

11821
27



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

MULTIPLICACION *in vitro* de *Agave tequilana*.
WEBER.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
INGENIERO AGRICOLA
P R E S E N T A :
EUGENIO TELLES MEJIA

ASESOR DE TESIS: M.C. FRANCISCO CRUZ PIZARRO

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

2003

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1



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 esta 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.



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES**

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES-CUAUTITLAN



DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
P R E S E N T E

DEPARTAMENTO DE
EXAMENES PROFESIONALES

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicarle a usted que revisamos la TESIS:

Multiplicación in vitro de Agave tequilana Weber.

que presenta el pasante: Eugenio Tolles Mejia
con número de cuenta: 09417763-1 para obtener el título de:
Ingeniero Agrícola

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 03 de Julio de 2003

PRESIDENTE	<u>M.C. Maria Magdalena Ofelia Grajales Muñoz</u>	
VOCAL	<u>M.C. Francisco Cruz Pizarro</u>	
SECRETARIO	<u>Ing. Aurelio Valdez López</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>Dra. Gloria Herrera Vazquez</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>M.C. Roberto Guerrero Agama</u>	

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán UNAM por mi formación académica, mi casa de estudios.

A dos excelentes profesores:

Al M.C. Francisco Cruz Pizarro no solo por el apoyo y asesoría en la realización de este trabajo, también por compartir sus conocimientos en todo momento a lo largo de la carrera.

Al M.C. Juan Roberto Guerrero Agama, por su asesoría y precisas recomendaciones en el desarrollo de este trabajo, además de la excelente aportación de conocimientos.

A los profesores: Dra. Gloria Herrera, Aurelio Valdez y a la M.C. Ofelia Grajalés por las observaciones y aportaciones realizadas para este trabajo.

A todos los profesores de la facultad que han contribuido en mi formación académica.

A todos mis compañeros de la generación 23 sin excepción, por todos aquellos momentos a lo largo de 5 años de nuestras vidas, por la dicha de haber compartido las aulas con ellos y por brindarme su amistad.

A mis amigos Rocío, Mario, al equipo Xolispa: Marco, Juan, Sergio, Alejandro, Daniel, Erick, por esa gran amistad que se dio.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DEDICADA ESPECIALMENTE ...

A mis padres: Lore y Leo †, que tanto les debo, gracias por su amor y apoyo incondicional en todas mis decisiones; a ti papá, donde quiera que estés Dios te bendiga. Los amo

A mis hermanos: Rigo, Deysi y Toño, que en todo momento han sido comprensivos, por su cariño y apoyo, gracias.

A ti amor, que has sido parte fundamental en este logro; a mi compañera y amiga, a la mujer de mi vida, a ti Lley con todo mi amor.

TESIS CON
TALLA DE ORIGEN

INDICE

Índice de cuadros		i
Índice de figuras		ii
Resumen.....		iii
		Pág.
I. Introducción		1
II. Objetivos e hipótesis		3
2.1. Objetivo general		3
2.2. Objetivos particulares		3
2.3. Hipótesis		4
III. Revisión de literatura		5
3.1 Morfogénesis <i>in vitro</i>		5
3.2 Propagación de Agaves		12
3.2.1 Métodos convencionales		12
Semilla		12
Rizoma		13
Apomixis		13
3.2.2 Micropropagación		16
3.3 Cultivo de tejidos en agavaceas		16
3.3.1 Antecedentes del cultivo <i>in vitro</i> en <i>Agave tequilana</i> Weber cv. Azul		16
3.4 Componentes del medio de cultivo		25
3.4.1 Medio sólido		26
3.4.2 Medio líquido		29
3.4.3 Sales inorgánicas		31
3.4.4 Carbohidratos		34
3.4.5 Sustancias orgánicas		37
3.4.6 Reguladores de crecimiento		37

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

5

3.4.7 pH	42
IV. Materiales y métodos	44
Ubicación del experimento	44
Material vegetativo	44
4.1 Evaluación de medios	44
Preparación de medios	44
Diseño experimental	47
4.2 Evaluación de citocininas	48
Diseño experimental	48
Implantación o siembra	50
Condiciones de incubación	50
V. Resultados y discusión	51
VI. Conclusiones	67
VII. Bibliografía	69
Anexo	

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Índice de cuadros

		Pag.
Cuadro 1.	Antecedentes de la propagación <i>in vitro</i> de Agavaceae.	20
Cuadro 2.	Tendencias en las Investigaciones de <i>Agave tequilana</i> Weber cv. Azul mediante cultivo <i>in vitro</i>	23
Cuadro 3.	Concentración de los medios MS, WPM y Cruz-Pizarro.	45
Cuadro 4.	Concentración de iones en los medios MS, WPM y Cruz-Pizarro.	46
Cuadro 5.	Tratamientos. Evaluación de medios de cultivo.	47
Cuadro 6.	Tratamientos. Evaluación de citocininas	49
Cuadro 7.	Comparación de medias para las variables número y longitud de brotes de <i>Agave tequilana</i> Weber cv. Azul obtenidas en diferentes medios de cultivo	52
Cuadro 8.	No. Promedio de brotes por explante de <i>Agave tequilana</i> Weber cv. Azul obtenidos en diferentes fuentes citocinínicas en tres concentraciones.	59
Cuadro 9.	Comparación de medias para las variables número y longitud de brotes de <i>Agave tequilana</i> Weber cv. Azul obtenidos en diferentes tipos y concentraciones de citocininas.	64
Cuadro 10.	Longitud promedio de brotes de <i>Agave tequilana</i> Weber cv. Azul obtenidos en diferentes fuentes citocinínicas en tres concentraciones.	66

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Índice de figuras

	Pag.
Figura 1. Fases en el proceso de Organogénesis (propuesto por Christianson y Warnick, 1988)	10
Figura 2. Morfología de <i>Agave sp.</i>	14
Figura 3. Número de brotes promedio por explante de <i>Agave tequilana</i> Weber cv. Azul obtenidos en cuatro medios de cultivo durante 6 evaluaciones semanales.	52
Figura 4. Efecto de la concentración de sales, relación $\text{NH}_4:\text{NO}_3$ en la formación de brotes en explantes de <i>Agave tequilana</i> Weber cv. Azul.	55
Figura 5. Longitud promedio de brotes de <i>Agave tequilana</i> Weber cv. Azul obtenidos en diferentes medios de cultivo durante 5 evaluaciones semanales.	57
Figura 6. Número de brotes por explante de <i>Agave tequilana</i> Weber cv. Azul obtenidos en diferentes fuentes citocinínicas en tres concentraciones.	60
Figura 7. Respuesta al efecto inductivo en la formación de brotes de <i>Agave tequilana</i> Weber cv. Azul de tres fuentes citocinínicas en tres concentraciones.	62
Figura 8. Longitud promedio de brotes de <i>Agave tequilana</i> Weber cv. Azul obtenidos en diferentes fuentes citocinínicas en tres concentraciones.	66

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RESUMEN

La escasez de materia prima y de hijuelos es una problema que se ha presentado de manera cíclica en los poco más de trescientos años de existencia de la industria tequilera; por lo que se han buscado alternativas de multiplicación a las prácticas convencionales que permitan obtener material vegetativo de calidad y en volúmenes óptimos.

La micropropagación se ha visto como una herramienta valiosa para la multiplicación y mejoramiento genético del agave tequilero desde finales de la década de los 80's. sin embargo en la actualidad todavía no se lleva a cabo como una práctica comercial de multiplicación, proponiéndose seguir con el proceso de investigación para la generación de conocimientos para mejorar y/o desarrollar nuevas técnicas de cultivo.

Entre los factores más importantes en un protocolo de multiplicación *in vitro* para lograr la expresión de una determinada respuesta morfológica (vía organogénesis o vía embriogénesis somática), se encuentra el medio de cultivo, principalmente el aporte nutrimental (concentración de sales) y la concentración de fitohormonas.

Tanto el aporte nutrimental del medio como el balance hormonal son los dos aspectos de principal interés en este trabajo, ya que existe limitada información de los efectos relativos de las hormonas y la concentración mineral en la formación y multiplicación de brotes de agave tequilero.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Se evaluó el efecto de distintas concentraciones de minerales en la formación y crecimiento de brotes en explantes de *Agave tequilana* Weber cv. Azul; como lo son la de los medios de cultivo propuestos por Murashige y Skoog (1962), MS 100 al %, MS al 50% de su concentración total, Woody Plant Medium (WPM) McCown & Lloyd (1980) y Cruz-Pizarro (2000), manejando una misma concentración de BA (2.22 μM) y AIB (0.49 μM) para los cuatro medios, obteniendo que la formación de brotes se dió a partir de una semana de su establecimiento, obteniéndose en el medio Cruz Pizarro (2000) 7.8 brotes por explante, seguido de MS 100%, WPM y MS 50 % con 6.4, 5.3 y 3.9 brotes por explante respectivamente. La longitud promedio fue de 18.2 mm, teniendo en el medio MS 50% brotes con la mayor longitud promedio con 20.88 mm siendo 15 %, 10% y 26 % superior a los medios MS 100%, WPM y Cruz-Pizarro (2000).

Se estudio también, en un segundo experimento, el efecto inductivo en la formación de brotes de tres fuentes citocinínicas: Kinetina, Benciladenina y Thidiazuron; en explantes de *Agave tequilana* Weber cv. Azul. Se tomó como base la concentración de sales del medio Cruz-Pizarro (2000), utilizando como explantes brotes de hijuelos de rizoma obtenidos *in vitro*. Se manejaron tres niveles en la concentración de citocininas, 2.32 μM , 4.60 μM y 6.90 μM para las tres fuentes y una concentración constante de AIB con 0.49 μM para todos los casos, manteniendo con ello una proporción citocinina / auxina de 5:1, 10:1 y 15:1.

La formación de pequeños brotes en la base se observó a los siete días de su establecimiento; resultando los tratamientos TDZ 4.60 μM con mayor proliferación

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

de brotes, con 16 brotes por explante y 6.1 brotes por explante en Kinetina a 4.60 μM .

Se obtuvo un promedio general en longitud de brotes de 15.6 mm, mostrando una longitud mayor los tratamientos de las concentraciones de 2.32 μM para los tres compuestos citocinínicos TDZ, KIN y BA.

En los tratamientos con BA se presentó desarrollo de raíz en los explantes, no así para los tratamientos con TDZ y Kinetina.

Los explantes no mostraron vitrificación durante el desarrollo de su cultivo in vitro.

Es factible la propagación de esta especie por medio de la micropropagación como una alternativa a la multiplicación convencional.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

I. INTRODUCCIÓN.

La crisis productiva por la que atraviesa hoy en día el agave azul, ha encarecido la materia prima por su disminución en las zonas productoras, afectando a la industria tequilera así como a los productores por la falta de hijuelos para el establecimiento de nuevas superficies.

A inicios de la década de los 90's, se iniciaron los primeros trabajos en cultivo de tejidos en ésta especie, presentándose como una propuesta de reproducción masiva y como una herramienta en el mejoramiento genético.

Existen escasos informes sobre la propagación *in vitro* de esta especie; si bien, se encuentran algunos trabajos en el género agave en los cuales se ha buscado la estandarización de protocolos de cultivo, para ser usados en la producción de clones *in vitro* con fines comerciales de esta especie; en la actualidad aun no se lleva a cabo como una práctica comercial de multiplicación, proponiéndose seguir con el proceso de investigación para la generación de conocimientos para mejorar y/o desarrollar nuevas técnicas de cultivo, buscando ofrecer material vegetativo de alta calidad y en volúmenes óptimos.

A diferencia de otros cultivos la propagación convencional del agave azul requiere de tres a cuatro años para obtener un número limitado de hijuelos de rizoma viables para plantaciones comerciales y tomando en cuenta que la escasez de materia prima e

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

hijuelos se ha presentado de manera cíclica es indispensable trabajar con otras alternativas de multiplicación.

Dado que la micropropagación es una herramienta valiosa en la multiplicación masiva y para el mejoramiento, se ha planteado trabajar la multiplicación de este cultivo mediante esta técnica.

Entre los factores más importantes en un protocolo de multiplicación *in vitro* para lograr la expresión de una determinada respuesta morfológica (vía organogénesis o vía embriogénesis somática), se encuentra el medio de cultivo principalmente el aporte nutrimental (concentración de sales) y la concentración de fitohormonas

El efecto nutrimental se ha evaluado en diferentes especies, en los cuales se ha concluido que influye de forma importante en el desarrollo y calidad del explante. La concentración de nutrimentos puede afectar la calidad y número de brotes, por lo que es necesario estudiar su efecto en la especie de interés.

La manipulación de las concentraciones de auxinas y citocininas en los medios de cultivo permite controlar la organogénesis *in vitro* de muchas especies vegetales, constituyendo además la base de gran parte de los protocolos de micropropagación (propagación vegetativa *in vitro*) existentes en la actualidad.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

II. OBJETIVOS.

2.1 Generales.

Evaluar diferentes medios de cultivo en la multiplicación y desarrollo de *Agave tequilana* Weber cv. Azul bajo condiciones *in vitro*.

Evaluar distintos compuestos citocinínicos en la formación de brotes en explantes de *Agave tequilana* Weber cv. Azul obtenidos *in vitro*.

2.2 Particulares.

- Determinar el mejor medio de cultivo que favorece la multiplicación y desarrollo de brotes.
- Analizar el comportamiento morfológico de los explantes en los diferentes medios de cultivo.
- Evaluar la respuesta morfogénica de explantes expuestos a diferentes concentraciones y tipos de compuestos citocinínicos.
- Determinar el tipo y concentración de citocinina que favorece el balance hormonal en la formación y multiplicación de brotes.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2.3 Hipótesis.

- Si la capacidad de organogénesis esta determinada entre otros factores por la nutrición *in vitro*, al variar la composición del medio de cultivo existirán diferencias en este proceso que se reflejara en el número y calidad de brotes.

- Si la eficiencia en la generación de brotes esta determinada por la relación exógena de fitohormonas del medio al variar la misma se tiene diferente respuesta organogénica en los explantes.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

III. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1 Morfogénesis *in vitro*

La morfogénesis puede definirse como la génesis o iniciación de la forma y de la función de los organismos vivos. El estudio de la morfogénesis vegetal tiene como objetivo fundamental identificar los procesos moleculares, bioquímicos y fisiológicos que conducen a la aparición de nuevas estructuras organizadas en el cuerpo de la planta (Azcon-Bieto y Talón, 1993).

A nivel experimental se utiliza el término morfogénesis para describir el origen de la forma de la planta, entendiendo por forma la organización estructural de la célula individual o ultraestructura, la organización de células para formar tejidos o anatomía y cuerpo de la planta o morfología (Wareing y Phillips, 1978).

Todos los organismos, especialmente las plantas, muestran una tendencia a restaurar o reemplazar partes que les han sido removidas, produciendo nuevamente una estructura completa a cierta distancia de la superficie herida; a este proceso se le denomina regeneración y se refiere a la organización de estructuras, fisiológicamente aisladas del organismo (Tran-Thán-Van y Trinh, 1990). Sin embargo, en la mayoría de los reportes en cultivo de tejidos utilizan este término asociado estrechamente con el de "totipotencia", para referirse a la organización de plantas completas a partir de células o tejidos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

El desarrollo histórico de la tecnología del cultivo *in vitro* va ligado a los intentos por demostrar experimentalmente la totipotencia celular, es decir la capacidad de las células para regenerar el fenotipo de la planta de la que derivan. El proceso de diferenciación celular no implica pérdida de material genético sino expresión diferencial de los genes (Azcon-Bieto y Talón, 1993). Por ello, la mayoría de las células vegetales pueden en principio considerarse totipotentes; siendo la base de la multiplicación vegetativa.

Los trabajos ya clásicos de Skoog y Miller (1957) en tabaco y los de Steward et al., (1958) y Reinert (1959) en células somáticas de zanahoria crearon las bases para el estudio de la morfogénesis *in vitro* de las plantas superiores. Actualmente, se sabe que las células en cultivo pueden manifestar su totipotencia regenerando plantas completas siguiendo dos rutas alternativas:

Organogénesis, que conducen a la diferenciación de meristemos caulinares y/o radiculares, que originan tallos (caulogénesis) o raíces adventicias (rizogénesis).

Embriogénesis somática, que lleva a la formación de embriones somáticos a partir de células somáticas embriológicamente competentes (Ahuja, 1993) siguiendo las fases del embrión cigótico (globular, corazón, torpedo, cotiledonar), aunque obviamente, sin fecundación.

En las dos rutas siempre es posible distinguir dos modelos de desarrollo morfológico:

Morfogénesis directa, cuando los órganos o embriones se originan directamente del explante (parte de la planta utilizada para establecer el cultivo) en ausencia de proliferación de callo (masa celular sin diferenciación aparente).

Morfogénesis indirecta, en la que la formación de callo es previa al desarrollo de estructuras organizadas.

Organogénesis.

La organogénesis involucra procesos de diferenciación e interacción celular y reacción a señales específicas; mediante los cuales es posible la generación de brotes adventicios a partir de tejido somático. Estos brotes se caracterizan por ser estructuras unipolares conectadas físicamente al tejido que les dio origen (conexión vascular con el tejido del que derivan) (Thorpe, 1981; Dixon, 1985).

Mediante este proceso morfológico pueden diferenciarse *in vitro* brotes adventicios ó axilares, que son susceptibles de enraizar y formar plantas completas.

En la organogénesis los brotes pueden generarse sin la fase de callo (organogénesis directa) o bien generarse a partir de callo (organogénesis indirecta).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Esta vía de regeneración se ha utilizado en genotipos mejorados con baja tasa de propagación *in vitro*, en especies de difícil propagación por métodos convencionales y en especies susceptibles a plagas y enfermedades.

La respuesta morfogénica por dichas vías de regeneración es estimulada por el tipo de explante, medio de cultivo, tipo y concentración de fitohormonas (Christianson y Warnick, 1988) y factores ambientales por lo que en un protocolo de multiplicación *in vitro* deben considerarse dichos aspectos. La capacidad de regeneración a través de los procesos de diferenciación, está determinada por la interacción de factores intrínsecos y extrínsecos de la planta, que en condiciones de cultivo *in vitro* pueden ser controlados.

Los factores intrínsecos involucran al genotipo y estado de desarrollo de la planta y el explante. Mientras que los extrínsecos incluyen: a) condiciones ambientales del medio como el suministro de nutrimentos orgánicos e inorgánicos y hormonas; y b) condiciones físicas como la consistencia del medio de cultivo, la luz, la temperatura y el pH.

La regulación química de la morfogénesis en tejidos *in vitro* ha sido bien documentada desde que, en 1957, Skoog y Miller demostraron la importancia del balance hormonal auxina-citocinina, sin embargo, muchas especies no responden a los procedimientos lógicos de cultivo por lo que se continua investigando sobre los posibles mecanismos de cultivo involucrados en el proceso (Christianson y Warnick 1988; Ellen, 1988). Algunos aspectos de la morfogénesis vegetal han sido estudiados durante un largo tiempo desde diferentes puntos de vista, pero puede decirse que aún no se ha obtenido un control perfecto de la morfogénesis *in vitro*.

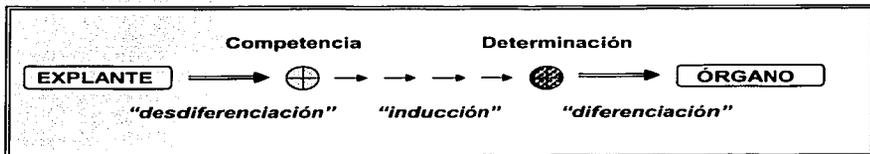
Si bien la expresión *in vitro* de una determinada respuesta morfogénica (regeneración de raíces, tallos o embriones) viene determinada por la interacción de numerosos factores, es indudable que las fitohormonas desempeñan un papel fundamental en el control de la morfogénesis (Ammirato, 1986). De esta forma, la respuesta morfogénica influye tanto los niveles endógenos de auxinas y citocininas, como la relación exógena de fitohormonas del medio de cultivo.

Skoog y Miller (1957) demostraron en el proceso organogénico está determinado por un balance entre auxinas y citocininas; la influencia de este balance la estudiaron en *Nicotiana tabacum* L., encontrando que una proporción mayor de auxinas con relación a citocininas indujo raíces, mientras una proporción opuesta indujo la formación de brotes. Estos resultados demostraron que el balance hormonal marca el destino de las células morfológicamente competentes, donde auxinas como 2,4 - D, ANA y AIB son importantes en la inducción de raíces y callo, mientras que citocininas como: BA, 2iP,

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Kinetina y Zeatina son necesarias para mantener el crecimiento celular del tejido e inducir regiones meristemáticas de acuerdo al esquema presentado en la Figura 1.

Figura 1. Fases en el proceso de Organogénesis (propuesto por Christianson y Warnick, 1988)



La formación de callo en el explante es referida como desdiferenciación, mientras que la capacidad del explante para responder al efecto inductivo del medio es llamada "competencia". Según Walker et al., (1979), la competencia para inducir brotes está en función de la acción de los genes y el tamaño de los agregados celulares. La fase de inducción está influenciada por fitohormonas exógenas, las cuales juegan un papel importante en la síntesis de proteínas que determinan, mediante la diferenciación, la generación de un brote o raíz.

La manipulación de las concentraciones de auxinas y citocininas en los medios de cultivo permite controlar la organogénesis *in vitro* de muchas especies vegetales, constituyendo además la base de gran parte de los protocolos de la propagación vegetativa *in vitro* existentes en la actualidad (Debergh y Zimmerman, 1991).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La regulación más precisa de órganos en respuesta a la aplicación exógena de auxinas y citocininas se consigue utilizando explantes superficiales (epidérmicos y subepidérmicos). En este tipo de explantes es posible, establecer varios programas morfogénicos (Inducción de yemas florales o vegetativas, raíces y callo) efectuando cambios en la relación auxina:citocinina, pH, intensidad luminosa y azúcares, (Tran-Tham-Van y Trinh, 1990).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

3.2 Propagación de agaves

A diferencia de otros cultivos la propagación del agave azul requiere de tres a cuatro años para obtener material vegetativo viable para plantaciones comerciales.

El agave tequilero al igual que otros agaves se reproduce asexualmente a través de vástagos o hijuelos que emergen del suelo y por pequeñas plantas del "quiote" o eje floral. La reproducción sexual es por semilla y no es igual a la planta madre.

3.2.1 Métodos convencionales

Los agaves tienen tres formas de propagarse: Vía sexual en forma de semillas; por hijuelos de rizoma y por apomixis vegetativa (pequeños hijuelos de la inflorescencia o quiote), estas dos últimas, son vías asexuales (Valenzuela, 1994).

Semilla

La reproducción sexual en agaves es limitada debido a que las semillas presentan porcentajes bajos de germinación y variación genética de las mismas. Las plantas resultantes son muy heterogéneas para el cultivo, además de tener un crecimiento lento pudiendo tardar casi tres años para llegar a ser una plántula de tamaño comercial.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Rizomas.

La multiplicación a través de rizomas es común en la generalidad de los agaves. El rizoma es una estructura especializada para la división y/o separación, es un tallo lateral etiolado, el cual crece plagiotrópicamente, con hojas pequeñas excepto cuando son expuestas a la luz; los rizomas emergen del tallo principal y son inducidos acrópetamente (Hartmann et al., 1997).

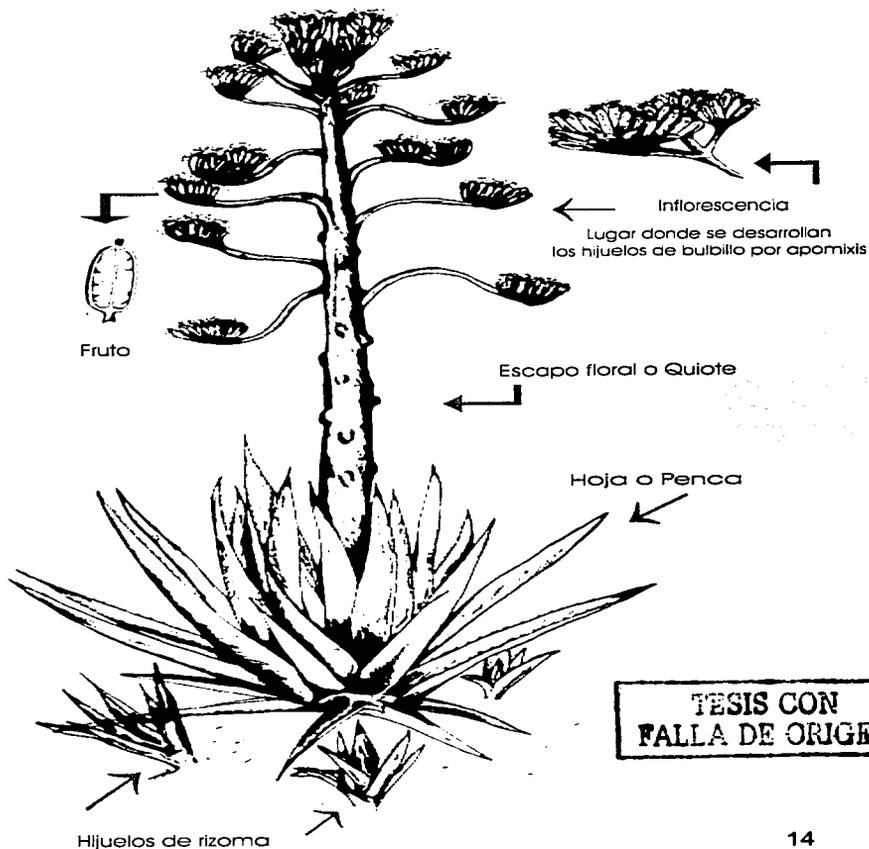
Los hijuelos de rizoma son comúnmente usados en el cultivo para el establecimiento de plantaciones de agave. Esta ha sido la única forma de propagación que se ha practicado por mucho tiempo (200 años o más). La ventaja de esta forma de propagación es la rapidez con que se obtienen plántulas de buen tamaño y la calidad de éstas por planta (Figura 2).

Apomixis.

Para el caso de los agaves existe otra forma asexual de reproducción diferente a los rizomas, que son los hijuelos de qurote o bulbillos, que se producen por apomixis vegetativa.

La apomixis puede definirse como la producción de semillas sin previa fecundación. Esta puede producirse por varios mecanismos y las semillas resultantes tienen solo el material genético de la planta madre.

Figura 2. Morfología de *Agave sp.*



Puede requerir o no de la polinización o de la germinación del tubo polínico para dar inicio a la formación de semilla, pero nunca se produce la unión sexual, siendo término más específico que el concepto de poliembrionía, que alude solo a la presencia de más de un embrión en la semilla independientemente del origen de los mismos (Bustamante, 1997).

Una forma de apomixis vegetativa es precisamente la presencia de plántulas en la inflorescencia. La floración es necesaria para que éstos se produzcan.

Apomixis vegetativa es el término usado para definir el proceso de formación de un embrión dentro del óvulo de las plantas que producen flores. Es decir que en lugar de que ocurra la producción de la flor se producen en el mismo sitio estructuras vegetativas (Hartmann et al., 1997).

Álvarez de Zayas (1987) mencionó que, en especies como el sisal y espadín se pueden tener de 2000 a 3000 plántulas por planta madre; de esta manera se obtienen tantos bulbillo como botones florales.

3.2.2 Micropropagación.

Al igual que otras plantas perennes con limitaciones en su multiplicación, la propagación vegetativa mediante la utilización del cultivo *in vitro* es una opción muy importante para las plantas como los agaves, obteniendo a través de la manipulación de células y tejidos *in vitro* plántulas viables para plantaciones comerciales.

3.3 Cultivo de tejidos en Agavaceas.

Nava (1988) mencionó que en Agavaceae, el cultivo *in vitro* ha sido orientado casi exclusivamente a la micropropagación, teniendo como antecedentes históricos los trabajos en el género *Cordyline* en 1975 y *Dracaena* y *Yucca* en 1974. Para el género *Agave* se tiene el primer reporte es publicado en 1977, y es hasta finales de la década de los ochenta cuando se reportan algunos trabajos específicos sobre cultivo *in vitro* de agave tequilero (Cuadro 1).

3.3.1 Antecedentes del cultivo *in vitro* en *Agave tequilana* Weber cv. 'Azul'

La primera propagación del agave tequilero por cultivo de tejidos fue reportada por Gracián-Sandoval, (1987), la cual coincidió con un período crítico de abasto de material vegetativo procedente del agave. La propagación masiva del agave tequilero se mostró entonces como una panacea a dicha problemática (Valenzuela, 1994).

Por esos tiempos la Cámara Regional de la Industria Tequilera firmó un convenio con la desaparecida promotora del maguey y el nopal (PROMAN), el proyecto no tuvo seguimiento.

En los siguientes años Tequila Cuervo estableció un laboratorio especializado en la micropropagación de agave con asesoría del Centro de Investigación Científica de Yucatán. Este proyecto no se difundió en forma pública.

Los trabajos de investigación sobre las técnicas de propagación de agave tequilero abundaron en periodos de escasez de hijuelos y materia prima, dejando de ser atractivos para los productores de agave y de tequila. Debido a las siguientes causas:

- a) Altos costos para obtener plántulas.
- b) Probables fallas técnicas de la metodología.
- c) La falta de un planteamiento real sobre la problemática del cultivo del agave.

A la fecha se tiene conocimiento de las tendencias y aspectos que comprenden los trabajos de investigación sobre esta técnica en agave tequilero, la mayoría de estos aún en etapa experimental (Cuadro 2), pero aún las empresas y productores no están convencidos totalmente del beneficio que pueden obtener con la micropropagación del agave.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Cuadro1. Antecedentes de la propagación in vitro de Agavaceas.

ASPECTO	EXPLANTES	MEDIO Utilizado
Micropropagación de <i>Cordylíne terminalis</i> (Kunisaki, 1975).	Secciones de ápices de brotes preestablecidos asépticamente en medios sin hormona.	MS; tiamina 0.4 mg• L ⁻¹ Pridoxina 0.5 mg• L ⁻¹ Acido nicotínico 0.5 mg• l ⁻¹ , sacarosa 30 g• L ⁻¹ , Bacto agar 9 g• L ⁻¹
Inducción de callos en distintas especies de <i>Agave</i> (Groenewald et al., 1977).	Fragmentos de semillas.	LS modificado (ácido p-amino benzoico 0.1 mg• L ⁻¹ , tirosina 100 mg• L ⁻¹ , caseína hidrolizada 3 g• L ⁻¹ , 2,4-D, K), agar 8 g• L ⁻¹
Propagación de <i>Cordylíne terminalis</i> a partir de callo (Mee, 1978).	Secciones de ápices de brote.	MS, i- inositol 100 mg• L ⁻¹ Tiamina 0.4 g l ⁻¹ 2,4-D 3 mg•L ⁻¹ , agua de coco 10 % (v/v), sacarosa 20 g• L ⁻¹ , agar 9 g• L ⁻¹ , pH 5.6
Estudio de las condiciones de cultivo de células de <i>Yucca filifera</i> y su cuantificación de sarsasapogenina (Quintero et al., 1980)	Fragmentos de coleóptilos y hojas, de plántulas preestablecidas asépticamente.	MS modificado (ANA o 2,4-D y BA)
Propagación in vitro de <i>Dracaena manginata tricolor</i> (Chua et al., 1981).	Secciones de tallo incluyendo nudo y entrenudo.	MS, ANA, 2,4-D o Kin, agua de coco 15 % (v/v), sacarosa 20 g• L ⁻¹ , Bacto agar 8 g• L ⁻¹ , pH a 6.0
Propagación in vitro de henequén <i>Agave fourcroydes</i> Lem. (Madrigal et al., 1981).	Yemas axilares de tallo hijuelos, rizomas e inflorescencia, así como secciones de tejido del tallo y de hojas jóvenes.	MS, tiamina 0.4 mg• L ⁻¹ , inositol 100 mg• L ⁻¹ , una auxina (AIA, AIB, ANA o 2,4D) con BA o Kin, sacarosa 30 g• L ⁻¹ , pH a 5.7, agar 8 g• L ⁻¹
Propagación In vitro de <i>Sansevieria trifasciata</i> (Blazich y Novitzky, 1984).	Fragmentos de hoja de la mitad superior del tallo.	MS modificado (ANA, 2,4-D o Kin) sacarosa 20 g• L ⁻¹ , pH a 6.3, Bacto- agar 8 g• L ⁻¹ .
Efecto hormonal en el cultivo in vitro de distintos cultivares de <i>Cordylíne</i> . (Leffring et al., 1985).		N.R.
El cultivo de tejidos vegetales y su posible aplicación en el mejoramiento genético de las Agavaceas. (Robert y García, 1985).		N.R.
Morfogénesis in vitro de <i>Yucca schidigera</i> . (McCarthy y Staba, 1985).	Secciones de hipocótilo.	MS modificado (ANA o 2,4-D), agar 1 g• L ⁻¹ .

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Efecto de la composición del medio en la propagación <i>in vitro</i> y desarrollo <i>in vivo</i> de <i>Cordylina terminalis</i> (Evaldsson y Welander, 1985)	Brotes axilares (2-4 mm).	Sales MS al 50 y 10 %, WH y LP suplementados con sacarosa 20, 30 y 40 g•L ⁻¹ agar 6 g•L ⁻¹ , auxinas (ANA, ANO, AIA y AIB) concentraciones de 0.1, 0.5 y 1.0 mg•L ⁻¹ , Citocininas (BA, BAP, Zeatina, 2iP y Kin) a 0.1, 0.5 1.0 y 2.0 mg•L ⁻¹
Medio líquido adicionado para el establecimiento de cultivo de tejidos y la mejora de la elongación y enraizamiento <i>in vivo</i> en <i>Cordylina fruticosa</i> , <i>Philodendron erubescens</i> , <i>Magnolia soulangeana</i> . (Maene y Debergh, 1985)	Brotes obtenidos <i>in vitro</i> .	MS al 100, 50, 25 y 10 %, tiamina 0.4 mg•L ⁻¹ , I-inositol 100 mg•L ⁻¹ , Kin 0.5 y 2.5 mg•L ⁻¹ , sacarosa(0, 10, 20, 30 40, 50, 60, 80 y 100 g•L ⁻¹)
Propagación <i>in vitro</i> del mezcal tequilero <i>Agave tequilana</i> Weber (Gracián-Sandoval y Cruz, 1987)	Apices de brote.	Sales MS al 100 y 50 %, tiamina 0.4 mg•L ⁻¹ , piridoxina 0.5 mg•L ⁻¹ , AIB, una auxina y una citocinina, sacarosa 30 g•L ⁻¹ , pH a 5.8, medio líquido y con agar 6 g•L ⁻¹ .
Propagación <i>in vitro</i> de maguey pulquero. (Gracián-Sandoval, 1987).	N.R.	N.R.
Estudio comparativo de las enzimas involucradas en el metabolismo nitrogenado en plantas sanas y vitrificadas de <i>Agave tequilana</i> Weber (Castro et al., 1987).	N.R.	MS modificado (23 mM de NO ₃ ⁻ , 5 mM de NH ₄ ⁺ , 2, 4-D, BA), condiciones crecientes de potencial osmótico
Aprovechamiento integral de Agaves y Opuntias. (Pérez et al., 1987)	N.R.	N.R.
Propagación <i>in vitro</i> de <i>Agave fourcroydes</i> . (Robert et al., 1987)	Secciones de tejido de rizoma y tallo.	MS modificado (K NO ₃ 5 mM, NO ₃ ⁻ NH ₄ ⁺ 18 mM, 2,4-D, BA) o B5 ¹ modificado (2,4-D, BA) o SH ² modificado (2,4-D, BA) o SH modificado (K NO ₃ 5mM, NO ₃ ⁻ NH ₄ ⁺ 10 mM, 2,4-D, BA); agar 10, 6 y 6 g•L ⁻¹ para MS, B5 y SH respectivamente
Aplicación de la biotecnología en cultivos agroindustriales: caso de los Agaves (Madrigal y Bailón, 1987).	N.R.	N.R.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Agave tequilana in vitro, un modelo para estudio en morfogénesis (Nava, 1988).	Secciones de tallo.	MS suplementado con tiamina 1 g ^o L ⁻¹ , l-inositol 100 g ^o L ⁻¹ , citocininas (AIA, BA, Kin, 2iP) a concentraciones de 5, 10, 50, 100 μM combinadas con 2.9 μM de AIA.
Propagación in vitro de Agave arizonica Gentry & Weber (Powers y Backhaus, 1989).	Bulbillos, segmentos basales de hoja.	Sales MS, suplementado con 555 μM de inositol y 8 g ^o L ⁻¹ agar, tiamina (11.2, 0.3 μM), ácido nicotínico 4.0 μM, piridoxina 0.5 μM, adonina sulfato 198 μM, tirosina 552 μM, BAP 44.4 μM, ANA 0.5 y 5.4 μM, 2,4-D 1.4 μM, sacarosa 58.5, 87.7 y 58 g ^o L ⁻¹ .
Actividad de la Glutamato dehidrogenasa en plantas normales y vitrificadas de Agave tequilana Weber Propagadas in vitro (Castro-Concha et al., 1990).	Segmentos de tallo	MS modificado, KNO ₃ 18 mM, NO ₃ NH ₄ 5 mM, suplementado con 44.4 μM de BA, 0.113 μM de 2,4-D y 30 g ^o L ⁻¹ de sacarosa.
Rápida propagación de Agave cantala, A. Fourcroydes y A. sisalana por cultivo in vitro (Binh et al., 1990).	Segmentos de tallo (7-8mm) distintas secciones.	MS, sacarosa 2%, 10% agua de coco y 8% de agar, ANA 0.075 mg ^o L ⁻¹ , AIB 0.1 mg ^o L ⁻¹ más 0.5 mg ^o L ⁻¹ de Kinetina.
Micropropagación de Agave sisalana (Das, 1992)	Segmentos de tejido de rizoma (5-7 mm) y brotes laterales (6-8 mm).	MS y SH con 3% de sacarosa, 0.6% de agar, BA 0.89, 2.2, 4.4, 8.9, 22.2 y 44 μM, en MS, 22.2 y 44.0 μM de BA en SH.
Influencia de los agentes gelificantes en el cultivo in vitro de Cordyline, Rosa y homalomena (Podwyszynska y Olsewski, 1995).	Brotes obtenidos in vitro.	MS, solidificado con diferentes agentes gelificantes Bacto-agar 7 g ^o L ⁻¹ , Agar purificado 7 g ^o L ⁻¹ , Agargel 3.5 g ^o L ⁻¹ , Phytagel 2 g ^o L ⁻¹ y Galrito 2 g ^o L ⁻¹ .
Micropropagación de henequén: notas y tecnología (González-Oramas et al., 1996).	N.R.	N.R.
Propagación in vitro y establecimiento de Dracaena marginata var. Tricolor (Atta-Alla et al., 1996)	N.R.	N.R.
Propagación in vitro de Agave pacifica (Moreno-Salazar et al., 1996).	N.R.	N.R.
Clonación masiva de Agave sisalana (Vargas y García, 1996).	N.R.	N.R.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Embrigiogenesis <i>Agave victoria-reginae</i> Moore (Rodríguez-Garay et al., 1996).	Hojas.	MS modificado, 5mM de $\text{NO}_3^- \text{NH}_4^-$, suplementado con L2 vitaminas, 4.6 :M de Kinetina, 1.6 μM ANA, y solidificado con 2 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ de Phytigel. MS con L2 vitaminas, sacarosa 30 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 2,4-D (0.34, 0.68, 1.4 y 2.8 μM), agar 8 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$.
Alta frecuencia en la regeneración de brotes de <i>Agave sisalana</i> (Nikam, 1997).	Segmentos de tallo de bulbillos (10-12 mm^2) segmentos de rizoma (10 mm^2).	MS, Gamborg (L5), SH, y Whilo, suplementados con vitaminas MS y AIA, ANA, 2,4-D, Kinetina y BA (0.1 y 5.0 mg l^{-1}) pH a 5.7
Micropropagación y establecimiento de <i>Yucca aloifolia</i> (Atta-Alla y Van, 1999).	Brotes obtenidos <i>in vitro</i> .	MS, sacarosa 3 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ y 0.2 % de Gólrilo. ANA 1.1 μM combinada con BA (4.4, 8.9 y 17.8 μM) o TDZ (1.1, 2.3 y 4.5 μM)
Desarrollo y acumulación nocturna de ácidos durante la ontogenia de <i>Agave attenuata</i> cultivado <i>in vitro</i> (Estudio metabolismo CAM en cultivo <i>in vitro</i>) (Wen et al., 1997).	Semillas.	MS al 25 %, pH ajustado a 5.7 - 5.8
Proliferación y enraizamiento de brotes de <i>Yucca aloifolia</i> , <i>Y. filamentosa</i> , and <i>Y. filamentosa</i> var. Variegata (Atta-Alla et al., 1997).	N.R.	N.R.
Embrigiogenesis somática de algunas cactáceas y agaves (Santacruz-Ruvalcaba et al., 1999)	N.R.	N.R.
Propagación eficiente <i>in vitro</i> de <i>Agave Parrasana</i> Berger. (Santacruz-Ruvalcaba et al., 1999)	Semillas.	Sales MS, vitaminas L ₂ (Phillips and Collins, 1978), 30 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ de sacarosa, 8 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ de agar, BA (0, 13.3, 26.6, 39.9 y 53.2 μM) y 2,4-D (0, 0.04, 0.11 y 0.18 μM)
Interacción de los iones en la producción de saponina esteroides contenidos en cultivo de callos de <i>Agave amaniensis</i> (Inv. Farmaceutica) (Adrijany et al., 1999).	Callos cultivados.	MS, suplementado con 23.2 μM de Kinetina, 2,4-D 2.26 μM , KH_2PO_4 2.50 μM , sacarosa 87.64 μM y agar 7 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$.
Propagación de palma cabbage (<i>Cordylone terminalis</i>) (Javed-Butt, 1999).	N.R.	N.R.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Efecto de los reguladores de crecimiento en la micropropagación de <i>Dracaena</i> . (Grewal et al., 1999).	N.R.	N.R.
Protocolo de micropropagación de <i>Dracaena marginata</i> (Sawy et al., 2000)	N.R.	N.R.
Propagación <i>in vitro</i> de <i>Dracaena</i> . (Sink et al., 2001).	N.R.	N.R.
Asimilación de iones de cobre en suspensión celular en el cultivo de <i>Agave amaniensis</i> , y su efecto en el desarrollo y contenido de aminoácidos Inv. Farmacéutica (Kartosentono et al., 2002).	Callos.	MS adicionado con 5 mg• L ⁻¹ de Kinetina, 0.5 mg• L ⁻¹ de 2,4-D, 340 mg• L ⁻¹ KH ₂ PO ₄ , 3% de sacarosa, 0.7 % de agar
Regeneración via organogénesis de plantas de sisal <i>Agave sisalana</i> (Hazra et al., 2002)	Segmentos de Rizoma 6 mm.	MS, NO ₃ NH ₄ : 1500 mg•L ⁻¹ , 9.05 μM de 2,4-D y Kinetina 4.6 μM, 30 g• L ⁻¹ y 8 g• L ⁻¹ de Bacto agar, para inducción de callos. Para regeneración de plantas utilizaron el medio: MS adicionado con BA, 2iP, Kinetina (9.3, 18.6, 27.9, 37.2, 46.0 μM), Zeatina (0.46, 2.26, 4.56 μM) y TDZ (0.46, 0.92, μM)

N.R. : No referido.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Cuadro 2. Tendencias en las Investigaciones de *Agave tequilana* Weber cv. Azul mediante cultivo *in vitro*.

TITULO	INSTITUCION	AUTOR
Micropropagación de agave tequilero	Cámara Regional de la Industria Tequilera	Promotora del Maguey y Nopal(1987), citado por Valenzuela (1994)
Laboratorio de cultivo de tejidos.	Tequila Cuervo S.A. de C.V.	Tequila Cuervo con asesoría del CICY (1987), Citado por Valenzuela (1994)
<i>Agave tequilana in vitro</i> , un modelo para estudio en morfogénesis.	Colegio de Postgraduados	Nava (1988)
Perfiles de poliaminas durante el desarrollo <i>in vitro</i> en explantes de <i>Agave tequilana</i> Weber y <i>Agave fourcroydes</i> Lem cultivadas en condiciones vitrificantes y no vitrificantes.	Universidad Autónoma de Yucatán.	Aguilar (1988)
Cuantificación de la actividad de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa durante la micropropagación de <i>Agave tequilana</i> Weber.	Universidad Autónoma de Yucatán.	Maldonado (1988)
Cuantificación de la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa durante la micropropagación de <i>Agave tequilana</i> Weber.	Universidad Autónoma de Yucatán.	Peraza (1988)
Potencial productivo de la biotecnología aplicada a la agroindustria tequilera.	Universidad Autónoma de Chapingo.	Madrigal -Lugo (2000).
Reserva genética y propagación de clones de <i>Agave tequilana</i> Weber resistentes a enfermedades conocidas como marchiteces.	Universidad de Guadalajara.	Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de U. de G. (1996) . Proyecto en curso.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Clonación masiva <i>in vitro</i> de <i>Agave tequilana</i> Weber.	Centro de Investigación y Asesoría Tecnológica del Estado de Jalisco.	Rodríguez- Garay (1997)
Embriogénesis somática indirecta en <i>Agave tequilana</i> Weber: efecto citocininas.	Universidad de Guadalajara.	Santacruz- Ruvalcaba (1997)
Embriogénesis somática indirecta en <i>Agave tequilana</i> Weber: efecto auxinas.	Universidad de Guadalajara.	Portillo (1997)
Selección celular para resistencia a filtrados microbianos en <i>Agave tequilana</i> Weber.	Universidad de Guadalajara	Vélez (1997)
Generación de variabilidad genética mediante mutagénesis <i>in vitro</i> de <i>Agave tequilana</i> Weber.	Universidad Autónoma de Yucatán	Osorio (2001)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Dentro de los aspectos que se han estudiado en la micropropagación de agaves son los siguientes:

3.4 Componentes del medio de cultivo

Uno de los factores a considerar al iniciar un protocolo de micropropagación, es el medio de cultivo (Villegas 1990). El medio de cultivo es necesario en las diferentes etapas de micropropagación, sus principales componentes son: **1) sales inorgánicas, 2) sustancias orgánicas como fuentes de energía y carbón(carbohidratos), vitaminas, aminoácidos y reguladores de crecimiento, 3) compuestos no definidos de origen natural: jugos, extractos de frutos, antioxidantes, absorbentes (carbón activado) y 4) materiales inertes de soporte como el agar, silicagel.**

Los minerales constituyen sustancias nutritivas importantes, la mezcla de macro y micro-sales depende mucho de las plantas con las que se trabaja. Siendo los medios básicos más usados: MS (Murashige y Skoog, 1962) para plantas herbáceas y el Woody Plant Medium (McCown & Lloyd, 1980) para plantas leñosas (Kyte y Kleyn, 1996)

El éxito de la generación de plántulas por cultivo *in vitro* depende de la selección de un medio adecuado, tipo de explante, ambiente de incubación y calidad de reactivos (Guerrero-Agama, 2000). De la forma en que se prepare el medio (cantidad, combinación de todos los constituyentes y esterilización) dependerán los resultados que se obtengan en el cultivo de tejidos (Villavicencio, 1998)

Si se quiere determinar un protocolo eficiente de multiplicación, se requiere diseñar un medio de cultivo, o bien modificar la concentración de sales en base a la especie que se pretende multiplicar.

Dentro de estos medios de cultivos se pueden considerar sólidos (con la adición de un agente gelificante) ó líquidos (sin la adición de los mismos).

3.4.1 Medio sólido

Medio sólido es todo aquel que contiene un agente gelificante. La firmeza del medio depende principalmente de tres factores:

pH: Es necesario establecerlo de 3,5 - 4,0 como mínimo para que el gelificante actúe; siendo menor de 3,5 el medio se puede licuar. Hay que tener en cuenta que después del autoclave el pH baja en promedio medio punto y que sigue bajando durante el cultivo (Selby et al., 1989).

Composición química del medio: Algunos gelificantes (v.g. Gelrite) solidifican en presencia de cationes divalentes, por lo que si el medio a utilizar es bajo en sales puede resultar conveniente añadir una cierta concentración de un catión divalente (Ca^{2+} , Mg^{2+}).

Concentración: Para el caso del agar es de 0.6–0.8 %. Si se utiliza una concentración baja (0.4%), el medio nutritivo permanece sin cuajar, sobre todo cuando el pH es bajo. Si la concentración es muy alta (1.0 %), el medio de cultivo queda muy sólido, haciendo difícil la inoculación, pudiendo afectar también el crecimiento *in vitro* cuando la concentración es demasiada alta. Si se utiliza una concentración del 0.6% y el medio no adquiere rigidez, debe corregirse el pH (Pierik, 1990).

Selby y Harvey (1989) estudiaron el efecto de la rigidez del medio en el cultivo de *Picea sitchensis*, combinando distintas concentraciones de agar (5.0, 7.5, 10.0 y 12.5 g·L⁻¹) con distintos valores de pH (4.0, 4.5, 5.0, 5.5 y 6.0), determinando que a partir de 7.5 g·L⁻¹ de concentración de agar decrece significativamente la formación de brotes siguiendo la misma tendencia conforme aumenta la concentración, además de afectar el tejido, aumentando el porcentaje de necrosis en el mismo. Teniendo en el pH a 4.5, 5.0 y 5.5 la mejor inducción y elongación de los brotes, con la concentración a 7.5 y 10.0 g·l⁻¹ de agar.

Los gelificantes más usados en el cultivo *in vitro* son:

Agar: Es una mezcla de polisacáridos extraídos de ciertas especies de algas marinas particularmente de los géneros *Gellidium*, *Gracilaria*, *Pterocladia*, siendo la agarosa la forma más pura (Nairn et al., 1995). Ésta presenta una elevada masa molecular, tiene la capacidad de hidratarse y formar una red, adquiriendo la estructura de un gel. La planta no puede digerirlo ni adsorberlo, además no interactúa con los componentes

nutritivos; sin embargo, la pureza y la concentración modifican el potencial osmótico del medio, alterando la disponibilidad y asimilación de los elementos afectando la proliferación de brotes (Brand et al., 1993; Urbina, 1996; González, 2001). El agar se funde a altas temperaturas (100 °C), solidifica alrededor de los 40 °C y no se degrada con la luz. Generalmente se utiliza a una concentración de 0.6 - 1%.

Gelrite: Es un heteropolisacárido aniónico natural producido por una bacteria, que forma geles semejantes al agar, quebradizos y rígidos, en presencia de sales solubles. El gelrite es un compuesto del ácido glucurónico, ramnosa, glucosa y residuos O-acetil.

Se puede usar a una concentración de 0.15–0.30 %; aunque en algunas especies la presencia de este tipo de agente gelificante provoca altos niveles de vitrificación, como lo mencionaron (Turner et al, 1990), que al emplear concentraciones de 0.1 a 0.4 % de gelrite en el medio para la proliferación de brotes de pera, el 100 % presentó problemas de vitrificación (hiperhidratación). El gel de gelrite es notablemente más claro que el de agar, y también cuaja más rápidamente. El costo del gelrite es mayor que el del agar.

Existen alternativas al agar para casos muy específicos de cultivo dentro de estos están: Polimeros sintéticos como el Biogel (píldoras de poliacrilamida). Alginatos, para el cultivo de protoplastos y polímero de almidón (Pierik, 1990).

3.4.2 Medio líquido

Medio líquido es aquel en el que la solución de nutrimentos y reguladores no se encuentra en una matriz solidificada por la adición de ningún agente gelificante.

El uso de medio líquido ofrece las siguientes ventajas e inconvenientes respecto al uso de medio sólido:

- Puede facilitar la absorción de nutrimentos por parte del explante.
- Es más fácil la manipulación para cambiar medios (no en todos los casos).
- Cualquier exudado de la planta se diluye con mayor facilidad.
- Se puede utilizar como medio puente para agregar algún compuesto en una determinada etapa del cultivo en medio sólido.
- Existen algunas especies que presentan diferencias de crecimiento en medio líquido.
- Si resulta posible el cultivo en medio líquido, se debe considerar el problema de la aireación. Se puede cultivar el explante parcialmente sumergido, y si se necesita una inmersión total se debe utilizar un agitador ó la utilización de material de soporte para evitar que el explante quede totalmente inmerso en el medio de cultivo.

En muchas especies se ha demostrado una respuesta favorable por parte de los explantes en su desarrollo, en gran medida por la utilización de un medio líquido,

como lo demostraron Lee et al., (1986) al evaluar el efecto de brotes adventicios en medio líquido y agar, obteniendo diferencias notables en el porcentaje de enraizamiento. Altos porcentajes (94%) de formación de raíces en medio líquido mientras en el medio solidificado con agar fue menor (46%).

En la década de los 90's el uso de los medios llamados de doble fase, se hizo bastante habitual; se trata de una fase sólida y otra líquida, en las cuales se combina una alta tasa de multiplicación con una más baja sensibilidad a la vitrificación (Pierik, 1990).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

3.4.3 Sales inorgánicas

Los elementos minerales son muy importantes para la vida de las plantas ya que proporcionan los nutrimentos esenciales. Por ejemplo: el magnesio es parte de la molécula de clorofila, el calcio es constituyente de la pared celular, el nitrógeno forma parte de aminoácidos, vitaminas, proteínas y ácidos nucleicos. En forma similar, el hierro, zinc y molibdeno son parte de ciertas enzimas. Además del C, H y O se conocen otros 14 elementos esenciales para el crecimiento de la planta: nitrógeno, fósforo, azufre, calcio, potasio, magnesio, hierro, manganeso, cobre, zinc, boro, níquel, cloro y molibdeno. Los 6 primeros son requeridos en cantidades relativamente grandes y se los conoce como macroelementos, los 8 últimos son requeridos en cantidades pequeñas (<de $0,5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) y se les denomina microelementos.

Durante todas las fases de la organogénesis el explante debe satisfacer sus requerimientos nutrimentales, por lo que las sales minerales del medio de cultivo son importantes (Villavicencio, 1998).

Cuando se elige una mezcla de macro y micro sales, se deben tener en cuenta los siguientes aspectos:

1. La concentración total de sales puede ser importante. Existen medios "ricos" en sales (v.g. MS) y medios "pobres" en sales (v.g. White).

2. La forma más frecuente de añadir nitrógeno (N) es en forma de iones NH_4^+ y NO_3^- . Las necesidades totales de N, varían entre 12 - 60 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, de los cuales le corresponden de 6 a 20 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ al NH_4^+ y 6 a 40 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ al NO_3^- . La mayor parte de las plantas prefieren el NO_3^- al NH_4^+ (Pierik, 1990).

En el medio generalmente se utilizan dos fuentes de nitrógeno (NH_4^+ y NO_3^-), el NH_4^+ es asimilado primero y luego de que este es transformado a nitrógeno orgánico se asimila el NO_3^- . Altas concentraciones de ambos nutrimentos pueden generar toxicidad en las células; es decir, el NH_4^+ puede disminuir el pH del medio, mientras concentraciones de NO_3^- aumentarlo, originando una deficiente asimilación de otros nutrimentos que se traducen en anomalías del tejido como tallos múltiples, generación de callo y sobrehidratación. Afectando con esto, la calidad y número de brotes, por lo que es necesario estudiar su efecto en la especie de interés (Villegas, 1990).

Villegas (1990) evaluó el efecto nutrimental en vid concluyendo que la relación $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ influye de forma importante en el desarrollo y calidad del explante, ya que una concentración de 10.4 mM de N - NO_3^- genera un reducido número de brotes por explante, mientras que 10 mM de N - NH_4^+ incrementan en número y calidad de los brotes, los cuales pueden seguirse multiplicando.

Abu-Qaoud et al., (1991) valoraron la influencia nutrimental del medio especialmente del nitrógeno en diferentes proporciones de $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ en la formación de brotes adventicios en dos cultivares de pera (*Pyrus cummunis*) a partir de explantes de hojas. En un primer experimento evaluaron el efecto de los medios MS al 50 y 100 % (Murashige y Skoog, 1962), LP (Quoirin y Lepoivre, 1977), NN (Nitsch y Nitsch, 1969); y WH (White, 1943), en la regeneración de brotes. Encontrando mejores resultados en NN y MS al 50% para ambos cultivares. Hallando además, que en el medio WH se presentó el mínimo desarrollo de brotes, atribuido a su baja concentración de nitrógeno. En un segundo experimento, utilizaron el medio base MS al 50% y WH adicionado con 10 mM de NO_3NH_4 observando en este último un incremento significativo en la formación de brotes. Teniendo como base lo anterior estudiaron el efecto de distintas proporciones de $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ (1:0, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 7:1) utilizando como medio base el NN. Determinando que las proporciones 2:1, 3:1, 4:1 presentan los máximos porcentajes de regeneración.

Gavidia y Pérez Bermúdez (1997), en la propagación *in vitro* de *Digitalis obscura*, estudiaron la influencia de la fuente y concentración de nitrógeno. Utilizaron un medio base MS modificado al 100, 50, 25% en macro y micro sales, variando las fuentes nitrogenadas (KNO_3 , NaNO_3 , NO_3NH_4 y NH_4Cl). Mostrando la mayor tasa de proliferación de brotes cuando se utilizó el medio MS al 100% con 18.8mM de KNO_3 y 20.6 mM de NO_3NH_4 (proporción 2:1) y en un medio MS al 100% con 18.8 mM de KNO_3 y 29.2 mM de NaNO_3 (proporción 4:1). Demostrando que tanto la proporción

$\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ como la concentración total de iones influyen en la respuesta morfológica de los explantes.

El efecto nutrimental principalmente la relación $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ se ha evaluado en diferentes especies, en los cuales se ha demostrado que influye de forma determinante en el desarrollo y calidad de los brotes, como se puede revisar en los trabajos de: Fasolo et al., (1989); Lillo (1989); Leblay et al., (1991); Niedtz (1994); Bon et al., (1998); Cruz-Pizarro (2000); entre otros.

3.4.4 Carbohidratos

Los carbohidratos son uno de los elementos más importantes del medio del cultivo. Normalmente para el cultivo *in vitro* de células, tejidos u órganos es necesario adicionar una fuente de carbono en el medio, debido a que el crecimiento *in vitro* tiene lugar en condiciones poco apropiadas para la fotosíntesis o incluso en oscuridad donde el tejido verde que puedan tener no es suficientemente autotrófico (Pierik, 1990).

Distintos trabajos han demostrado que los carbohidratos en el medio de cultivo no solo desempeñan una función nutritiva, si no que también ejerce un efecto importante sobre la morfogénesis a través de sus propiedades osmóticas. Se han demostrado que el 75 % de la concentración óptima de sacarosa es utilizada como fuente de carbono y energía, mientras el resto desempeña un papel osmótico en la inducción.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Se sabe que los potenciales osmóticos alteran las propiedades físicas de las membranas celulares (lo que podría causar cambios en los receptores hormonales, balances iónicos u hormonales y actividades de las ATPasas) y modulan la actividad mitocondrial, lo cual puede afectar a la respuesta morfológica de los explantes (Thompson y Thorpe, 1987).

Los carbohidratos se clasifican en dos grupos: los llamados estructurales como lo son: la lignina, celulosa y hemicelulosa; y los compuestos no estructurales como los monosacáridos libres (glucosa, fructuosa y xilosa) y otros polisacáridos de reserva (fructosa y almidón). A los carbohidratos no estructurales también denominados solubles en agua o de reserva.

La sacarosa (un disacárido) es la más utilizada para propósitos de micropropagación. Generalmente se usan concentraciones de 1-6 % de sacarosa en el medio, aquí es convertida rápidamente en glucosa y fructosa; la glucosa es la que primero se utiliza seguida de la fructosa. El azúcar blanco refinado que se vende en los supermercados puede resultar adecuado para la micropropagación en muchos casos. Se trata de un producto purificado y de acuerdo con los análisis se compone de 99.94 % de sacarosa, 0.02 % de agua y 0.04 % de otras sustancias (no hay indicaciones de que estos últimos constituyentes puedan causar toxicidad *in vitro*).

La adición de sacarosa resulta esencial para el desarrollo y crecimiento de las plántulas *in vitro* no solo por ser la principal fuente energía durante esta fase, si no además permite que los tejidos almacenen carbohidratos suficientes para su utilización en la fase de aclimatación, incrementando la supervivencia y adaptación de las plantas.

Fila, et al., (1998) encontraron que al incrementar la concentración de sacarosa durante la fase de cultivo *in vitro* favorece la aclimatación de las plantas obtenidas. Supone que al aumentar la producción de biomasa en la fase *in vitro*, esta persiste después del trasplante.

Rangel (2002) realizó un estudio de multiplicación y aclimatación de *Gladiolus sp.* en el cual encontró que las altas concentraciones de sacarosa en el medio de cultivo disminuye el crecimiento de nuevos órganos durante la fase *in vitro*, pero lo incrementan en la fase de aclimatación; favoreciéndose la adaptación a concentraciones de 9 %, mientras el crecimiento y multiplicación de cormillos *in vitro*, el mejor resultado se da a concentraciones de 6 %.

3.4.5 Sustancias orgánicas

Vitaminas.

La mayor parte de las plantas sintetizan casi todas las vitaminas esenciales, pero aparentemente lo hacen en cantidades infraóptimas. Para lograr un buen crecimiento es a menudo necesario suplementar al medio con una o más vitaminas, siendo las del complejo B las más utilizadas, dentro de estas la tiamina (B1) considerándola un ingrediente esencial. Otras vitaminas también han demostrado tener un efecto positivo en el crecimiento *in vitro*, como son: piridoxina (B6), ácido nicotínico (B3), pantotenato cálcico (B5).

Aminoácidos.

Aunque las células cultivadas son capaces de sintetizar todos los aminoácidos necesarios, la adición de L-glutamina (2-8 mM) o una mezcla de aminoácidos es a menudo beneficiosa. Esto es particularmente importante en cultivo de células y protoplastos.

3.4.6 Reguladores de crecimiento

Existen cinco grupos principales de reguladores de crecimiento: Auxinas, Giberelinas, Citocininas, Ácido abscisico y Etileno, manteniendo cada grupo respuestas fisiológicas diferentes. Sin embargo, Azcon- Bieto y Talón (1993) mencionaron que existen otros

grupos de sustancias reguladoras del crecimiento, que ejercen una influencia similar a las hormonas vegetales en muchas funciones de las plantas, como son: Brasinoesteroides, Poliaminas y Oligosacarinas; donde solo las dos últimas han sido utilizadas en algunos casos como moduladores en la morfogénesis *in vitro*. (Bagni y Torrigiani, 1992)

Schildknecht (1984) sugirió que las Turgorinas forman parte de una nueva clase de hormonas vegetales.

Mok et al., (1982) descubrieron que un derivado de las Fenilureas (N,N'- difenilurea) presenta una actividad tipo citocinina. Siendo los compuestos más activos las piridil-ureas y las diazol-ureas (Thidiazuron y derivados).

Davies (1995) incluye dentro del grupo de hormonas vegetales al Ácido Jasmonico y el Ácido Salicilico por ser componentes potenciales en la regulación de distintos procesos como: germinación de semillas, promotores de senescencia, abscisión, formación de tubérculos, raleo de frutos, formación de pigmentos, síntesis de proteinasas en el caso ácido jasmonico. El ácido salicilico tiene influencia en la termogénesis, longevidad de flores, germinación de semillas e inhibición de la biosíntesis del etileno.

En el cultivo *in vitro*, adicionalmente a los nutrimentos, es necesario agregar una o más sustancias reguladoras; frecuentemente auxinas y/o citocininas, y ocasionalmente giberelinas o ácido abscísico, para orientar una vía específica de organogénesis (caulogénesis ó rizogénesis) por vía indirecta ó directa. Por otro lado, los requerimientos y las respuestas a estas sustancias varían considerablemente con los tipos de tejidos y los niveles endógenos de estos reguladores, así como con la finalidad del cultivo *in vitro*.

La manipulación de las concentraciones de auxinas y citocininas en los medios de cultivo permite controlar organogénesis *in vitro* de muchas especies vegetales, constituyendo además la base de gran parte de los protocolos de micropropagación (propagación vegetativa *in vitro*) existentes en la actualidad (Debergh y Zimmerman, 1991).

Las tres clases restantes de hormonas (giberelinas, etileno y ácido abscísico) no son esenciales para la inducción de órganos, pero actúan como moduladores de la respuesta morfológica (Ammirato, 1986).

Auxinas

Se relacionan con la extensión y alargamiento de las células, tropismo, dominancia apical, abscisión, diferenciación del tejido vascular, abscisión de frutos y hojas, enraizamiento, promoción de la floración y la promoción de la biosíntesis del etileno

(Leszek, 1989; Davies, 1995). En cultivo *in vitro* las auxinas son utilizadas principalmente para la inducción de raíces, la formación y desarrollo de callo. Las auxinas más utilizadas son: AIB (ácido indol-3-butírico), ANA (ácido naftalenacético), AIA (ácido indolacético) y 2,4-D (ácido diclorofenoxiacético). El AIB y el ANA son usados frecuentemente para el enraizamiento. El 2,4-D es muy efectivo para la inducción de callos. Las auxinas se disuelven usualmente en etanol diluido o en una solución de hidróxido de sodio.

Citocininas

Salisbury y Ross (1994) definen a las citocininas como compuestos derivados de la adenina que promueven la división celular en algunos tejidos vegetales, inhibición de la dominancia apical mediante la formación y desarrollo de brotes ya sea de origen lateral ó adventicio, diferenciación de tallos, expansión de hoja, desarrollo de cloroplastos y otros. Existen diferentes tipos de Citocininas que se encuentran con más frecuencia en varias plantas: zeatina, dihidrozetina, isopentil adenina (IPA), furfuryl-aminopurina kinetina (KIN) y una citocinina sintética, la benciladenina (BA) Leszek (1989).

En los medios para cultivo *in vitro* se incorporan citocininas para promover el desarrollo de brotes ya sea de origen lateral ó adventicio. Además se usan estos compuestos para la proliferación de tallos axilares por la ruptura de la dominancia apical.

Las citocininas más usadas son: benciladenina (BA), Kinetina y 2-ip (Isopentenil-adenina). Generalmente son diluidas con ácido clorhídrico o hidróxido de sodio.

Mok et al., (1982), determinaron que el thidiazuron (TDZ, N-phenyl-N'-1,2,3-thidiazol-5-ylurea), es una sustancia derivada de la fenilurea con actividad citocinínica comparable con las citocininas más activas del tipo de las adeninas.

Esta sustancia fue liberada como defoliante en el cultivo de algodón (*Gosypium hirsutum* L.) y recientemente ha recibido considerable atención como una sustancia que puede regular el crecimiento en los sistemas de propagación *in vitro* y como un estimulador efectivo para el desarrollo de brotes adventicios y embriones somáticos en orquideas epifitas *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw., *Dendrobium aphyllum* (Roxb.) Fisch., *Dendrobium moschatum* (Buch-Ham) Sw., (Ranjan et al., 1997) y una amplia variedad de plantas (Huetteman y Preece, 1993).

Giberelinas

Existen un gran número de giberelinas conocidas. La de mayor uso es el AG₃, pero debe tenerse en cuenta que es muy termolábil (pierde el 90% de su actividad después del autoclave). Comparado con las auxinas y citocininas, las giberelinas se utilizan raramente. La mayoría de los explantes sintetizan cantidades suficientes de este grupo de hormonas.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Cuando se aportan giberelinas al medio de cultivo, su función principal es el alargamiento de las regiones sub apicales. El AG_3 es soluble en agua fría hasta $1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

Adicionalmente se puede utilizar ácido abscísico. El ABA en la mayor parte de los casos produce un efecto negativo en los cultivos *in vitro*, pero en determinados casos promueve la maduración de embriones, y en cultivos de células en suspensión facilita la sincronización de la división celular.

3.4.7 pH

Cuando se prepara un medio de cultivo, después de añadir todos sus componentes, se procede a ajustar el pH final al valor deseado, añadiendo NaOH 0.1 N o HCl 0.1 N al medio. Una vez ajustado el pH se procede a esterilizar el medio.

Villalobos (1985) y Pierik (1990) mencionaron que el pH final del medio de cultivo es un factor importante por diversas razones:

- Afecta la solidificación de los agentes gelificantes.
- El valor del pH puede afectar a la solubilidad de algunos componentes del medio de cultivo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- El valor del pH puede afectar a la absorción de determinados nutrientes por parte del explante (p.e. la absorción de iones NO_3^- aumenta con la acidez del medio).
- El valor del pH del medio puede afectar al pH del citoplasma y como consecuencia a la actividad de muchas enzimas.

Por todas estas razones conviene optimizar el pH del medio para cada caso en concreto. En general, no obstante, en la mayoría de situaciones se trabaja a pH entre 5.2 y 5.8.

Una vez ajustado el pH del medio, este sufrirá una ligera disminución del pH durante el proceso de esterilización en autoclave, para, después, evolucionar nuevamente durante el cultivo, de forma que habitualmente se irá acidificando progresivamente como resultado de la absorción diferencial de algunos componentes del medio de cultivo, así como de la excreción de exudados por parte del explante (Selby et al., 1989).

El control del pH inicial del medio y de su dinámica durante el cultivo tiene una gran importancia en el desarrollo de cualquier proyecto de cultivo *in vitro*. A pesar de su importancia, en muchos experimentos este control se limita a fijar su valor inicial sin reparar en los posibles efectos de su dinámica.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

IV. MATERIALES Y MÉTODOS.

Ubicación del experimento.

Los trabajos se llevaron a cabo en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales de la carrera de Ingeniería Agrícola de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán UNAM campo cuatro, ubicada en el municipio de Cuautitlán Izcalli Estado de México.

Material vegetativo

Se utilizaron como explantes brotes de hijuelos de rizoma de *Agave tequilana* Weber cv. Azul de una longitud de 2 - 2.5 cm, obtenidos previamente *in vitro*.

4.1 Evaluación de medios

Preparación de medios de cultivo.

Se tomó como base la concentración de sales propuesta por los medios: MS Murashige y Skoog (1962), WPM (Woody Plant Medium) McCown & Lloyd (1980), Cruz-Pizarro (2002) (Cuadro 3 y 4).

Se manejó la concentración de vitaminas y reguladores de crecimiento del medio Cruz- Pizarro (2000), para todos los medios (Cuadro 3).

Cuadro 3. Concentraciones de los medios MS, WPM Y Cruz-Pizarro.

COMPUESTO QUÍMICO	Sales minerales por medio de cultivo mg·L ⁻¹			
	MS 100%	MS 50%	WPM	Cruz-Pizarro
NH ₄ NO ₃	1650	825	400	200
KNO ₃	1900	950	0.0	1010
Ca(NO ₃) ₂ • 4H ₂ O	0.0	0.0	556	295
CaCl ₂ • 2H ₂ O	440	220	96	0.0
KH ₂ PO ₄	170	85	170	170
MgSO ₄ • 7 H ₂ O	370	185	370	369
Fe SO ₄ • 7 H ₂ O	27.8	13.9	27.8	25
Na - Edta	37.3	18.65	37.3	38
Mn SO ₄ • H ₂ O	16.9	8.45	22.3	0.84
K ₂ SO ₄	0.0	0.0	990	0.0
KI	0.83	0.415	0.0	0.0
H ₃ BO ₃	6.2	3.1	6.2	6.1
Na ₂ MoO ₄ • 2 H ₂ O	0.25	0.125	0.025	0.24
Zn SO ₄ • 7 H ₂ O	8.6	4.3	8.6	8.6
Cu SO ₄ • 5 H ₂ O	0.025	0.0125	0.025	0.0000249
CoCl ₂ • 6 H ₂ O	0.025	0.0125	0.0	0.0000238
Mio-inositol	100	100	100	100
Tiamina. HCl	0.1	0.1	0.1	0.1
Piridoxina. HCl	0.5	0.5	0.5	0.5
Ácido nicotínico	0.5	0.5	0.5	0.5
AIB	0.1	0.1	0.1	0.1
BA *	0.5	0.5	0.5	0.5
TDZ *				
KIN *				
Sacarosa	30000	30000	30000	30000
Agar	6000	6000	6000	6000

En todos los casos el pH se ajustó a 5.7

* Para la evaluación de citocininas las concentraciones variaron conforme a los tratamientos propuestos

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Cuadro 4 . Concentración de iones de los medios MS, WPM y Cruz-Pizarro.

CANTIDAD DE IONES EN mM.L⁻¹				
	MS 100 %	MS 50 %	WPM	CRUZ-PIZARRO
N TOTAL	60.0430	30.0215	12.3550	11.2500
NH₄⁺	20.6250	10.3125	5.0000	2.5000
NO₃⁻	39.4180	19.7090	7.3550	8.7500
H₂PO₄⁻	1.2490	0.6245	1.2490	1.2500
K⁺	20.0470	10.0235	6.9300	6.2500
Ca²⁺	2.9930	1.4965	3.0080	1.2500
Mg²⁺	1.5020	0.7510	1.5020	1.5000
SO₄⁻²	1.7321	0.8661	7.4451	1.6300
Na⁺	0.0020	0.0010	0.0001	0.0010
Cl⁻	5.9862	2.9931	0.6530	0.0001
BO₃⁻	0.1000	0.0500	0.1000	0.1000
Mn⁻	0.1000	0.0500	0.1320	0.0050
MoO₄	0.0010	0.0005	0.0001	0.0010
Fe⁺²	0.1000	0.0500	0.1000	0.0900
Zn⁺²	0.0300	0.0150	0.0300	0.0300
Cu⁺²	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
Co⁺²	0.0001	0.0001	0.0000	0.0001
I⁺	0.0050	0.0025	0.0000	0.0000
TOTAL	93.8905	46.94525	33.5044	23.3573

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Diseño experimental

En un primer experimento donde se evaluaron 4 medios de cultivo se utilizó un diseño completo al azar con cuatro tratamientos y cinco repeticiones, teniendo un total de 20 unidades experimentales; cada unidad experimental (U. E.) estuvo formada por siete explantes.

Cuadro 5. Tratamientos Evaluación de medios

T. 1	MEDIO MS. 100 %
T. 2	MEDIO MS. 50 %
T. 3	MEDIO WPM
T. 4	MEDIO CRUZ- PIZARRO

Variables de estudio.

Número de brotes.

Se inició a medir los brotes formados en el explante cuando alcanzaban 2 mm de longitud una vez establecidos en la cámara de cultivo hasta la terminación del experimento.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Longitud de brotes.

Las mediciones se llevaron a cabo con un calibrador o vernier, tomando la longitud desde la base del brote hasta la parte terminal del mismo; iniciando la medición a las dos semanas de su establecimiento. se realizaron una vez por semana.

4.2 Evaluación de citocininas

Para el segundo experimento donde se evaluaron distintas fuentes citocinínicas se utilizó el medio base propuesto por Cruz-Pizarro (2000).

Una vez preparados los medios, el pH se ajustó a 5.7, colocando en cada tubo de ensaye 10 ml de medio. Terminado el llenado y sellado de tubos, se procedió a esterilizarlos en una autoclave a una temperatura de 120 ° C a (15 lb•in⁻²) durante 30 minutos.

Diseño experimental

Para el segundo experimento, se estudiaron tres fuentes citocinínicas, en tres concentraciones con una concentración constante de AIB; se utilizó un diseño completamente aleatorio con arreglo factorial 3 x 3, con 9 tratamientos, cuatro repeticiones obteniendo un total de 36 unidades experimentales, considerando 4 explantes como U.E. (Cuadro 6).

Variables de estudio

Número de brotes

Esta variable se empezó a medir inmediatamente 5 días después de establecer el experimento.

Longitud de brotes

Se inició a medir dos semanas después de haber realizado la siembra, utilizando un calibrador se registra la longitud de cada uno de los brotes de todos los explantes.

Cuadro 6. Tratamientos Evaluación de citocininas

	Kinetina μ M	Benciladenina μ M	Thidiazuron μ M	Acido indol- butirico μ M	Proporción aproximada citocinina : auxina
T1	2.32	0	0	0.44	5:1
T2	4.60	0	0	0.44	10:1
T3	6.90	0	0	0.44	15:1
T4	0	2.32	0	0.44	5:1
T5	0	4.60	0	0.44	10:1
T6	0	6.90	0	0.44	15:1
T7	0	0	2.32	0.44	5:1
T8	0	0	4.60	0.44	10:1
T9	0	0	6.90	0.44	15:1

Implantación o siembra

La siembra se realizó bajo condiciones de asepsia, dentro de una campana de aire de flujo laminar horizontal, reduciendo al máximo la presencia de patógenos presentes en el aire, desinfectado mediante inmersión en alcohol etílico y flameado bisturis, pinzas y cajas de petri.

Condiciones de incubación.

Posteriormente, al término de la inoculación, se colocaron los explantes en el cuarto de cultivo, donde se mantuvieron a una temperatura de $27^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, un fotoperíodo de 16 horas luz a una intensidad de $47 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{seg}^{-1}$

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Evaluación de medios de cultivo

Número de brotes

El inicio del desarrollo de brotes ocurrió a los siete días del establecimiento, ubicándose la formación en la base del explante (brotes adventicios), presentando a lo largo de 35 días un comportamiento constante en el proceso morfogénico en los cuatro tratamientos, teniendo en todo el periodo de cultivo un crecimiento progresivo en todos los medios.

Se tuvo un promedio general de 5.9 brotes por explante, mostrándose siempre superior el medio Cruz-Pizarro (2000) con 7.8 brotes/explante (Figura 3), siendo 33% mayor a la media general y estando hasta 100% más que el promedio obtenido por el medio MS 50 %, con un número de 3.9 brotes por explante (Cuadro 7). Estadísticamente las diferencias observadas no resultaron significativas al nivel de significancia de $P=0.05$ (Anexo, Tabla 1). La comparación de los promedios obtenidos permite determinar que existe un mayor desarrollo de brotes en el medio Cruz-Pizarro (2000) para la variable número de brotes.

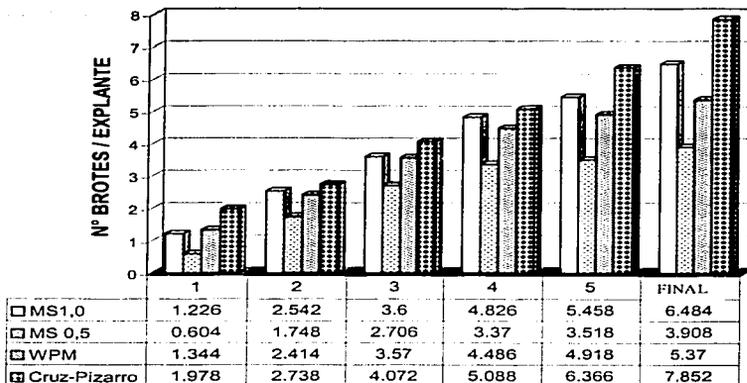
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Cuadro 7 . Comparación de medias para las variables número y longitud de brotes de *Agave tequilana* Weber cv. Azul obtenidas en diferentes medios de cultivo.

TRATAMIENTOS	Número Promedio	Longitud Promedio
MS 1.0	6.5 a	18.76 a
MS 0.5	3.9 b	20.88 a
WPM	5.4 a	17.74 a
CRUZ- PIZARRO	7.9 a ^z	15.46 b
Promedio general	5.9	18.2

^z. Valores con la misma letra dentro de columnas son estadísticamente iguales. Prueba Tukey P 0.05

Figura 3. Número de brotes promedio por explante de *Agave tequilana* Weber cv. Azul obtenidos en cuatro medios de cultivo durante 6 evaluaciones semanales.



TESIS CON
SELLA DE ORIGEN

La variación que se observa en el número de brotes por tratamiento puede atribuirse, entre otros factores, a la concentración de sales, específicamente a la relación $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$, teniendo que la mejor respuesta se observa en la mayor relación 3.5:1 presente en el medio Cruz-Pizarro (2000).

Se observa en la (Figura 4) que en la respuesta organogénica que presentan los explantes pudiera influenciar la concentración de nitrógeno y en especial la relación que guarda el NO_3^- con respecto al NH_4^+ pero también se manifiesta la influencia de la interacción con otros elementos como el Ca, Mg, K y Cl; pudiendo explicar en el caso del medio MS al 50% donde se mantiene la misma relación 2:1 de $\text{NO}_3^- : \text{NH}_4^+$ que el MS al 100 % pero la concentración de sales es diferente lo que afecta el número de brotes obtenidos.

Si bien el nutrimento más importante en el desarrollo *in vitro* es el nitrógeno, NO_3^- y NH_4^+ ambos promueven el crecimiento de brotes, en este caso la presencia de otros elementos como el Ca, Mg y K (cationes monovalentes y divalentes) en el medio puede influir la respuesta morfológica, tanto por la concentración iónica total resultante como el tipo de elemento proporcionado; coincidiendo con Hinnen et al., (1989) donde cada elemento en el medio puede influenciar el crecimiento de manera diversa.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

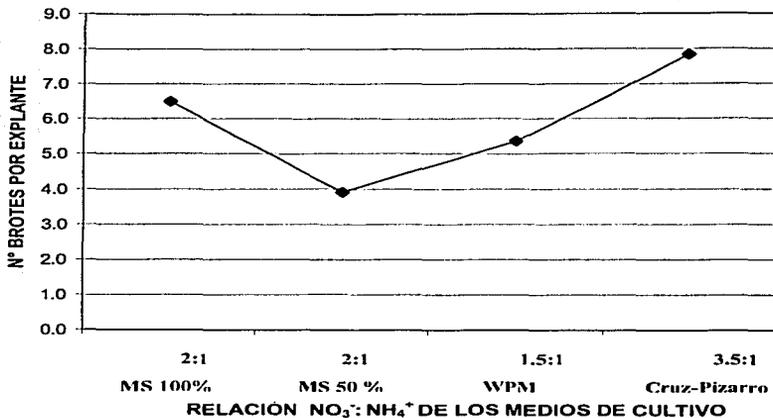
La relación $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ puede regular la organogénesis, lo afirmaron Robert et al., (1987) en la propagación de *Agave fourcroydes* Lem.; para este caso del agave tequilero no se muestra de forma determinante, pero su influencia queda de manifiesto al existir diferencias en la formación de brotes.

Con estos resultados se observa que hay una respuesta morfológica de los explantes similar en todos los medios, suponiendo con ello que la concentración de minerales no es un factor determinante en la fase de inducción durante la formación de brotes y que es necesario evaluar la acción de los reguladores de crecimiento, además de otros factores en el proceso organogenético de esta especie. Aunque Villavicencio (1998) menciona que el explante debe satisfacer sus requerimientos nutrimentales durante las fases de desdiferenciación – inducción – diferenciación por lo que la concentración de minerales del medio es importante en la morfogénesis.

Existen diversos trabajos del cultivo *in vitro* en otras especies donde factores como la intensidad de luz, niveles de sacarosa, temperatura y la concentración de sales influyen en la formación de brotes.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 4. Efecto de la concentración de sales, relación $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ en la formación de brotes en explantes de *Agave tequilana* Weber cv. azul.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Longitud de brotes.

Al término de 35 días de evaluación el promedio general para la variable longitud de brote fue de 18.21 mm, obteniendo el valor máximo al emplear el medio MS al 50% de su concentración con 20.88 mm, inversamente a lo sucedido con la variable número de brotes, el medio Cruz-Pizarro (2000) se ubica con el promedio más bajo con 15.46 mm, 26% menor al medio MS 50%, los medios WPM y MS 100% se encontraron 15 y 10% por abajo del valor más alto con 17.74 y 18.76 mm respectivamente (Cuadro 7, Figura 5).

El análisis estadístico muestra diferencias significativas al nivel de significancia $P=0.05$ en los medios utilizados (Anexo, Tabla 2).

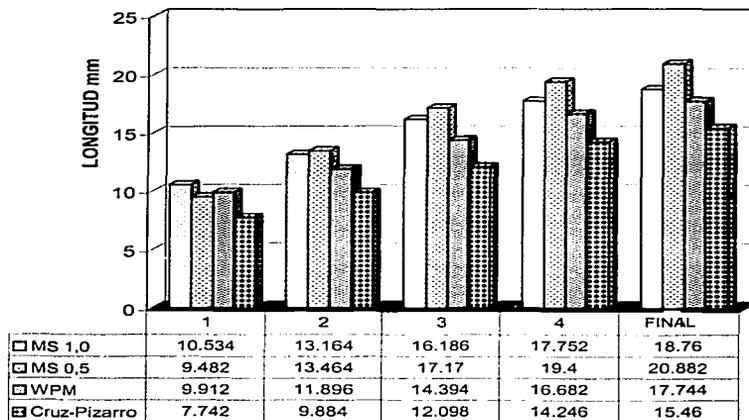
Se observó entre los tratamientos que presentaron mayor número de brotes su longitud promedio disminuyó, de esta manera se tiene que existe una relación entre la fuente y demanda de los órganos que al incrementarse estos, es decir mayor número de brotes el crecimiento longitudinal de los brotes disminuyó. Lo cual puede estar asociado a aspectos de la dominancia apical y vigor, de tal forma que un mayor número de brotes originó una menor longitud y cuando el número de brotes formados es menor, la longitud de los mismos se incrementó.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Soumendra et al., (1999), mencionaron que la concentración de nutrimentos influyó en el crecimiento longitudinal de los brotes. Por esta razón, medios con altos niveles de sales como el MS 100% pueden favorecer un mayor crecimiento de los explantes.

Dado los resultados se atribuye que las diferencias observadas en el crecimiento se deben fundamentalmente a las diferencias en la composición de los medios teniendo de manera general un equilibrio entre la longitud y el número de brotes; lo cual permite saber que al tener mayor número de brotes se afecta la longitud de los mismos (Cuadro 7, Figura. 5).

Figura 5. Longitud promedio de brotes de *Agave tequilana* Weber cv. Azul obtenidos en diferentes medios de cultivo durante 5 evaluaciones semanales.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

5.2 Tipo y concentración de hormonas

Número de brotes.

El análisis para el tipo y concentración de citocininas muestra diferencias estadísticas significativas al nivel $P = 0.05$ (Anexo, Tabla 3), mostrándose durante 35 días de cultivo un comportamiento constante en la formación de brotes en la mayoría de los tratamientos.

Obteniéndose un promedio general fue de 4.5 brotes / explante, en todo momento se encontró superior el tratamiento con TDZ teniendo una mejor respuesta con respecto a la fuente de citocinina empleada en la concentración de 4.60 μM alcanzando un promedio de 16.4 brotes por explante, 11.9 brotes (264 %) por arriba del promedio general (Cuadro 8, Figura 6). La tasa de proliferación más baja la presentaron los tratamientos BA 2.32 μM y BA 4.60 μM con solo 0.4 y 0.9 brotes por explante respectivamente.

Queda de manifiesto la superioridad de el efecto inductivo del TDZ con respecto al de BA, similar a lo encontrado por Atta-Alla y Van (1997) en otra agavececa como la Yuca donde en concentraciones de TDZ 200 y 400 % menores a las de BA se observaron mejores resultados.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La mayor actividad como citocinina del TDZ ha sido probada en distintas especies, mostrando una respuesta similar y consistente que se puede revisar en los trabajos de: Fiola et al., (1990); Gribaundo y Fronda, (1991); Ahroni et al., (1997); Graham et al., (1997); Nayak et al., (1997); Kim et al., (1997); Cuenca et al., (2000); Jeong et al., (2001); Sandal et al., (2001) y Tiwari et al., (2001).

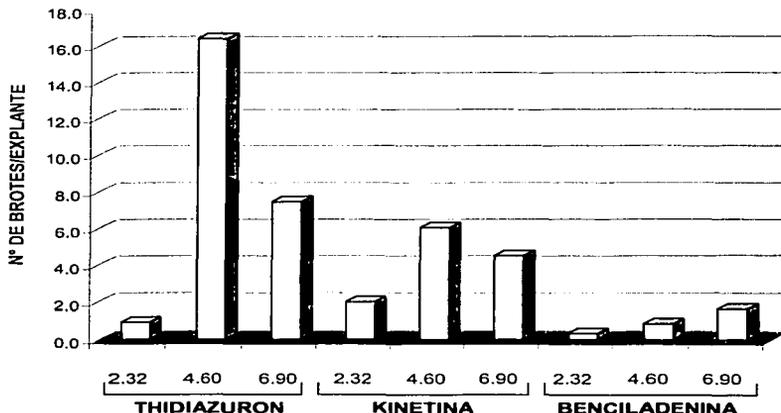
El efecto inductivo de Kinetina a 2.32 μM , fue superior 200 % al de BA a la concentración 4.60 μM , pero similar al de BA 6.90 μM con 1.7 brotes promedio. El mayor resultado en kinetina se presenta en la concentración media (4.60 μM) con 6.1 brotes por explante, (Cuadro 8).

Cuadro 8. No. Promedio de brotes por explante de *Agave tequilana* Weber cv. Azul obtenidos en diferentes fuentes citocinínicas en tres concentraciones.

Fuente Citocinínica	Concentración	2.32 μM	4.60 μM	6.90 μM	Promedio fuente citocinínica
TDZ		1.0	16.4	7.5	8.3
KIN		2.0	6.1	4.5	4.2
BA		0.4	0.9	1.7	1.0
Promedio	Concentración	1.13	7.80	4.57	4.5

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 6 . Número de brotes por explante *Agave tequilana* Weber cv. Azul obtenidos en diferentes fuentes citocinínicas en tres concentraciones.



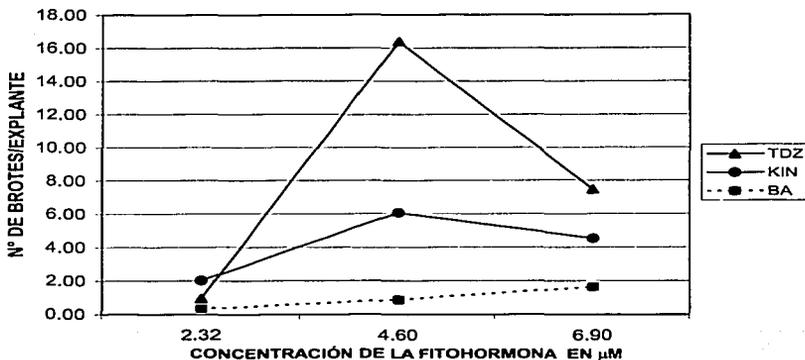
En el caso de Kinetina el mayor número de brotes se alcanzó a una concentración de 4.60 μM con 6.1 brotes por explante, 35.5 % superior a la media general. El menor efecto de esta fuente citocinínica se ubico en la concentración de 2.32 μM con solo 2.0 brotes / explante formados, es decir 55.5 % menor al promedio general.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La adición de $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de Kinetina ($2.32 \text{ }\mu\text{M}$) al medio no resulto una concentración favorable en la multiplicación de esta especie; contrariamente a lo que señalaron Binh et al., (1990) en el cultivo *in vitro* de *Agave cantala*, *A. fourcroydes* y *A. sisalana*, donde la concentración de $2.32 \text{ }\mu\text{M}$ era adecuada para la multiplicación *in vitro* de brotes.

En la Figura 7, se muestra el efecto inductivo de las citocininas empleadas en tres concentraciones, teniendo mejor respuesta en la formación de brotes tanto en TDZ como KIN (Kinetina) en las concentraciones medias ($4.60 \text{ }\mu\text{M}$), en proporción citocinina : auxina 10:1. En las concentraciones bajas ($2.32 \text{ }\mu\text{M}$) en el caso del Thidiazuron y la Kinetina la respuesta morfogénica es baja teniendo una tendencia a descender conforme la concentración es menor, de igual forma cuando las concentraciones son mayores a $4.60 \text{ }\mu\text{M}$.

Figura 7. Respuesta al efecto inductivo en la formación de brotes de *Agave tequilana* Weber cv. Azul de tres fuentes citocinínicas en tres concentraciones.



Para el caso de la Benciladenina (BA) mostró una tendencia diferente a las otras dos fuentes citocinínicas, siendo su efecto inductor menor, requiriendo concentraciones muy altas para tener una respuesta favorable. Considerada por Bihn et al., (1990) como una fuente citocinínica ineficaz en la inducción de brotes múltiples en especies de agave como: *A. cantala*, *A. fourcroydes* y *A. sisalana*.

Los resultados de diversos trabajos en cultivo *in vitro* en agavaceas y específicamente en el género *Agave* con benciladenina como lo son los de: Robert et al., (1987); Nava (1988); Das, (1992); Santacruz-Ruvalcaba et al., (1999), permiten inferir que la composición química y su efecto fisiológico en conjunción e interacción con esta especie ofrece un efecto inductivo muy reducido, requiriendo altas concentraciones para estimular en la fase de determinación durante la organogénesis. Contrariamente con lo que señalaron Salisbury y Roos (1978), que el anillo benzil- en BA aparentemente es más efectivo, en cuanto actividad citocinínica por arriba de furfural- de KIN, y fenil- y tenil- en 2iP.

TESIS CON
FACULTAD DE CIENCIAS

Longitud de brotes

En el análisis de varianza de esta variable indica que no hay diferencias estadísticas significativas al nivel $P = 0.01$, (Anexo, Tabla 4). Existiendo igualdad estadística entre tratamientos, pudiéndose observar en la comparación de promedios (cuadro 9).

Cuadro 9. Comparación de medias para las variables número y longitud de brotes de *Agave tequilana* Weber cv. Azul obtenidos en diferentes tipos y concentraciones de citocininas

TRATAMIENTOS		Número Promedio de brotes	Longitud Promedio de brotes
TDZ	2.32	1.0 e	24.82 a
KIN	2.32	2.0 d e	24.19 a
BA	2.32	0.4 e	17.75 a
TDZ	4.60	16.4 a	14.54 a
KIN	4.60	6.1 b c	14.60 a
BA	4.60	0.9 e	16.58 a
TDZ	6.90	7.5 b	14.49 a
KIN	6.90	4.5 b c d	12.78 a
BA	6.90	1.7 d e	21.50 a

Para esta variable se obtuvo un promedio general de 17.92 mm teniendo que los tratamientos TDZ 2.32 y KIN 2.32 μM muestran mayor longitud promedio con 24.82 y 24.19 mm respectivamente. Los valores más bajos se ubican en KIN y TDZ a 4.60 μM (Cuadro 10, Figura 8).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Se presentó la misma situación que en la evaluación de medios, decreciendo la longitud en aquellos tratamientos con el mayor número de brotes. Esto puede ser atribuido que al incrementar el efecto inductivo de brotes la expansión celular se ve disminuida respecto a la división celular. Esto explica el hecho de que en tratamientos como BA 2.32 μM , al no tener una inducción significativa con una formación esporádica de brotes no tiene influencia en la longitud de los mismos, debido fundamentalmente que la actividad de la citocinina no inhibió la dominancia apical de los explantes.

Existe una relación estrecha entre las variables número y longitud de brotes, dado que disminuye el crecimiento longitudinal de los brotes al tener mayor número de estos. Teniendo de este modo una relación directa en la demanda de los órganos.

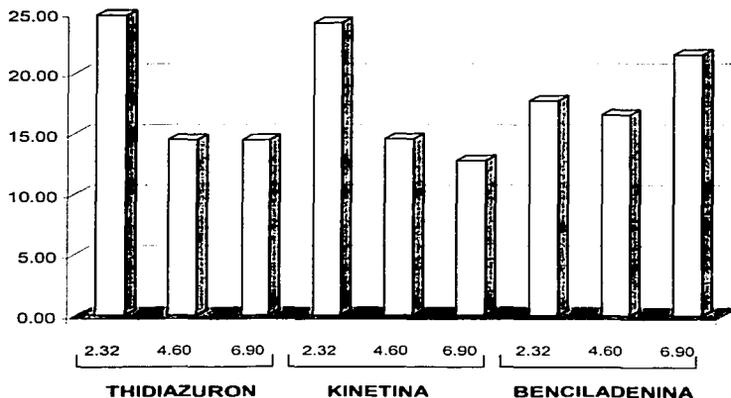
El tratamiento con TDZ a concentración de 4.60 μM mostró una longitud de 14.54 mm, 14.60 mm para la concentración de 4.60 μM de Kinetina y 16.58 mm para BA a 4.60 μM , estadísticamente iguales, de esta forma se puede especular que las diferencias químicas de la composición del TDZ no limitan la expansión celular en esta especie. Se ha determinado que la utilización de TDZ no limita el crecimiento longitudinal de los brotes y en algunos casos la favorece (Atta et al., 1997) (Nihar et al., 1997).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Cuadro 10. Longitud promedio de brotes (mm) de *Agave tequilana* Weber cv. Azul obtenidos en diferentes fuentes citocinínicas en tres concentraciones.

Concentración	2.32 μM	4.60 μM	6.90 μM	Promedio fuente citocinínica
TDZ	24.82	14.54	14.49	17.95
KIN	24.19	14.60	12.78	17.19
BA	17.75	16.58	21.50	18.61
Promedio concentración	22.25	15.24	16.26	17.92

Figura 8. Longitud promedio de brotes de *Agave tequilana* Weber cv. Azul obtenidos en diferentes fuentes citocinínicas en tres concentraciones.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

VI. CONCLUSIONES.

1. Para la variable número de brotes, las plantas en el medio Cruz- Pizarro (2000) presentaron la mayor tasa de proliferación con 7.9 brotes por explante con una relación $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ de 3.5 : 1..
2. Para la variable longitud de brotes en el medio MS al 50 % de su concentración de sales se obtuvo el mayor promedio de longitud de brotes con 20.88 mm.
3. En los medios Cruz-Pizarro (2000) y MS al 100 % se presentaron las mayores tazas de proliferación, aunque se ve reducida la longitud promedio de los brotes.
4. Con los medios MS 50% y Cruz-Pizarro (2000) se satisface de manera favorable los requerimientos nutrimentales de los explantes de *Agave tequilana* Weber cv Azul, considerando además que estos se encuentran a la mitad y por debajo en la concentración total de iones respecto al medio MS 100%, un medio considerado alto en sales.
5. Es factible la propagación de esta especie en un medio con una concentración total de sales reducida como el medio Cruz-Pizarro (2000) con una relación $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ 3.5 :1.

TESIS CON
SALA DE ORIGEN

6. Existe una respuesta diferencial de los explantes en la formación de brotes respecto a la fuente citocinínica empleada.
7. En la concentración 4.60 μM de TDZ a una proporción citocinina:auxina 10:1 y TDZ 6.90 μM a una proporción 15:1 se obtuvo mayor proliferación de brotes.
8. La mayor respuesta al efecto inductivo de las citocininas fue a 4.60 μM en Thidiazuron (TDZ) y Kinetina manteniendo un relación citocinina:auxina de 10:1 teniendo más formación de brotes.
9. El efecto inductivo de la Benciladenina para esta especie en las concentraciones empleadas, es reducido con una tendencia a requerir altas concentraciones para una mayor respuesta organogénica.
10. Para la variable longitud de brotes los tratamientos TDZ a 2.32 μM y Kinetina 2.32 μM presentaron la mayor longitud promedio con 24.82 mm y 24.19 mm respectivamente, aunque estos tratamientos mostraron una reducida proliferación de brotes.
11. Los explantes y brotes formados no presentaron problemas de vitrificación durante el desarrollo de su cultivo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Abu- Qaoud, Hassan, R. M. Skirvin y F.E. Below.1991. Influence of nitrogen form and NO_3^- - N : NH_4^+ - N , ratios on adventitious shoot formation from pear (*Pyrus communis*) leaf explants *in vitro*. Plant Cell Tissue and Organ Culture 27: 315-319.
- Adrijany, V. S., Indrayanto, G., Soehono, L. A.I.1999. Simultaneous effect of calcium, magnesium, copper and cobalt ions on sapogenin steroids content in callus of *Agave amaniensis*. Plant Cell Tissue and Organ Culture 55:103-108.
- Aguilar E. M., perfiles de las políaminas durante el desarrollo *in vitro* en explantes de *Agave tequilana* weber y plantulas de *Agave fourcroydes* Lem. cultivadas en condiciones vitrificantes y no vitrificantes. Escuela de Química. UADY. 73 p.
- Ahroni, A., Zuker, A., Rozen, Y., Shejtman, H. & Alexander V. 1997. An efficient method for adventitious shoot regeneration from stem-segment explants of gypsophila. Plant Cell Tissue and Organ Culture 49:101-106.
- Ahuja, M.R.1993. Micropropagation of Woody Plants. Kluwer Academic Publishers. Nueva Zelanda. pp 3-25.
- Alegria, S.D.R. 2001. Estudio de la inducción de la Embriogénesis somática indirecta del henequén a partir del cultivo de tallo *in vitro*. Instituto Tecnológico de Mérida. México. 75 p.
- Alvarez de Zayas, A. 1987. Sistemática y filogenia de la familia Agavaceae Endlicher. Tesis de Doctorado. Facultad de biología, Jardín Botánico Nacional. Universidad de la Habana. 79 p.
- Ammirato, P.V. 1986. Control and expression of morphogenesis in culture. En: L. A. Whitors y P. G. 1986. Plant tissue culture and its agricultural applications. pp 23-45.
- Ammirato, P.V.1990. Handbook of plant cell culture. McGraw Hill Vol. 5. USA. pp 206-225.
- Arellano, O.G. 1994. Absorción de calcio durante la proliferación *in vitro* de Vid cv. Malaga blanca. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Posgraduados. Montecillo, Edo. de México. 97 p.
- ASERCA.2000. Claridades Agropecuarias. "El agave tequilero; pencas que abrazan el mundo. Núm. 87. ASERCA. SAGAR. México. 48 p.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- Atta, A. H., Zaghloul M., Waly A. K. y Khattab S. H. 1996. Micropropagation of some ornamental plants. 3 *In vitro* culture and establishment of *Dracaena marginata* var. Tricolor. *Annals-of-Agricultural-Science,-Moshtohor*, 34:3, 1153-1162 .
- Atta, A.H., Van S.J.1997. Micropropagation and establishment of *Yucca aloifolia*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 48: 209-212.
- Atta A.H. K., Zaghloul M. Waly A. K y Askar F.M. 1997. *In vitro* shoot proliferation, rooting and establishment of *Yucca aloifolia*; *Y. filamentosa*, and *Y. filamentosa* var. variegata. *Annals-of-Agricultural-Science,-Moshtohor*, 35:2, 915-934.
- Avelino T. A. 2002. Niveles de nitrógeno en el cultivo *in vitro* de *Gladiolus* sp. Tesis de Licenciatura, UNAM F.E.S. Cuautitlán. Cuautitlán Izcalli. Estado de México. 100 p.
- Azcon-Bieto, J., Talon M. 1993. *Fisiología y bioquímica vegetal*. 1ª edición. Madrid España . pp 285-392
- Babaoglu, M., y Yorgancilar, M. 2000. TDZ- specific plant regeneration in salad burnet. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 440: 31-34
- Bagni, N., y Torrigiani, P. 1992. Polyamines: A new class of growth substances. En: Karsen, C. M., Van Loon, L.C. y Vreugdenhil, D. 1992. *Progress in Plant Growth Regulation*. Kluwer Academic Publisher. Dordrecht. pp 264-275
- Binh, L. T., Mui, L.T., Thang, T. D., Phong, D. T. 1990. Rapid propagation of agave by *in vitro* tissue culture. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 23: 67-70.
- Blazich-FA; Novitzky-RT. 1984. *In vitro* propagation of *Sansevieria trifasciata*. *HortScience* 19: 1, 122-123.
- Bon, M. C. Damien Bonal, Doreen K. G y Olivier Monteuis. 1998. Influence of different macronutrient solution and growth regulators on micropropagation of juvenile *Acacia mangium* and *Paraserianthes*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 53: 171-177.
- Brand, H.M. 1993. Agar and ammonium nitrate influence hiperhidricity, tissue nitrate and total nitrogen content of serviceberry (*Amelanchier arborea*) shoot *in vitro*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 35: 203-209.
- Bustamante, S. F. 1997. Trabajo semestral de principios de propagación de plantas. La molina Edu. Perú. pp 1-10
- Carballo, B. M.A. 2001. Describir un protocolo para el establecimiento de suspensiones celulares formadas a partir del cultivo *in vitro* de base de hoja del henequén (*Agave fourcroydes* Lem.), Instituto Tecnológico de Mérida.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- Castro-Concha, L., Loyola-Vargas M. V., Chan J. L., Robert M. L. 1990. Glutamate dehydrogenase activity in normal and vitrified plant of *Agave tequilana* Weber propagated *in vitro*. Plant Cell Tissue and Organ Culture 22: 147-151.
- Castro, L., J.L. Chan, M. Robert y V.M. Loyola-Vargas. 1987. Estudio comparativo de las enzimas involucradas en el metabolismo nitrogenado en plantas sanas y vitrificadas de *Agave tequilana* Weber. En: Anónimo (1987) III Reunión Nacional de Bioquímica y Cultivo de Tejidos Vegetales (resúmenes) Irapuato, Gto. Centro de investigaciones avanzadas del IPN, Unidad Irapuato. 16 p.
- Chua, B.U., J.T. Kunisaki, and Y. Sagawa. 1981. *In vitro* propagation of *Dracaena marginata* var. tricolor. HortScience 16: 494
- Cruz, C., del Castillo L., Robert, M.L., & Ondarza, R.N. 1985. Biología y aprovechamiento integral del henequén y otros agaves. CICY. Yucatán, México. 96 p.
- Cruz-Pizarro, F. 200. Niveles de sacarosa y relación $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ en el cultivo *in vitro* de brotes de vid (*Vitis vinifera*) "Malaga Roja". Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de postgraduados. México. 78 p.
- Cuenca, B., Ballester, A., y Vieitez, A. M. 2000. *In vitro* adventitious bud regeneration from internode segments of beech. Plant Cell Tissue and Organ Culture 60: 213-220.
- Christianson, M. L. y Warnick, D. A. 1988. Organogenesis *in vitro* as a developmental process. HortScience, 23(3): 515-519
- Das, T. 1992. Micropropagation of *Agave sisalana*. Plant Cell Tissue and Organ Culture 31: 253-255.
- Davies, P.J. 1995. Plant hormones, physiology, biochemistry and molecular biology. Kluwer Academic Publisher. Netherlands. pp 1-13.
- Debergh, P.C. y Zimmerman, R.H. 1991. Micropropagation technology and application. Kluwer Academic Publishers. Nueva Zelanda. 484 p.
- Declerck, V. y Shuyler S. Korban. 1994. Effects source of macronutrients and plant growth regulator concentrations on shoot proliferation of *Cornus florida*. Plant Cell Tissue and Organ Culture 38: 57-60.
- Dixon, R. A. 1985. Plant cell culture a practical approach. IRL Press Oxford Washington, USA. pp 96-99.
- Ellen, G. S. 1988. Regulation of morphogenesis: A Brief Introduction. HortScience, 23(3). p 512.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- Evaldsson, I.E., Welander, N.T. 1985. The effects of medium composition on *in vitro* propagation and *in vivo* growth of *Cordyline terminalis* cv. Atoom. Journal-of Horticultural-Science. 60: 4, 525-530.
- Fasolo, F., Richard H. Zimmerman y Ingrid Fordam. 1989. Adventitious shoot formation on excised leaves of *in vitro* growth shoots of apple cultivars. Plant Cell Tissue and Organ Culture 16: 75-87.
- Fila, G., J. Ghashghare, J. Hoarau and G. Cornic 1998. Anatomical Changes in persistent leaves of tissue cultured strawberry plants after removal from culture. Scientia Horticulturae. 28: 331-337.
- Fiola, J. A., Asan M. A., Swartz, H. J., Bors, R. H., McNicols, R. 1990. Effect of thidiazuron, light influence rates and kanamycin on *in vitro* shoot organogenesis from excised *Rubus* cotyledons and leaves. Plant Cell Tissue and Organ Culture 20:223-228.
- Gamborg, O. L., Miller, R. A., y Ojlma, K. 1968. Nutrient requirement of suspension cultures of soybean root cells. Exp. Cell Res. 50: 151 – 158.
- Gavidia, I., Pérez-Bermúdez P. 1997. *Digitalis obscura* cardenolides. Effect of macronutrient concentration and N source on Growth and productivity of shoot-tip culture. Phytochemistry. Vol. (46): 273-278.
- González-Oramas, G., Trujillo, R., Darias R. y Peña-García, E. 1996. Micropropagación del henequén: aportes a una tecnología. Revista del Jardín Botánico Nacional, 17-18: 177-180
- González, R. E. 2001. Micropropagación de *Mammillaria Spp.* Tesis de Licenciatura, FES UNAM. Cuautitlán Izcalli, Edo. de México. 67 p.
- Gracián-Sandoval, S. 1987. Propagación *in vitro* del maguey pulquero (*Agave salmiana* Otto). En: Anónimo (1987) III Reunión Nacional de Bioquímica y Cultivo de Tejidos Vegetales (resúmenes) Irapuato, Gto. Centro de investigaciones avanzadas del IPN, Unidad Irapuato. 14 p.
- Gracián-Sandoval, S. y Miguel-Cruz, 1987. Propagación *in vitro* del mezcal tequilero (*Agave tequilana* Weber). En: Anónimo (1987) III Reunión Nacional de Bioquímica y Cultivo de Tejidos Vegetales (resúmenes) Irapuato, Gto. Centro de investigaciones avanzadas del IPN, Unidad Irapuato. 14 p.
- Graham, J., Iasi, L., y Millam, S. 1997. Genotype-specific regeneration from a number of *Rubus* cultivars. Plant Cell Tissue and Organ Culture 48: 167-173.
- Grewal, H. S., Rajvir, K. y Kaur, R. 1999. Effect of growth regulators on shoot and root formation in *Dracaena*. Indian Journal of Horticulture 56:4, 375-381.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- Gribaundo, I., y Fronda, A. 1991. Effects of thidiazuron on grapevine axillary buds cultivated *in vitro*. HortScience 26(8): 1083
- Groenewald, E.G., D.C. J. Wessels, and A. Koeleman. 1977. Callus formation and subsequent plant regeneration from seed tissue of an Agave species (Agavaceae). Z. Pflanzenphysiol. Bd. 81: 369-373.
- Guerrero-Agama J. R. 2000. Aclimatación de *Lilium longiflorum* con diferente relación nutrimental. Tesis de Maestría. Colegio de Posgraduados. Montesillo, Texcoco Edo. de México. pp 5-30.
- Guido, M. A. 2002. Proliferación *in vitro* de *Gladiolus sp.* Tesis de Licenciatura. FES UNAM Cuautitlán Izcalli, Edo. de México. 76 p
- Hartmann, H. T., D. E. Kester, F. T. Davies, Jr., y R. L. Geneve. 1997. Plant Propagation: Principles and Practices. Sixth edition. Prentice Hall. pp 71-72, 429-513.
- Hazra, S.K. Sudripta Das y A.K. Das. 2002. Sisal plant regeneration via organogenesis. Plant Cell Tissue and Organ Culture 70:235-240.
- Hinnen, M.G.J., R.L.M. Pierik y F.B.F Bronsema. 1989. The influence of macronutrients and some other factors on growth of *Phalaenopsis* hybrid Seedlings *in vitro*. Scientia Horticulturae 41: 105-116.
- Huetteman, C. A., y Preece, J. E. 1993. Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. Plant Cell Tissue and Organ Culture 33:105-119.
- INEGI. 2000. El agave tequilero en el estado de Jalisco. INEGI. México. pp 3-35
- Jeong, J. H., Murthy, H. N., y Paek, K. Y. 2001. High frequency adventitious shoot induction and plant regeneration from leaves of static. Plant Cell Tissue and Organ Culture 65: 123-128.
- Kartosentono, S., Indrayanto, G., y Zaini, N. C. 2002. the uptake of copper by cells suspension cultures of *Agave amaniensis*, and its effect on the growth, amino acids and hecogenin content. Plant Cell Tissue and Organ Culture 68: 287-292.
- Kim, M. S., Schumann, C. M., y Klopfenstein, N. B. 1997. Effects of thidiazuron and benzyladenine on axillary shoot proliferation of three green ash (*Fraxinus pennsylvanica* Marsh.) clones. Plant Cell Tissue and Organ Culture 48: 45-52.
- Kunisaki, J.T. 1975. *In vitro* propagation of *Cordyline terminalis* (L.) Kuth. HortScience 10: 601-602.
- Lee, N., Hazel Y., Wetzstein and Harry E. S. 1986. The effect of agar vs liquid medium on rooting tissue cultured Sweetgem. HortScience 21(2): 317-318

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- Leblay, C., E. Chevreau y L.M. Raboin 1991. Adventitious shoot regeneration from *in vitro* leaves of several pear cultivar (*Pirus communis* L.). Plant Cell Tissue and Organ Culture 25: 99-105.
- Leffring, L., Vonk, C.R y Ribot, S.A. 1985. Hormonal effects on shoot formation of *Cordylina* cultivars. Acta Neerlandica, 34:2, 238.
- Leszek, S.J. 1989. Desarrollo vegetal: Sustancias reguladoras. Universidad Nacional Autónoma Chapingo. 121 p.
- Lillo, C. 1989. effects of media components and environmental factors on shoot formation from protoplast – derived calli of *Solanum tuberosum*. Plant Cell Tissue and Organ Culture 19: 103-111.
- Lloyd, G. and B Mc Cown. 1980. Commercially feasible Micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by used of shoot tip culture. Proc. Intl. Plant. Prop. Soc. 30: 421-427
- MacCarthy, J.J. and E.J. Staba. 1985. Morphogenesis in *Yucca schidigera* Roezl. Root organ cultures. Ann. Bot. 56: 205-210.
- Madrigal, L. R., G.M.R. Dorantes y J.L. Rodríguez de la O. 1981. Propagación in vitro de henequén (*Agave Fourcroydes* Lemaire). Primer Simposio del Agave. Mérida, Yuc., K'atun- Cordemex. 12 p.
- Madrigal L. R., y R. Bailón. 1987. Aplicaciones de la biotecnología en el cultivos agroindustriales: Caso de los agaves. En: Anónimo (1987) La Agroindustria en México, Vol. II. 1er Seminario Nacional sobre la Agroindustria en México. Chapingo, Méx., Universidad Autónoma Chapingo, Programa de Integración Agricultura-Industria. pp 851-856
- Madrigal L. R. 2000. Potencial productivo de la biotecnología aplicada a la agroindustria tequilera. En: Diario La Jornada. Investigación de la Universidad Autónoma Chapingo. Proponen la biotecnología para superar la escasez de agave. Sección Estados. Agosto 4 del 2000.
- Maene, L. y Debergh, P. 1985. Liquid medium additions to established tissue cultures to improve elongation and rooting in vivo. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 5:1, 23-33.
- Maldonado M. I. E. 1988. Cuantificación de la actividad de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa durante la micropropagación de *Agave tequilana* Weber, Escuela de Química. UADY. México. 98 p.
- Mee, G.W.P. 1978. Propagation of *Cordylina terminales* from callus culture. HortScience 13: 660

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- Mejía, C. J. 2001. Inducción de Organogénesis *in vitro* de maíz y multiplicación en condiciones de estrés hídrico. Tesis de Maestría. Colegio de Posgraduados. México. pp 12-20
- Mok, M. C., D. W. Mok, D. J. Armstrong, K. Shudo, Y. Isogai and T. Okamoto. 1982. Cytokinin activity of N- Phenyl- N'- 1, 2, 3- Thidiazol -5- Ylurea (Thidiazuron). *Phytochemistry*, Vol. 21(7) 1509-1511.
- Moreno, S. S., Martínez H. D., Príncen L.H. (ed.) y Rossi C. 1996. Propagación *in vitro* de *Agave pacifica* (Maguey de Bacanora) para su conservación, repoblación y explotación comercial. *Proceedings of the Ninth international conference on jojoba and its uses and of the Third international conference on new industrial crops and products*, Catamarca, Argentina, 25-30 September. pp 385-388.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Nairn, B. J., Furneaux, R. H., Stevenson, T. T. 1995. Identification of agar constituent responsible for hydric control in micropropagation of radiata pine. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 43: 1-11.
- Nava, C. A. 1988. *Agave tequilana* Weber *in vitro*: Un modelo para estudios en morfogénesis. Tesis de Maestría. Colegio de Posgraduados. México. 214 p.
- Niedz, P. R. 1994. Growth embryogenic sweet orange callus on media varying in the ratio of nitrate to ammonium nitrogen. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 39: 1-5.
- Nitsch, J. P., y Nitsch, C. 1969. Haploid plants from pollen grains. *Science* 163: 85-87.
- Nikam, T.D. 1997. High frequency shoot regeneration in *Agave sisalana*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 51: 225-228.
- Osorio, O. R. 2001. Generación de variabilidad genética mediante mutagénesis *in vitro* de *Agave tequilana* Weber. Escuela de Química. Universidad Autónoma de Yucatán. Seminario de Posgrado.
- Peraza, E. L. 1988. Cuantificación de la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (e.c.1.1.1.27) durante la micropropagación de *Agave tequilana* Weber. Escuela de Química. Universidad Autónoma de Yucatán. México. 104 p
- Pérez G., A., S. Gracián s., M. Huerta, A. Romero y R Ibarra. 1987. Aprovechamiento integral de agaves y Opuntias. En: Anónimo (1987) *La Agroindustria en México*, Vol. II. 1er Seminario Nacional sobre la Agroindustria en México. Chapingo, Méx., Universidad Autónoma Chapingo, Programa de Integración Agricultura-Industria. pp. 844- 850

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- Pierik, R. L. M. 1990. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Mundi Prensa. Madrid, España. 390 p.
- Podwyszynska, M., Olszewski T. 1995. Influence of gelling agents on shoot multiplication and uptake of macroelements by *in vitro* culture of Rose, *Cordyline* and *Homalomena*. *Scientia Horticulturae* 64: 77-84
- Portillo M. L. 1997. Embriogénesis somática indirecta en *Agave tequilana* Weber: efecto auxinas. En: Gaceta Universitaria. Desarrollan metodología para el mejoramiento genético del Agave. Victor González. Universidad de Guadalajara. 30 de Junio de 1997. pp 3-54
- Power, D.E., Backhaus R.A. 1989. *in vitro* propagation of *Agave arizonica* Gentry & Weber. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 16: 67-60
- Quintero, A., V. Rosas, M. Baca y A. Romo de Vivar. 1980. Estudio de las condiciones de cultivo de células de Yuca filifera y su cuantificación de sarsasapogenina. En: Anónimo (ed.) Yuca. Saltillo Coah., Centro de Investigaciones en Química aplicada. pp 223-227.
- Quoirin, M., y Leproivre, P. 1977. Improved medium for *in vitro* culture of *Prunus* sp. *Acta Hort.* 78: 437-442.
- Rangel, J. V.A. 2002. Niveles de sacarosa en la multiplicación de *Gladiolus* sp. cv. Maria bonita. Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Estado de México. 66 p.
- Ranjan N. N. Y Prasad R. S. 1997. *In vitro* propagation of three epiphytic orchids, *Cymbidium alofolium* (L.) Se., *Dendrobium aphyllum* (Roxb.) and *Dendrobium moschatum* (Buch - Ham) Sw. through Thidiazuron-induced high frequency shoot proliferation. *Scientia Horticulturae* 71: pp 243-250.
- Reinert, J. 1959. Ubre die Kontrolle der morphogenese und die induktion von adventivembryonen an gewebeulturen aus karotten. *Planta*, 3: 318-333.
- Robert, M. Y A. García. 1985. El cultivo de tejidos vegetales y su posible aplicación en el mejoramiento genético de las agavaceas. En (eds.) *Biología y aprovechamiento integral del henequen y otros agaves*. México, Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. pp 83-89.
- Robert, M. L., Herrera, J. L., Contreras, F., Scorer, K. N. 1987. *In vitro* propagation of *Agave fourcroydes* Lem. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 8: 37-48.
- Rodríguez-Garay, B., Gutiérrez-Mora A., Acosta-Dueñas B. 1996. Somatic embryogenesis of *Agave victoria-reginae* Moore. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 46: 85-87.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- Rodríguez-Garay, B., Gutiérrez-Mora A., Acosta-Dueñas B. 1996. Somatic embryogenesis of *Agave victoria-reginae* Moore. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 46: 85-87.
- Salisbury, F.B. and C. W. Ross. 1978. *Plant Physiology*. Belmont, California, Wadsworth Publishing Company, Inc. 436 p.
- Salisbury, F.B y C. W. Ross. 1994. *Fisiología Vegetal*. Ed. Iberoamericana S.A. de C.V. 1a. Impresión en español. México. pp 395-423.
- Sandal, I., Bhattacharya, A., y Ahuja, P. S. 2001. An efficient liquid culture system for tea shoot proliferation. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 65: 75-80.
- Santacruz-Ruvalcaba F., Gutiérrez-Mora A. y Rodríguez-Garay B. 1998. Somatic embryogenesis in some cactus and agave species. *Journal-of-the-Professional-Association-for-Cactus-Development*. 3: 15-26.
- Santacruz-Ruvalcaba F. 1997. Embriogénesis somática indirecta en *Agave tequilana* Weber; efecto citocininas. En: *Gaceta Universitaria*. Desarrollan metodología para el mejoramiento genético del Agave. Victor González. Universidad de Guadalajara. 30 de Junio de 1997. pp 3-54
- Santacruz-Ruvalcaba, F., Gutiérrez-Pulido, H., Rodríguez-Garay, B. 1999. Efficient in vitro propagation of *Agave parrasana* Berger. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 56: 163-167.
- Sawy, A., Bekheet S. A., y Hossny Y. A. 2000. A protocol for micropropagation of *Dracaena marginata*. *Egyptian-Journal-of-Horticulture*, 27 (1): 29-40
- Schildkenencht, H. 1984. Turgorins-new chemical messengers for plant behaviour. *Endeavour*, New. Series. pp 113-117.
- Selby, R. L., Harvey B.M.R. 1989. The effects of culture medium rigidity on adventitious bud production and tissue vitrification in needle cultures of Sitka spruce (*Picea sitchensis* Bong.) *New Phytol.* 113: 203-210.
- SEP-CONACYT. 2000. *Foro Sistema-Producto Sotol*. Gobierno del Estado de Chihuahua. México. pp 1-20.
- Shahid, J.B. 1999. *In vitro* propagation of cabbage palm (*Cordyline terminalis* L.) through clonal regeneration. *Anadolu*, 9: 2, 56-59.
- Singh, S. K., Surendra K., Pandey R. K., Raghava P.S. y Kumar S. 2001. *In vitro* propagation in *Dracaena*. *Journal of Ornamental Horticulture New Series*, 4: 1, 22-24

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

- Skoog, F., y Miller, C. O. 1967. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. Symposium of the Society for Experimental Biology, 11: 118-131.
- Soumendra, K.N., S. Sitakanata, P. and Pradeep, K. 1999. In vitro propagation of pomegranate (*Punica granatum* L. cv Ganesh) through axillary shoot proliferation from nodal segments of mature tree. *Scientia Horticulturae*. 79: 181-189.
- Steward, F. C., Mapes, M. O., y Mears, K. 1958. Growth and organized development of cultured plant cells. II. Organization in cultures grown from freely suspended cells. *American Journal of Botany*, 45: 705 - 709.
- Teo, By C. K. y L. K. Chan. The effects of agar content, nutrient concentration, genotype and light intensity on the *in vitro* rooting of papaya microcuttings. *Journal of Horticultural Science* 69(2) 267-273.
- Thompson, M. R., y Thorpe, T. A. metabolic and no metabolic roles of carbohydrates. En: Bonga J. M., y Durzan D. J. 1987. *Cell and Tissue Culture in Forestry*, vol. 1. Martinus Nihonff, Dordrecht, pp 89-112
- Thorpe, T. A., Kumer, P. P. Cellular control morphogenesis. En: Ahuja M.R. 1993. *Micropropagation of Woody Plants*. Kluwer Academic Publisher. Dordrecht. pp 11-29
- Tivarekar, S. y Eapen, S. 2001. High frequency regeneration from immature cotyledons of mungbean. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 66: 227-230.
- Tiwari, V., Tiwari, K. N., y Singh, B. D. 2001. Comparative studies of cytokinins on *in vitro* propagation *Bacopa monniera*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 66: 9-16.
- Tran Than Van, K., y Trinh, t. H. 1990. Organogenic differentiation. En: Bhojwani, S. S. 1990. *Plant tissue culture, Applications and limitations*. Elsevier. Amsterdam. pp 34- 53.
- Turner, R. Steven, and Suman Shunga, 1990. Vitrification of crabapple, pear and gum and gellan gum-solidified cultured medium. *HortScience* 25(2): 1648-1650
- Urbina, P.R. 1996. efecto de agentes gelificantes en el cultivo *in vitro* de Vid (*Vitis vinifera*) cv. Malaga Roja. Tesis profesional. UNAM-FES Cuautitlán Izcalli México. 45 p.
- Valenzuela, Z. A. 1994. El Agave Tequilero: Su cultivo e industrialización. Monsanto. México. 119 p.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- Valenzuela, Z. A. 1996. Reserva genética y propagación de clones. Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias U. de G. México. En: Revista 100% Tequila. Biotecnología al rescate del tequila. Pilar Franco. Número 9. pp 1-9
- Vargas, T. E. y García E. 1996. Clonal mass propagation of *Agave sisalana* (Sisal). Acta Biológica Venezolana. 16: 3, 39-44.
- Velez G. C. 1997. Selección celular para resistencia a filtrados microbianos en *Agave tequilana* Weber. En: Gaceta Universitaria. Desarrollan metodología para el mejoramiento genético del Agave. Victor González. Universidad de Guadalajara. 30 de Junio de 1997. pp 3-54
- Villalobos A. V. 1985. Las bases mofogenéticas en la micropropagación de especies perennes. En: Robert M. L. y Loyola V. M. 1985. El cultivo de tejidos vegetales en México. Yucatán. México. CICY - CONACYT
- Villavicencio, G. E. 1998. Cultivo *in vitro* de dos especies de Cactáceas *astrophytum ingriostigna* y *Astrophytum capricorne* amenazadas de extinción. Tesis de Maestría. Colegio de Posgraduados.
- Villegas, M.A. 1990. Micropropagación de frutales en : Fundamentos teórico prácticos de cultivo de tejidos. Colegio de Posgraduados, FAO. pp 101-105
- Walker, K.A., M.L. Wedeln y E.G. Laworski. 1979. Organogenesis in callus tissue of *Medicago sativa*. The temporal separation of induction process from differentiation process. Plant Sci. 16: 23-30
- Wareing, P. F., y Phillips I.D. 1978 The control of growth and differentiation in plants. 2ª ed. Oxford, Pergamon Press Ltd. 347 p.
- Wen, H., Wagner, J., Larcher, W. 1997. Growth and nocturnal acid accumulation during early ontogeny of *Agave attenuata* grown in nutrient solution and *in vitro* culture. Biologia Plantarum 39(1): 1-11.
- White, P. R. 1943. A Handbook of Plant Tissue Culture. The Jacques Cattell Press, Lancaster.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE GUATEMALA
UNIVERSIDAD DE GUATEMALA

ANEXO

Tabla 1. ANOVA número de brotes. Evaluación de medios

FTE. VAR.	GL	SC	CM	F OBS	F 5%	F 1%
TOTAL	19	37.001				
TRAT	3	10.873	3.624	2.21	3.01 NS	4.77
ERROR	16	26.127	1.632			

Tabla 2. ANOVA longitud de brotes. Evaluación de medios

FTE. VAR.	GL	SC	CM	F OBS	F 5%	F 1%
TOTAL	19	97.747				
TRAT	3	49.562	16.520	5.48	3.01*	4.77**
ERROR	16	48.185	3.011			

Tabla 3. ANOVA número de brotes. Evaluación de citocininas

FTE VAR.	GL	SC	CM	F OBS	F 5%	F 1%
TOTAL	35	904.18				
FUENTE CITOCININICA (F) CONCENTRACION (C)	2	322.54	161.268	68.50	3.35*	5.49**
INTERACCIÓN FC	4	267.42	133.710	56.79	3.35*	5.49**
ERROR	27	250.65	62.663	26.62	2.73*	4.11**
ERROR	27	63.57	2.354			

Tabla 4. ANOVA longitud de brotes. Evaluación de citocininas

FTE VAR.	GL	SC	CM	F OBS	F 5%	F 1%
TOTAL	35	3159.31				
FUENTE CITOCININICA (F) CONCENTRACION (C)	2	348.94	174.470	2.43	3.35 NS	5.49
INTERACCIÓN FC	2	108.78	54.388	0.76	3.35 NS	5.49
ERROR	4	760.00	190.001	2.64	2.73 NS	4.11
ERROR	27	1941.59	71.911			

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN