada en una turgencia mas baja; el incremento en el volumen celular resultante de la carencia de resistencia de la pared, diluiría cualquier aumento en el potencial osmótico generado en tejidos cultivados bajo condiciones vitrificantes respecto a los normales.

2). Considerando que los tejidos vitrificados se encuentran en condiciones similares a las que sufre un tejido bajo inundación, los explantes cultivados en condiciones vitrificantes pudieron haber sufrido un cierto grado de anaerobiosis al estar sumergidos en el medio que opone menos resistencia, produciéndose una zona de bloqueo en la toma de agua en la base de los explantes. Esto es consistente con nuestros datos de relaciones hídricas que indican que los explantes vitrificados presentan menor estatus hídrico. Este déficit hídrico en etapas críticas previas a organogénesis pueden ser la causa de desordenes bioquímicos y fisiológicos que conducen a vitricación en los brotes resultantes.

Sin embargo, esto no explica completamente el porqué -- las relaciones hídricas de los explantes se vuelven a incrementar pasada la organogénesis. Existe la posibilidad de que las células de las paredes laterales que se encuentran sobre el -- nuevo nivel de medio puedan reabsorber agua.

Otro aspecto a explicar son las diferencias detectadas-- en la velocidad de pérdida de conductividad de los medios vitrificantes, implicando que explantes cultivados en ese medio-- estuvieran tomando mas iones. Sin embargo esto no se vé reflejado en los valores de potencial osmótico encontrados en los -- explantes.

Los diferentes parámetros medidos evidencian que se presentan dos etapas marcadas durante el cultivo de explantes: lo que sucede antes de organogénesis y lo que ocurre después de ella. Dado que la vitrificación parece estar asociada a procesos de diferenciación, presentándose sólo en tejidos en formación, es importante remarcar las diferencias en turgencia ocurridas en explantes durante esa etapa. Ya que la turgencia de explantes durante organogénesis puede ser importante en la inducción de vitrificación en los brotes resultantes, esto requiere de nuevos estudios que permitan profundizar más sobre los procesos ocurridos en esta etapa.

Los datos metabólicos, tanto de respiración como de fo-

tosíntesis y el contenido de clorofila indican que los explantes crecidos bajo condiciones vitrificantes están alterados, lo que pudiera estar relacionado con la menor turgencia encontrada en ellos. El descenso en los niveles de clorofila es consistente con lo reportado previamente en la literatura (Phan y Letouze 1983; Ziv et al., 1983; Revers et al., 1984), así como también el hecho de que las relaciones A/B no se alterarán.

En lo que se refiere a brotes, las relaciones hídricas parecen mas estables en ambas condiciones, pudiendo reflejar -- que los tejidos nuevos presentan un ajuste a dichas condiciones. Sin embargo, mucho se ha especulado de la dificultad para determinar las relaciones hídricas de tejidos en crecimiento activo (E. Murillo, W. J. Davies, comunicación personal 1988); esto pudiera implicar que los datos de relaciones hídricas de brotes presentados en este trabajo, no sean un reflejo real del estatus hídrico existente en los mismos.

C O N C L U S I O N E S .

La presente tesis aporta datos básicos sobre el comportamiento de las relaciones hídricas y algunos cambios metabólicos en tejidos de Agave tequilana bajo condiciones vitrificantes que son la base para estudios subsecuentes. Las observaciones más recientes se resumen a continuación.

1). El potencial hídrico es mayor en el medio vitrificante con respecto del medio normal y el componente de matriz es el que contribuye principalmente a estas diferencias.

2). Las características mecánicas de los medios vitrificantes y no vitrificantes son diferentes y esto pudiera ser importante en el proceso de vitrificación desde el punto de vista de su rigidez.

Asociado a estas características mecánicas, la retención de agua medida como potencial hídrico de los medios y la retención de iones es menor en el medio de cultivo vitrificante respecto del normal a lo largo del tiempo de cultivo previo al surgimiento de brotes y posterior al surgimiento de los mismos, lo que podría implicar mayor disponibilidad de agua y iones para los tejidos, aunque nuestros datos de potencial hídrico y osmótico medidos en tejidos sugieren lo contrario.

3). Las respuestas metabólicas de los explantes de la condición vitrificante se encuentran ciertamente alteradas. -- Destacándose una disminución en el contenido de clorofilas totales y tasas fotosintéticas.

Estas alteraciones no parecen estar asociadas a un exceso de agua y nutrientes como hipotetizamos. Por el contrario, parecen asociarse a condiciones de déficit hídrico aparentemente causado por el bloqueo de la toma de agua en la zona del explante que está sumergida o en contacto con el medio. Se requiere de datos más detallados en esa zona en particular para corroborar esta posibilidad.

4). Durante la organogénesis, las relaciones hídricas y las respuestas metabólicas son marcadamente diferentes. La baja turgencia encontrada en explantes durante organogénesis debe ser importante en la inducción de vitrificación durante la formación de los brotes resultantes.

Cabe señalar que la discusión anterior es válida -- asumiendo que la única diferencia existente entre los agentes gelificantes utilizados en nuestro sistema experimental sea solo la capacidad de retención de agua y iones. Sin embargo, no podemos descartar diferencias en otras características de los agentes gelificantes como son: contaminantes, diferencias en --

las cinéticas de hidratación dentro de un rango de concentraciones en los gelificantes, etcétera.

Cabe agregar que es necesario estudiar con más detalle - el papel del potencial de matriz en el proceso de vitrificación, para lo que se requiere realizar experimentos donde se elimine tal componente del sistema experimental, por ejemplo involucrando el colocar tejidos en medio líquido y después trasladarlos a medios con potenciales de matriz, bajos para evaluar su papel - en la inducción del fenómeno, Monitoreando la formación de ligninas a diferentes etapas después de organogénesis.

También se debe estudiar la relación existente entre citocininas y el potencial de matriz ya que ambos factores parecen estar fuertemente relacionados con el proceso de la vitrificación según lo referido en la literatura, existe la posibilidad de que medios de potencial de matriz elevado implique un mayor flujo de citocininas a los explantes y que esto sea lo -- que cause la vitrificación.

VI. BIBLIOGRAFIA.

- AGUILAR M. (1988). Perfiles de las poliaminas durante el desarrollo in vitro en explantes de Agave tequilana (Weber) y en plántulas de Agave fourcroydes --- (Lem.) cultivadas en condiciones vitrificantes y no vitrificantes. Tesis Licenciatura. Escuela de Química. Mérida, Yucatán., pp. 73.
- ALMARAZ A. (1984). Estudio etnobotánico de los agaves del alti plano Potosino. Tesis. Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala, U.N.A.M.
- ALMICAR F. (1983). Iniciación, mantenimiento y diferenciación de células en cultivo de tallos de henequén (Agave fourcroydes (Lem.) Tesis Ingeniero Agrónomo. Especialidad en Fitotécnica. Inst. Tecnológico Agropecuario # 2, Contal, Yucatán.
- ARNOLD V. and Erikson T. (1984). Effect of agar concentration on growth and anatomy of adventitious shoots of Picea abies L. (Karst). Plant Cell Tissue and Organ Culture 3 pp. 257-264.
- ARNON D. (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in Beta vulgaris. Plant Physiol. 24: pp. 1-15.

- BECHAUSNE G. (1981). Le milieux minéraux utilisés en culture in vitro et leur incidence sur l'apparition de botures d'aspect pathologique. c.r. Academic Agric. Paris 67; pp. 1389-1397.
- BRAVO S. (1978). Aprovechamiento integral del maguey. Ponencia presentada en la reunión de evaluación del estado de Hidalgo.
- BRESSAN R. and P. M. Hasegawa (1982). Growth and water relations parameters of cultured tomato cells after adjustment to low external water potentials. Plant. -- Physiol. 70 pp. 1303-1309.
- BOLIO J. (1914). Manual práctico del henequén. Imprenta de la empresa editorial católica, Mérida Yucatán.
- BOORMAN C. and Volgemann T. (1984). Effect of rigidity of gel medium on benzyladenine induced adventitious bud formation and vitrification in vitro in Picea ---- abies. Physiologia Plantarum 61 pp. 505-512.
- BOTTCHER I. Zoglauer K. and Goring H. (1988). Induction and reversion of vitrification of plants cultured in vitro Physiologia Plantarum 72 pp. 560-564.
- BROWN D. and Thorpe T. (1978). Mitochondrial activity during -- shoot formation and growth in tobacco callus. Plant-Physiol. 54 pp. 125-130.

- CRUZ C. del Castillo L.; Robert M.L. et al., (1985). Biología y aprovechamiento integral del henequén y otros agaves. - Centro de Investigación Científica de Yucatán pp. 55-59.
- DAGUIN F. and Letouze R. (1986). Ammonium induced vitrification in cultured tissues. *Physiol. Plant.* 66 pp. 94-98.
- DEBERGH P. Harbaoui and Lemeur R. (1981). Mass propagation of - Globe antichoque (Cynara scolymus): evaluation of different hypotheses to overcome vitrification with special-reference to water potential. *Physiol Plant* 53: pp. -- 181-187.
- DEBERGH P.C. (1983). Effects of agar brand and concentration on the tissue culture medium. *Physiol. Plant* 59: pp. 270-- 276.
- DRUART P., Boxus p., Liard O. and Delaite B. (1981). La micro--propagation du merisier a partir de la culture de méris tome in vitro. *Essences Forestieres, Iufro, Fontaine--blèau, France*, pp. 101-108.
- ESPADAS F. (1986). Factores que influyen en el desarrollo de ca llos in vitro de tallos de Agave híbrido 11648. Tesis - Instituto Tecnológico Agropecuario #2, Conkal, Yuc,
- GENTRY S.H. (1982). Agaves of continental North América. *Univer sity of Arizona, Press Arizona* pp. 3-24, 582-585.

- HANDA S. R. A. Bressan, A. K., Handa N. C. Carpita et al., ---
 (1983). solutes contributing to osmotic adjustment in
 cultured plant cells adapted to water stress. Plant -
 Physiol. 73, pp. 834-843.
- HEGEDUS P. and Phan C. (1983). Actions of phenols sur les mal-
 formations observées chez les porte-greffes de pomiers
 M-26 et 0-3 cultivés in vitro. Rev. Can. Biol. Exp. -
 42 pp. 33-38.
- HOFFMAN K. and Pax F. (1930). Amaryllidaceae. In planzenreich-
 15a. Engler, A. (ed). Leipzig pp. 341-430.
- HOOKER J. and Bentham G. (1930). 1862-1863 Genera Plantarum --
 1-3 Londres.
- HOWARD R. A. (1979). Agavaceae In: flora of the lesser antilles-
 vol. III. Monocotyledoneae. Ann. Arb. Harvard Univer-
 sity of Arizona Press. Tucson 167 pp.
- HUGHES K. W. (1981). Ornamental species in: cloning agricultu-
 ral plants via in vitro techniques B.V. conger (ed). -
 CRC/Press Inc. Boca Raton. Florida. pp. 5-50.
- HUTCHINSON J. (1964). The families of flowering plants. Vol. -
 II. Monocotyledons. Oxford. University press. 662 pp.

- JARVIS H. Logan S. and Duncan (1984). Tensile characteristics - of collenchima cells walls at different calcium con-- ten. *Physiol. Plant.* 61: pp. 81-86.
- KEVERS C. Coumans M. and Gaspar Th. (1984). Physiological and -- biochemical events leading to vitrifications of plants cultured in vitro. *Physiologia Plantarum* 61 pp. 69-74.
- KEVERS C. and Gaspar Th. (1987). Vitrification of carnation in vitro changes in cell wall mechanical properties; cellulose and lignin content. *Plant Growth Regulation* 5 pp. 59-66.
- KERVES C. and Gaspar Th. (1985). Soluble membrane and wall pero xidades, phenilelanine ammonia-liase, and lignin chan ges in relation to vitrification of carnation tissues cultured in vitro. *J. Plant Physiol.* 118 pp. 41-48.
- KEVERS C. and Gaspar Th. (1985). Vitrification of carnation in vitro. Changes in sthylene production. AAC level end capacity to convert AAC to ethylene. *Plant Cell Ti--- ssue Organ Culture* 4 pp. 215-223.
- KUMAR D. and Singh N. (1979). *Plant metabolism*. 1a. ed. British Library pp . 52-85.
- LAWRENCE F. (1951). *Mono and dicotyledons plants, taxonomy and- clasification*. Vol. I. Engler (Ed) Leipzig pp. 1228.

- LINA O. Beatriz L. R. Orellana (1984). Palinología de la familia Agavaceae para la Península de Yucatán. *Biótica* vol. 9. Núm. 4. Pág. 379-383
- LESHEM B. Werker E. and Shalev (1988]. The effect of cytokinins on vitrification in melon and carnation. *Annals of Botany*. 62 pp. 271-276.
- LESHEM B. and Sachs T. (1985). Vitrified Dianthus terrestris in vitro due to growth factor imbalance. *Annals Of Botany* 59 pp. 377-385.
- LETOUZE R. and Daguin F. (1983). manifestation spontanée et aleatoire d'une croissance anormale en culture in vitro. - Recherche de marqueurs métaboliques. *Rev. Can. Biol.* -- expl. 42 pp. 23-28.
- LEZAMA M. (1952). Historia, producción, industrialización y algunas plagas de los agaves. Escuelas nacional de Agricultura México. Tesis. Parasitología Agrícola.
- LOPEZ P. (1976). Estudio sobre el desarrollo de citocultivos de - Phaseolus vulgaris y Lycopersicon esculentum en medios - suplementados con agua, miel y agua de coco. Tesis de -- Maestría. Genética E.N.A. Colegio de Posgraduados. Chapingo México.

- LOPEZ P. (1984). Tolerance of tomato genotypes to osmotic stress in vitro Ph. D. Thesis. Purdue University W. Lafayette.
- LUNDELL C. (1937). The vegetation of Peten, Carnegie Institution of Washington U.S.A. Appendix 1: Studies of Mexican and Central America Plants. pp. 208-221.
- MADRIGAL L. et. al. (1985). Micropropagación de agaves en: Fundamentos teórico prácticos de cultivo de tejidos vegetales. Ed. Villalobos. V. M. FAO/Colegio de Posgraduados de Chapingo, México. pp. 175-178.
- MALDONADO I. (1988). Cuantificación de la actividad de la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa durante la micropropagación de agave tequilana Weber. Tesis. Escuela de Química, Mérida, Yucatán, 93 pp.
- MARTIN del C. A. (1938). El pulque en el México precortesiano. - Anales del Instituto de Biología Vol. 9. U.N.A.M. México.
- MARTINEZ M. (1962). Las amarilláceas del estado de México, Gobierno del Estado de México, Toluca, Méx. 28 pp.
- MATUDA E. (1960). Las amarillidáceas y lilifáceas del Valle de México y sus alrededores. Anal. Ins. Biol. Méx. 31. (1-2). 53-83.

- MURASHIGE T. and Skoog T. (1962]. A revised medium for rapid -
growth and bioassays with tobacco tissue cultures.
Physiologia Plantarum 15 pp. 473-497.
- MILLSPAUGH C. (1898]. Contribution to the flora of Yucatan. Field
Mus. Bot. 4 (1): 3-56 pp.
- NITCH P. M. (1978). Roundtable on anther culture Haploid and -
Chromosome Doubling. Frontiers of Plant Tissues Cultu-
re. T.A. Thorpe (ed.) University of Calgary, Calgary,
Canada. pp. 482.
- OSMOND C. and Holtum J. Crassulacean acid metabolism. In the bio-
chemistry of plant. Comprehensive treatise. Vol. 8,
photosynthesis. Hatch, M.D. and Boardman, N. K. eds. --
Academic Press pp. 283-328.
- PERALTA P. Zimmerman R. and Fordham I. (1988). The influence
of cation and gelling agent concentrations on vitrifi-
cation of apple cultivars in vitro. Plant Cell Tissues
and Organ Culture 14 pp. 31-40.
- PERASA L. (1988). Cuantificación de la actividad de la enzima lac-
tato deshidrogenasa (F.C. 1.1.1.27) durante la micro-
programación de Agave tequilana Weber. Tesis. Univer-
sidad Autónoma de Yucatán. Escuela de Química.

- PHAN C.T. and Letouza R. (1983). A comparative study of chlorophyll, phenolic and protein contents, and of hydroxycinnamate CoA ligase activity of normal and vitreous plants. (Prunus avium L.) obtained in vitro. Plant Science Letters 31 pp. 323-327.
- PAX. F. Hoffman R. (1930). Amaryllidaceae. In Pflanzenreich. 15a. Engler, A. (ed.) Leisig. pp. 323-327.
- PEREZ D. (1969). Estudio del valor nutritivo de la penca del maguey agostado en ruminantes. U.N.A.M. México.
- QUORIN M. and Lepoivre P. (1977). Etude de milieux adaptés aux cultures in vitro de Prunus. Acta Hortícola 78 pp. 437-442.
- RIVERA C. (1983). Estudio citogenético y fitogeográfico de Agave tequilana y Agave karwinskii en los valles centrales de Tehuacán Puebla y centrales de Oaxaca, Tesis. U.N.A.M.
- ROBERT M. L. et al., (1987). In vitro propagation of Agave fourcroydes Lem. (Henequén). Plant Cell Tissue and Organ Culture 8 pp. 37-48.
- ROMERO de C. (1981). El Ixtle, problemática socioeconómica Simposio internacional sobre problemas y perspectivas de la biología y aprovechamiento integral del henequén y otros agaves. CICY-CONACYT.

- ROMO J. (1977). Las saponinas del maguey. Tesis licenciatura -- U.N.A.M. México. pp. 64.
- SANCHEZ M. (1979). Los agaves de México en la industria alimentaria. CRESTEM. México.
- SATO R. (1935). Analysis of the Karyotypes in Yucca-Agave and - the relate genera with special reference of the phylogenetic significance. Jap. Jour. II. pp. 272-278.
- SEABROOK J. E. A. (1980). Laboratoru culture. Plant. Tissue Culture as a Source of Biochemical. J.E. Staba (ed). CRC/Press Inc. Boca Ratón, Florida.
- SHELDON S. (1980). Etnobotany of Agave Lechuquilla and Yucca Carnerosana in Mexico's zona ixtlera. Economic Botany 34 - (4).
- SKIRVIN R. M. (1981). Fruit crops. In: cloning agricultural plants via in vitro techniques. B.V. Conger (ed.) CRC/Press Inc. Boca Ratón, Florida.
- STANDLEY P. (1920). Flora of Yucatán field. Mus. Nat. Hist. Bot. Ser. 3. 157-429.
- STANDLEY P. (1930). Trees and shrubs of México contry. U.S. Nat. Her. 23: 87-142 pp.

- SUTTER E. and Langhans R. (1982). Formation of epicuticular wax and its effect on water loss in cabbage plants regenerated from shoot-tip culture. Canadian Journal of Botany. 60: pp. 2896-2902.
- SOKAL R. and James F. (1969). Biometry the principles and --- practice of statistics in biological research (ed.) Freeman and Company New York. pp. 857.
- TAIZ L. (1984). Plant cell expansion: regulation the cell wall mechanical properties. Ann. Rev. Plant. Physiol. 35 pp. 585-657.
- TAKHTAJAN A. (1980). Outline of the classification of flowering plants (Magnoliophyta). The Botanical Review 46 (3) pp. 225-359.
- TRAUB H. P. (1953), The tribes and of Agavaceae plant. Life 9 - pp. 134-136.
- THORNE R. (1968). Synopsis of putatively phylogenetic classification of the flowering plants. Aliso 6 pp. 56-57.
- THORPE T. A. (1978). Physiological and biochemical aspects of organogenesis in vitro. Frontiers of plant Tissue Culture. University of Calgary, Calgary, pp. 49-58.

- THORPE T.A. and Meier D. (1974). Starch metabolism in shoot - forming tobacco callus. *J. Exp. Bot.* 25 pp. 288-294.
- VIEITEZ M. Ballester A. San José M. et al., (1985). Anatomical and chemical studies of vitrified shoots of cheanut-regenerated in vitro. *Physiol. Plant* 65 pp. 167-184.
- VIGNOLI L. (1936). *Cariología de género Agave*. Lav. T. Ins. Bot. Palermo. 8 pp. 1-15.
- VIETH J. Morisset C. and Lemaud M. (1983). Histologie de plantules vitreuses de Pyrus malus cv. M26 et de Pelargonium peltatum cv. Chester Frank, Issues de la culture in vitro (étude préliminaire). *Rev. Can. Biol. Exp.* 42 pp. -- 29-32.
- WALTON W. K. (1977). The evolution and localitation of mescal and tequila in Mexico. *Rev. Geog. Ins. Panam. Geogra. Hist.* 85.
- WERKER E. and Lessem B. (1987). Structural changes during vitrification of carnation plantlets. *Annals of Botany* 59 pp. - 377-385.
- WIGGINS I. (1980). *Flora of Baja California*. Stanford University. Press. pp. 1025.

WHITAKER J. N. (1934). Chromosome constitution in certain monocotyledons. J. Arnold Arbor 15 pp. 135-143.

ZIV M. Maier S. and Halevy A. (1983). The development of glaucous hardened carnation plants in vitro. Plant Cell Tissue Organ Culture 2 pp. 55-65.

ZIV M. A. and Devorah F. (1987). Malfunctioning stomata in vitreous leaves of carnation (Dianthus caryophyllus) plants propagated in vitro; implications for hardening. Plant - Science 2 pp. 127-134.