

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**

**“Efecto de tres medios de cultivo en la proliferación y
aclimatación de *Agave tequilana* Weber propagadas *in vitro*”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**INGENIERO AGRÍCOLA
PRESENTA:**

FEDERICO REYES ALMAZÁN

ASESOR: M. EN C. JUAN ROBERTO GUERRERO AGAMA

CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MÉXICO

2009



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.

Agradecimientos

A la:

Universidad Nacional Autónoma de México.

A la:

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

Campo 4

A los maestros de la F.E.S.C. C-4

Agradecimientos

A mis queridos padres, agradezco su incondicional apoyo, gracias por sus enseñanzas, vivencias y por la dedicación a sus hijos..... gracias ¡papás!

A mi hermano Antonio, gracias hermano por tu apoyo, por que siempre has estado ahí cuando más te necesito, creíste en mí, y siempre me has impulsado para seguir adelante, gracias "toño".

A mi hermana Miriam: gracias "miris" por siempre escucharme, eres la parte tierna y linda de la familia. Te quiero.

A la nueva luz de la familia, mis lindos e hiperactivos sobrinos Hugo y Jehan los adoro.

A Araceli, gracias por ser parte de mi familia, por tu apoyo incondicional, por creer en mí, por amarme, por ocuparte de mí, por permitirme estar a tu lado..... ¡TE AMO!

A mi cuñado, Hugo gracias por darle entretenimiento a la familia, y sobre todo por demostrarme que: "el que persevera alcanza".

A mi cuñada, Angie gracias por tu amistad, tus atenciones y por hacer feliz a mi hermano.

A M. C. J. Roberto, ¿que te digo? Gracias por ser un gran maestro y un gran amigo en mi formación universitaria.

Te agradezco.

A M. Elena, gracias por tu amistad y tus consejos.

Amigos y Profesores..... ¡Gracias!

ÍNDICE

Resumen.....	3
I. Introducción.....	4
II. OBJETIVOS	6
2.1. Objetivo general.	6
2.2. Objetivos específicos.....	6
III. REVISIÓN DE LITERATURA	7
3.1. Propagación de <i>Agave tequilana</i>	7
3.1.1. Rizomas	7
3.1.2. Apomixis vegetativa.....	8
3.1.3. Cultivo de tejidos	8
3.2. Investigación en el cultivo <i>in vitro</i> del género <i>Agave</i>	9
3.2.1. El cultivo de tejidos en <i>Agave tequilana</i>	11
3.3 Importancia del medio de cultivo	12
3.3.1 Sales minerales.....	12
3.3.2 Fuentes de Carbono.....	18
3.3.3 Vitaminas.....	19
3.3.4 Reguladores de crecimiento.....	20
3.4 Importancia de la fase de aclimatación.	22
3.4.1 Luminosidad	23
3.4.2. Humedad.....	25
3.4.3. Temperatura.....	27
3.4.4. Sustratos	28
3.5 Características de las plantas propagadas <i>in vitro</i>	30
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
4.1 Características del área de investigación	31
4.1.1 Fase de Laboratorio	31
4.1.2 Fase de Invernadero	31
4.1.3 Material Vegetativo.....	32
4.1.4 Sustratos	32
4.2. Diseños experimentales	32
4.2.1 Diseño experimental de la fase <i>in vitro</i>	33
4.2.2 Diseño experimental de la fase <i>ex vitro</i>	33
4.3 Parámetros de evaluación.....	33
4.3.1 Número de hojas	34
4.3.2 Longitud de planta.....	34
4.3.3 Tamaño de raíz	34
4.4 Manejo agronómico.....	35
4.4.1 Trasplante	35
4.4.2 Riegos	35
4.4.3 Control fitosanitario.....	36
V. RESULTADOS Y ANÁLISIS	37
5.1 Fase <i>In vitro</i>	37
5.2 Fase <i>ex vitro</i>	40
VI Conclusiones.....	45
LITERATURA CITADA.....	51

Resumen

El tequila es una bebida alcohólica proveniente de la fermentación y destilación de la planta de *Agave tequilana* cv. azul, de alta calidad y con denominación de origen, de gran demanda, no solamente en nuestro país sino también en el extranjero.

Pero en la última década, con referencia a la actualidad la planta de *Agave tequilana* cv. azul, ha manifestado serias amenazas de producción, esto dado por diversos factores como son problemas nutrimentales, fitosanitarios entre otros. Esto aunado a la necesidad del aumento de la producción para el abastecimiento de un mercado que cada vez crece más.

En relación al aumento de la producción, esto se convierte en un problema al buscar otras regiones que pudieran ser productoras de esta especie debido a los requerimientos de la especie aunada especialmente a la escasa producción vegetal de la misma, para su producción en campo. Ante estas amenazas, la biotecnología a través de la micropropagación es una forma viable para la obtención de estas plantas con una buena calidad y en reproducción masiva.

En general los trabajos realizados en aclimatación de plantas obtenidas por el medio de cultivo de tejidos han sido enfocados a condiciones de luz, temperatura y humedad relativa, sin considerar que son plantas que provienen de un ambiente rico en nutrimentos.

Por lo tanto el presente trabajo tiene como finalidad obtener un medio de cultivo adecuado para una reproducción de plantas cultivadas *in vitro*, contemplando condiciones atmosféricas controladas así como soluciones nutrimentales, aunado a ello, la evaluación la reacción de la planta de la fase *in vitro* a la fase *ex vitro*. Para esto se evaluaron diferentes medios de cultivo en la fase *in vitro*, con diferentes concentraciones de radix en la fase *ex vitro*.

I. INTRODUCCIÓN

El genero *Agave* para México tiene una importancia incuestionable, debido a la tradición que se tiene en nuestro país de la fabricación de bebidas alcohólicas y derivados de él como el pulque, el mezcal y el tequila, este último ha incrementado su fama a nivel internacional, generando una creciente industria con alto potencial económico tanto para industriales como para productores. El *Agave Tequilana weber* cv. Azul, es originario del estado de Jalisco y se produce en otros estados considerados dentro de la denominación de origen (Consejo Regulador del Tequila, 2000).

Actualmente debido a la sobre-explotación que ha tenido el cultivo, se presentan diversos problemas fitosanitarios que son heredados a las plantas hijas, en virtud de ser un cultivo que se propaga vegetativamente, mas una elevada demanda en todos los estados de la república donde se lleva a cabo su cultivo, lo cual ha originado una disminución en la producción de tequila provocando un incremento en los precios de la bebida en los mercados nacionales e internacionales. Lo anterior se ha reflejado en el crecimiento acelerado de la industria tequilera, volviéndose contra el sector que no estaba preparado para soportar más de 500 marcas en el mercado (Consejo Regulador del Tequila, 2000).

Ante la demanda de plantas de buena calidad, se ha generado la necesidad de encontrar métodos para su propagación masiva y rápida del agave, ya que el método tradicional de plantaciones por hijuelos es muy tardado. La micropropagación ha permitido dar un gran paso, en la obtención de plantas de buena calidad y en mayor número, además se favorece la reducción del ciclo de maduración de la plata, la cual tarda normalmente ocho o nueve años antes de llegar a las destilerías para ser procesada y convertida en tequila (Téllez, 2003).

Sin embargo, el éxito de la propagación *in vitro* está basado en el comportamiento de las plantas en las zonas de producción, siendo la fase de

aclimatación la que determina la cristalización de plantas para ser transferidas a condiciones naturales (Hartman *et al.* 1997), en virtud de que se presentan condiciones que pueden provocar la pérdida del material vegetativo obtenido *in vitro*. De tal forma se maneja, sistemáticamente la variación gradual de los factores que inciden en el crecimiento de las vitroplantas para lograr características que lleven a la planta de una condición denominada heterótrofa a condiciones normales como planta completamente autótrofa. En este punto las plantas obtenidas por cultivo de tejidos son, por lo general manejadas bajo control de condiciones ambientales, (luz, temperatura y humedad), sin considerar que fueron previamente sometidas a un ambiente rico en nutrimentos, los cuales, se encuentran a disposición sin que las plantas tengan un desgaste en la absorción de elementos que son necesarios para la realización de los procesos fisiológicos inherentes a su crecimiento (Guerrero, 2000).

Considerando lo anterior, en el presente trabajo, se determinó cómo influye la composición del medio de cultivo utilizado para la micropropagación del Agave en la fase de aclimatación, lo que favorecerá o incluso determinará el éxito del establecimiento de las plantas en campo.

II. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general.

Efecto de tres diferentes medios de cultivo en el crecimiento de *Agave Tequilana Weber cv*, azul bajo condiciones *in vitro*; así como en su aclimatación con tres concentraciones de auxinas.

2.2. Objetivos específicos.

- Analizar el comportamiento de *Agave* en tres diferentes medios de cultivo.
- Determinar el mejor medio de cultivo para la propagación de *Agave tequilana* bajo la técnica de cultivo de tejidos.
- Analizar el comportamiento de las plantas de *agave*, durante la fase de aclimatación, aplicando tres concentraciones de auxinas y su efecto de los medios durante dicha fase.
- Determinar la mejor concentración de auxinas durante la fase de aclimatación, contra la velocidad de crecimiento radical y del dosel vegetativo.

III. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1. Propagación de *Agave tequilana*.

Las plantas del género *Agave*, se propagan de forma sexual a través de las semillas y de manera asexual, a partir de, tallos, hojas y raíces. (Hartmann, *et al* 1997).

El *Agave tequilana*, produce aproximadamente de 6000 semillas por planta, sin embargo, presentan algunos problemas importantes como son: bajos porcentajes de germinación, variabilidad genética, el crecimiento y la maduración es heterogénea; haciendo que el ciclo del cultivo se extienda y por ende su explotación (Granados, 1993).

Por su parte, la multiplicación asexual de *Agave tequilana*, mas utilizada por los productores para la producción de plantas, pues es una forma rápida de obtener la materia prima necesaria para el procesamiento de tequila. Se utilizan órganos y/o tejidos vegetativos que conservan su potencialidad de multiplicación y diferenciación celular para generar órganos a partir de cúmulos celulares presentes en el material utilizado. Este tipo de propagación tiene esencialmente tres variantes, que son: 1) La propagación a partir de rizomas, 2) Apomixis vegetativa, y 3) Propagación a través de la técnica de cultivo de tejidos vegetales o micropropagación (Valenzuela, 1994).

Las dos primeras formas de propagación se dan de forma natural y la tercera se induce artificialmente.

3.1.1. Rizomas

La multiplicación a través de rizomas es común en la generalidad de los agaves, los cuales son tallos especializados que se pueden separar. Son tallos etiolados y crecen plagiotrópicamente, con las hojas pequeñas. Los rizomas emergen del tallo principal y son inducidos acrópetamente (Hartmann *et al.*, 1997).

El agave puede producir rizomas a partir del tercer año de ser plantado, sin embargo, hasta el cuarto año tienen la calidad suficiente para realizar nuevas plantaciones (ASERCA, 2000).

3.1.2. Apomixis vegetativa

Se define como la producción de semillas sin fecundación, es el proceso de formación de un embrión dentro de un óvulo de las plantas que producen flores, es decir que en lugar de que ocurra la producción de la flor se produce en el mismo sitio estructuras vegetativas provenientes del tejido ovárico diploide (Hartmann *et al.*, 1997), la floración es necesaria para que esto se produzca.

3.1.3. Cultivo de tejidos

El cultivo *in vitro* de tejidos vegetales es un conjunto de técnicas que permiten producir nuevas plantas en un medio nutritivo artificial en condiciones asépticas con temperatura y luz controladas, a partir de pequeñas porciones de plantas denominadas explantes, tales como embriones, semillas, tallos, ápices, hojas, células individuales, meristemos y granos de polen (Hughes, 1980; Lozoya, 1985; Margara, 1988; Pierik, 1990). Estas técnicas se basan en la totipotencia celular, la cual se define como la capacidad potencial de una célula somática para generar una planta igual a la que le dio origen (George y Sherrington, 1984).

3.2. Investigación en el cultivo *in vitro* del género *Agave*

La investigación en el género *Agave*, no es nueva y desde la década de los 70's, se han realizado trabajos de Cultivo de Tejidos Vegetales de plantas del

género *Agave*. Para *Agave tequilana*, esto ha sido relevante durante la actualidad, a causa del aumento en la demanda del tequila, dentro de los trabajos que se han efectuado en plantas de agave, de diversas especies, encontramos a los de:

Kunisaki (1975) realizó micropropagación de *Cordyline terminalis*, utilizado como medio de cultivo Murashige y Skoog (1962), adicionado con ANA y BA. Obteniendo como resultados brotes múltiples, (formación de raíces) rizogénesis.

Mee (1978) llevó a cabo propagación de *Cordyline terminalis* a partir de callos, utilizando como medio de cultivo Murashige y Skoog (1962), suplementado con ANA y BA, teniendo como resultado brotes múltiples y rizogénesis.

Quintero *et al.* (1981) estudiaron las condiciones de cultivo de células de *Yucca pilifera* y su cuantificación de sarsasapogenina con el medio Murashige y Skoog complementado con (ANA o 2,4-D y BA).

Chua *et al.* (1981) realizaron propagación *in vitro* de *Dracaena manginata* tricolor utilizando el medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) ANA y BA. Obteniendo callos, brotes múltiples, rizogénesis.

Madrigal *et al.* (1981) experimentaron en la propagación *in vitro* de henequén (*Agave froucroydes* Lem). Mediante el medio Murashige y Skoog (1962) ANA y BA. Y obtuvieron callos, brotes y rizogénesis.

Evalddelson y Welander (1995) evaluaron los efectos de la composición del medio en la propagación *in vitro* y desarrollo *in vitro* de *Cordyline terminalis*. Utilizaron como medio el Murashige y Skoog (1962), al 50% de su concentración y adicionado con ANA y BA; obtuvieron como resultado múltiple y rizogénesis.

Gracián-Sandoval y Cruz (1987) investigaron sobre la propagación *in vitro* del mezcal tequilero *Agave tequilana* Weber y como medio de cultivo utilizó el de

Murashige y Skoog al 100% y 50% de su concentración y suplementado con ANA y BA, obteniendo brotes múltiples y rizogénesis.

Nava (1988) elaboro un modelo para el estudio de morfogénesis en *Agave tequila in vitro*. También en el medio de Murashige y Skoog (1962) complementado con ANA y BA. Obteniendo resultados la formación de callos y brotes.

Castro-Concha *et al.* (1990) estudiaron la actividad de la glutamato dehidrogenasa en plantas normales y vitrificadas de *Agave tequilana* Weber propagadas *in vitro*. Utilizando el medio de cultivo el de Murashige y Skoog adicionado con ANA o 2,4-D y BA. Obtuvo formación de callos, brotes y rizogénesis.

Das (1992) realizó micropropagación de *Agave sisalana*. Con el medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) adicionado con ANA y BA teniendo como resultados la formación de brotes a partir de rizomas y rizogénesis.

Podwyszynska y Olsewski, 1995, evaluaron la influencia de los agentes gelificantes en el cultivo *in vitro* de *Cordyline Rosa* y *homalomena*. Utilizando como medio de cultivo a Murashige y Skoog (1962) mas ANA y BA. Dando como resultado a brotes múltiples rizogénesis.

Nikam (1997) observaron la alta frecuencia en la regeneración de brotes de *Agave sisalana*. Con el medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962) ANA y BA. Los resultados obtenidos fueron formación de callos, brotes y rizogénesis.

Atta-Allay Van (1997) llevo a cabo experimentos sobre la micropropagación y establecimiento de *Yucca aloifolia*. Utilizó como medio de cultivo el de Murashige y Skoog (1962) ANA y BA; teniendo formación de brotes múltiples y rizogénesis.

Adrijany *et al.* (1999) observó la Interacción de los iones en la producción de saponina esteroides contenidos en cultivos de callos de *Agave amaniensis*

Inv. Utilizando como medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) ANA y BA se obtienen brotes múltiples y rizogénesis.

Harza *et al.* (2002) observaron la regeneración vía organogénesis de plantas de sisal (*Agave sisalana*), utilizando el medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) ANA y BA, también brotes múltiples y rizogénesis.

3.2.1. El cultivo de tejidos en *Agave tequilana*.

Debido a la crisis en la que se encuentra inmersa la industria tequilera, se buscan mecanismos para subsanar la problemática, por lo cual se iniciaron programas encaminados a la investigación y desarrollo en apoyo a la cadena productiva *Agave-tequila*, contando para ello con los principales centros de investigación del país, siendo uno de los de mayor importancia al Centro de Investigación y Asistencia Tecnológica del Estado de Jalisco (CIATEJ).

De hecho, existen diversos trabajos realizados sobre la biotecnología básica y de aplicación inmediata, consistentes en producir plantas de *Agave* completas, a partir de una sola célula, por diferentes métodos y posteriormente aprovechar esa tecnología para el mejoramiento genético de la planta, como el realizado por Santacruz-Ruvalcaba *et al.*, (1999), quien obtuvo plantas de *Agave tequilana* Weber, a través de embriogénesis somática. Trabajos similares fueron realizados por Portillo (1997), utilizando auxinas, logrando resultados similares.

Por otra parte, Vélez (1997) realizó estudios para la obtención de plantas libres de patógenos causantes de los mayores problemas en el *Agave tequilana* Weber cv azul, en las regiones de Tequila y los Altos de Jalisco, tales como bacterias (*Erwinia* sp) y hongos como *Fusarium oxysporum*, para ello, pusieron en contacto células de *Agave* y algunas preparaciones elaboradas con la bacteria y el hongo respectivamente, para obtener células vivas y sanas, con la capacidad de formar plantas, realizando posteriormente propagación *in vitro*. Con base en lo obtenido por Vélez, Rodríguez-Garay (1996), realizó clonación

masiva *in vitro* de *Agave tequilana* Weber cv. Azul, obteniendo plantas libres de dichos patógenos.

Téllez (2003), desarrollo trabajos para la propagación masiva de *Agave tequilana* Weber cv azul, con diferentes proporciones de $\text{NO}_3:\text{NH}_4$ en el medio de cultivo, encontrando que una relación $\text{NO}_3:\text{NH}_4$ 3:5:1, produce mayor cantidad de brotes sin problemas de vitrificación.

En ninguno de los trabajos realizados en agavaceas y particularmente en *A. tequilana*, se presentaron estudios sobre la fase de aclimatación.

3.3 Importancia del medio de cultivo

El objetivo del medio de cultivo es suministrar al explante los nutrimentos requeridos para el crecimiento. Ramage y Williams (2002) reafirmaron la importancia de las citocininas y auxinas para la inducción de las auxinas para la inducción del callo, multiplicación y formación de órganos en un gran número de especies; sin embargo, hacen notar la importancia de la nutrición mineral para el desarrollo y crecimiento vegetal en la relación a una posible reducción de las concentraciones de los reguladores de crecimiento requerido para ello.

3.3.1 Sales minerales

Cualitativamente, los medios de cultivo aportan los mismos elementos minerales (macro y micro elementos) que se consideran esenciales para el crecimiento de las plantas (Roca *et al.*, 1991). Un mineral esencial es definido como aquel que es crítico o indispensable para una planta para completar su ciclo de vida (Ramage y Williams, 2001). Para poder ser considerado como esencial, un mineral debe contar con tres características: (1) debe ser requerido obligatoriamente para el crecimiento y reproducción; (2) no poder ser sustituido por otro mineral o sustancia; y (3) tener una influencia directa o indirecta en el metabolismo de la planta. Los nutrimentos minerales esenciales

se clasifican en dos grandes grupos, macronutrientes y micronutrientes, dependiendo de la cantidad requerida para el crecimiento vegetal.

Macronutrientes

De la misma manera, estos elementos tienen una gran importancia en el desarrollo *in vitro*, ya que sin aporte no se podría lograr el mantenimiento, desarrollo y proliferación de los tejidos. Cada uno tiene una función específica dentro de la micropropagación (Jiménez, 2004). A continuación se mencionan algunas de las funciones más importantes que cumplen los diferentes macroelementos en las plantas:

a) Nitrógeno (N). Este elemento es de gran importancia, ya que es uno de los constituyentes de las moléculas proteicas; también se encuentran en otras de gran importancia como son las purinas y pirimidinas, las cuales forman parte de los ácidos nucleicos (DNA y RNA), esenciales para la síntesis de proteínas (Devlin, 1980).

En los medios de cultivo, las fuentes más utilizadas para proporcionar nitrógeno son el nitrato inorgánico (NO_3), y el amonio (NH_4), ya sea en forma conjunta o individual (Endress, 1994), siendo el amonio el más rápidamente asimilado en comparación con otras fuentes de nitrógeno como el nitrato (Brand, 1993).

Existe una gran cantidad de estudios referentes a los efectos de este elemento *in vitro*, así por ejemplo, Singha *et al.* (1990) menciona que altos niveles de NH_4 algunas veces se relacionan con procesos de hiperhidricidad. Por otro lado, se ha descubierto una estrecha relación entre la concentración total de nitrógeno en el medio y la proporción entre NO_3 y NH_4 con el desarrollo de embriones somáticos (Jiménez, 2004), a la vez que dichos autores encontraron una alta regeneración de raíces en medios de cultivo con bajos niveles de nitrógeno. Ramage y Williams (2002), mencionaron que las aplicaciones localizadas de nitratos y amoníaco inorgánico estimulan el crecimiento de raíces en cebada.

Autores como Seiskandarajah *et al.* (1990) sugirieron que la proporción entre nitrato de amonio y nitrato de potasio influye en la formación de brotes adventicios a partir de hojas de manzana. Tal parece que niveles crecientes de este elemento y algunos aminoácidos, incrementan significativamente tanto la inducción y crecimiento de callos, como la habilidad regenerativa (Elkonin y Pakhomova, 2000). Un efecto parecido ha sido documentado por Shimasaki y Uemoto (1990), los cuales comprobaron que, para la formación adecuada de raíces a partir de rizomas en *Cymbidium*, se necesitan cantidades reducidas de nitratos de amonio y potasio (Jiménez, 2004).

El nitrato es la principal fuente de nitrógeno para el cultivo de tejidos vegetales, de acuerdo a Ramage y Williams (2002) y de hecho en muchos estudios ha constituido exitosamente la única fuente para la morfogénesis.

En contraposición, cuando el ión amonio es utilizado como la única fuente de nitrógeno parece tener efecto negativo en la morfogénesis; aunque a la vez muchos estudios han mencionado que existen plantas capaces de tolerar el amonio de igual manera que al nitrato, como es el caso del arroz. Asimismo, se ha demostrado que el amonio se puede volver tóxico a los tejidos de las plantas, cuando su concentración en el tejido se vuelve elevada (Brand, 1993); en contraste, otros estudios han demostrado que los cultivos de células pueden proliferar en medios con ión amonio como única fuente de nitrógeno, si el pH del medio se ajusta durante el período del cultivo y el proceso se lleva a cabo en ausencia de algún ácido orgánico (Ramage y Williams, 2002).

Otro factor importante de la nutrición nitrogenada es la influencia que tiene la utilización preferente del NO_3 y NH_4 por el explante, por lo que la cantidad de nitrógeno disponible puede ser de menor importancia en la morfogénesis que la relación entre el NO_3 y el NH_4 , como lo determinaron Ramage y Williams (2002).

b) **Fósforo (P).** En un elemento estructural de los ácidos nucleicos, fosfolípidos y coenzimas NAD y NADP; desempeñando también una función indispensable en el metabolismo energético, en donde la elevada energía de la

hidrólisis del pirofosfato y de diversos enlaces de fosfato orgánico (ATP) se utilizan para el balance de la nutrición fosforada de cultivos *in vitro*.

Es posible para el crecimiento del explante y el desarrollo de su morfogénesis, siendo como fosfato la forma en que este elemento es comúnmente agregado a los medios de cultivo (Endress, 1979); al respecto de las concentraciones de fósforo a utilizar en el medio, existe un estudio realizado por Ramage y Williams (2002), quienes reportan haber obtenido el máximo número de brotes con las concentraciones de fosfato estándar del medio Murashige y Skoog (1962), ya que medios con mayores concentraciones de este ión, pueden generar precipitados y posiblemente limitar la disponibilidad de otros minerales como el Fe_3 y Ca_2 , produciendo un menor número de brotes.

c) Calcio (Ca_2). Una de sus principales funciones es la síntesis de pectina en la lámina media de la pared celular, pero también está involucrado en el metabolismo, formación del núcleo y de las mitocondrias (Bidwell, 1993). Por otro lado, actúa como inhibidor en la síntesis de enzimas relacionadas con los procesos de glucólisis, deposición de fosfolípidos y proteínas dentro o fuera de la membrana plasmática (Endress, 1994).

Jensen *et al.* (1990) reportaron un incremento de casi el doble en el número de embriones somáticos cultivados en suspensiones en *Daucus carota*, debido al incremento en la concentración de calcio que se contrapone al efecto inhibitorio del 2,4-D en la embriogénesis somática.

d) Magnesio (Mg_2). Dos funciones esenciales para las plantas como son la fotosíntesis y el metabolismo glucídico se realizan gracias a la presencia del ión magnesio, el cual forma parte tanto de la estructura química de la clorofila como de varias enzimas que intervienen en el metabolismo glucídico (Devlin, 1980). Bidwell (1979) mencionó que este elemento parece estar implicado en la estabilidad de partículas ribosómicas al enlazar las subunidades que forman el ribosoma, así como en la ligadura de enzima con sustrato, por ejemplo en reacciones que implican transferencia de fosfato desde el ATP.

e) Potasio (K). Este elemento es requerido en gran cantidad por las plantas, ya que desempeña varios procesos catalíticos, los que en su mayoría aún no están claramente definidos (Bidwell, 1979). Es un elemento esencial como activador de enzimas que intervienen en la síntesis de ciertas uniones en el metabolismo peptídico (Devlin, 1980), siendo las regiones meristemáticas de las plantas las zonas donde se encuentran las concentraciones más elevadas de este ión.

El potasio tiene también influencia en el flujo de otros minerales como el nitrógeno, el carbono y el fósforo además de actuar incrementando la traslocación de fotosintatos (Ramage y Williams, 2002). Fischella *et al.* (2000) mencionaron que las bajas concentraciones en suspensiones celulares en zanahoria silvestre disminuyen la formación de embriones somáticos.

Por otro lado, la importancia del papel del potasio es mayormente aclarada por los reportes de Ramage y Williams (2002), quienes observaron que el aumento en la concentración de potasio resultó en la supresión de la morfogénesis, en tanto que Brand (1993), encontró que el potasio tiene relación con el efecto de hiperhidricidad cuando este elemento se encuentra en niveles bajos; y que arriba de la concentración del medio MS la tasa de crecimiento del cultivo disminuía.

f) Azufre (S). El azufre es absorbido por la planta como ión sulfato (SO_4) (Devlin, 1980). Es un elemento con funciones más específicas al ser integrante de aminoácidos sulfurados como cisteína, cistina y metionina; siendo por tanto, un importante constituyente en las proteínas, así como de algunos compuestos de gran actividad biológica como el glutatión, la biotina, la tiamina y la coenzima A (Bidwell, 1979).

Micronutrientes

Los microelementos como el hierro, manganeso, cobre, molibdeno, yodo, cobalto, y níquel son considerados cofactores e inductores de síntesis de enzimas (Endress, 1994) teniendo, por tanto una función catalítica. Estos

elementos sólo son requeridos en cantidades mínimas (Bidwell, 1979), habiendo sido ya demostrado que los micronutrientos incrementan significativamente la regeneración *in vitro* (Ramage y Williams, 2002).

a) Hierro (Fe₃). El hierro es el microelemento que se requiere en mayor cantidad, por lo que ha sido considerado en muchas ocasiones como un elemento mayor. Su importancia radica, por un lado, en el hecho de ser parte del sitio catalítico de muchas enzimas óxido-reductoras y, por el otro, a su papel esencial para la formación de la clorofila (Bidwell, 1979).

Este elemento no puede ser directamente aprovechado de manera satisfactoria en el medio de cultivo, por lo que es necesario agregarlo a través de fuentes más complejas en forma de quelato con EDTA (ácido etilendinitilotetraacético) (Endress, 1994).

b) Otros elementos. Algunos de estos elementos tienen una función catalítica como es el caso de manganeso (Mn₂), que es un activador de enzimas que intervienen en el metabolismo del nitrógeno y en la función respiratoria; el zinc (Zn₂), que intervienen en la síntesis de la auxina IAA; el cobre (Cu₂), que es parte importante de enzimas como las fenolasas, la lacasa y de la oxidasa del ácido ascórbico, en tanto el molibdeno (Mo₄) tiene un efecto sinérgico con el nitrógeno, ya que es el reductor de nitratos y actúa fijando a este elemento.

En cuanto al papel desempeñado por otros micronutrientos, es relevante mencionar que en la propagación *in vitro* se ha encontrado que elementos como el níquel y el cobalto ayudan a estimular la morfogénesis en callo de *Daucus carota* (Ramage y Williams, 2002) y que el incremento en la concentración de CuSO₄ en el medio incrementa la regeneración de brotes de callo. (Ramage y Williams; citado Ramage y Williams, 2002).

3.3.2 Fuentes de Carbono

La mayoría de los cultivos *in vitro* son hererótrofos debido a que las condiciones son poco apropiadas para la fotosíntesis, siendo la razón por la que es necesario agregar una fuente de carbono al medio (Pierik, 1990).

Los azúcares son las fuentes de carbono utilizadas, siendo la sacarosa (en concentraciones del 2-5%) la más frecuentemente incluida en medios de cultivo ya que ésta es sintetizada y transportada naturalmente por las plantas. Algunos de los azúcares más utilizados en propagación *in vitro* se mencionan en el cuadro 1.

Cuadro 1. Fuentes de carbono utilizadas en el cultivo *in vitro*.

Comúnmente utilizados	Escasamente utilizados
Glucosa	Lactosa
Sacarosa	Galactosa
Glicerol	Melaza
Pentosa	Almidón de papa
-----	Almidón de cereal

Fuente: Endress, 1994.

La sacarosa que se encuentra en venta de manera comercial, resulta adecuada para el medio ya que se trata de un producto purificado el cual, según los análisis de los productores, se compone de 99.94% de sacarosa, 0.02% de agua y 0.04% de otras sustancias (Pierik, 1990). Comercialmente se encuentran diferentes tipos de sacarosa, oscuras y claras, las cuales fueron probadas por Kodym y Zapata-Arias (2001) y no encontraron diferencias en las tasas de micropropagación.

3.3.3 Vitaminas

Las vitaminas son compuestos orgánicos que, a bajas concentraciones, desempeñan en el metabolismo celular funciones catalíticas y reguladoras (Devlin, 1980).

Las plantas, al ser organismos autótrofos, son capaces de sintetizar las vitaminas necesarias para su crecimiento; sin embargo, según las investigaciones hechas con explantes que se desarrollan *in vitro*, aparentemente es necesario adicionar de manera exógena algunos de estos compuestos, tal es el caso de vitaminas del grupo B (piridoxina-HCl, ácido nicotínico, tiamina-HCl), glicina (Endress, 1994). Por otro lado, Krikorian (1991), menciona que los aditivos mínimos esenciales son la tiamina, el ácido nicotínico y la piridoxina, aunque se cree que solamente la inclusión de la tiamina, el ácido nicotínico y la piridoxina, sean esencial para el desarrollo del explante (Roca y Morginski, 1991; Krikorian, 1991).

a) Tiamina (B1). Su presencia tiene importancia en el metabolismo celular acentuado como coenzima en la descarboxilación de los acetoácidos (Devlin, 1980). Se sabe que las puntas radicales escindidas son incapaces de sintetizarla y que en el cultivo de tejidos tiene efecto en el estímulo del crecimiento de raíces, habiendo sido igualmente demostrado que su uso resulta adecuado para la inducción de callo (Jiménez, 2002).

b) Ácido Nicotínico (B3). En general se encuentra formado por parte del NADP y del NAD. Glaston (citado por Devlin 1980), reportó que la vitamina B3 tiene un efecto sinérgico con el IAA para la estimulación de raíces laterales.

c) Piridoxina (B6). Almenstrand (citado por Devlin 1980), observó una disminución de la actividad meristemática de raíces aisladas debida a la deficiencia de B6, a la vez que se cree que también puede participar en la síntesis de triptofano y ácido nicotínico.

La glicina, uno de los primeros aditivos orgánicos, se considera actualmente dañino y el inositol por si sólo o en combinación con otros compuestos, estimula la división celular. Otras vitaminas como el ácido pantoténico, biotina, riboflavina y colina pueden ser útiles pero no absolutamente necesarias. De igual forma, el ácido ascórbico puede ser benéfico por su capacidad de actuar

como agente reductor y retrasar la formación de sustancias que inhiben el crecimiento (Krikorian, 1991).

3.3.4 Reguladores de crecimiento

Los reguladores de crecimiento pueden encontrarse de manera natural como hormonas, o ser de origen sintético y tener una actividad semejante a los primeros. Pierik (1990) define a las hormonas vegetales como aquellos compuestos orgánicos sintetizados por las plantas superiores que influyen sobre su crecimiento y desarrollo, actuando generalmente en lugares diferentes a aquél en que se encuentran presentes en cantidades muy pequeñas.

En el cultivo *in vitro* de las plantas superiores, los reguladores de crecimiento son de vital importancia ya que sin éstos es casi imposible el crecimiento y desarrollo de los explantes, aunque se han encontrado casos en los que se puede obtener el resultado deseado en ausencia de éstos (Roca y Morginski, 1991). Las auxinas y las citocininas, específicamente, juegan un papel muy importante en este tipo de cultivos y la adición de una u otra dependen del tipo y especie vegetal (Pierik, 1990).

Auxinas.

Son sustancias capaces de producir alargamiento celular y expansión de los tejidos, división celular (formación de callo), formación de raíces adventicias, inhibición de la formación de vástagos tanto axilares como adventicios y, frecuentemente, embriogénesis en los cultivos en suspensión. A bajas concentraciones predomina la formación de raíces adventicias y a altas la formación de callo (Pierik, 1990; Krikorian, 1991).

Entre las sustancias utilizadas se encuentran las de origen natural, como el ácido indolacético (IAA) de baja actividad y altamente fotosensible y de las producidas de manera sintética, las cuales ejercen un efecto fisiológico similar

como son: el ácido indolbutírico (IBA), al ácido neftalenácetico (NAA) y el ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D). Al respecto, Pierik (1990) recomienda limitar la utilización del 2,4-D al máximo ya que éste puede inducir mutaciones, además de inhibir la fotosíntesis.

Citocininas

Son sustancias que promueven el crecimiento y desarrollo estimulando la división celular, sobre todo cuando se encuentran en compañía de una auxina (Pierik, 1990). En concentraciones elevadas (1-10 mg.l⁻¹) pueden inducir a la formación de vástagos adventicios debido a que disminuyen la dominancia apical y de igual forma, generalmente inhiben la formación de raíces, retardan el envejecimiento y tienen influencia en la diferenciación de los tejidos (Jiménez, 2004).

Las citocininas interactúan con las auxinas mostrando expresiones diferentes de crecimiento (Jiménez, 2004). Skoog y Miller (1957), demostraron *in vitro* que cualquier cambio en el equilibrio auxinas-citocininas pueden afectar las expresiones del crecimiento. Cuando la proporción con respecto a las auxinas es menor, se produce el desarrollo de raíces, pero cuando ésta es mayor, se desarrollan brotes y cuando la relación es intermedia, se presenta el desarrollo de tejidos de callo no diferenciado.

3.4 Importancia de la fase de aclimatación.

La aclimatación es una fase inmediata al cultivo *in vitro*, en donde las vitroplantas* son conducidas para establecerlas o trasplantarlas a condiciones *ex vitro* para su paulatina adaptación a los factores que inciden en ella como luz, humedad y temperatura, de lo cual dependerá la supervivencia de las plantas (Preece y Sutter, 1991).

* Una vitroplanta es una planta en miniatura que se obtiene en un tubo de ensayos y permite mejorar o reproducir semillas para la agricultura

3.4.1 Luminosidad

Las características de radiación lumínica que influyen en el desarrollo de las plantas en general son clasificadas en intensidad, calidad y longitud, en el periodo diario de exposición (Pierik, 1990).

Durante la fase de aclimatación se debe considerar la intensidad de la luz a la que estuvo sometida la planta *in vitro*, la cual es menor a la del medio externo, teniendo un cambio de $56 \mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$ en un cuarto de incubación, a $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$ en un día soleado en condiciones naturales, el manejo adecuado de la intensidad lumínica permitirá a las microplantas aclimatarse a las condiciones del medio ambiente externo más rápidamente (Reyes *et al.*, 1996; Kubota y Rajapakse, 1996). En general, se ha observado que las plantas producidas por cultivo de tejidos una vez trasplantadas muestran un mejor desarrollo y mayores porcentajes de supervivencia, si al principio se mantiene la intensidad lumínica baja $100\text{-}150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$ (Granada, 1990; Guerrero, 2000).

Las plantas *in vitro* normalmente no crecen autotróficamente y por eso no requieren alta radiación; sin embargo, a medida que las plantas están sometidas al proceso de aclimatación, requieren altos niveles de luz debido a que éstas se ven obligadas a sintetizar sus propios carbohidratos (Seibert y Kadkade, 1982). Como consecuencia, en las hojas de plantas *in vitro* se observan algunas modificaciones anatómicas, morfológicas y fisiológicas al ser transferidas a otro medio con intensidades de luz mayores; por ejemplo los cloroplastos tienden a alargarse, en las hojas disminuyen los espacios intercelulares, aumentan la cantidad de estomas por unidad de área y se

incrementa la cantidad de cera y la complejidad morfológica de las mismas (Montie, 1981; Darnell y Ferre, 1983; Fabbri *et al.*, 1996).

En trabajos realizados con una intensidad de luz de $140 \mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$, se determinó un incremento en la cantidad de clorofila, así como un aumento en el tamaño relativo de células del mesófilo y una mayor acumulación de materia seca y del área total de hoja (Reyes *et al.*, 1996; Kubota y Rajapakse, 1996), en tanto que Maesato *et al.*, (1994), encontraron un aumento de biomasa cuando se modificó la intensidad de luz de $7.3 \mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$ a $15.4 \mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$ un mes después de su transferencia, y cuando se mantuvo solamente una de las dos intensidades de luz durante toda la fase de aclimatación, no se presentó ninguna respuesta en plantas de *Lilium japonicum* producidas *in vitro*; Wulster *et al.*, (1997) observaron en plantas de *L. longiflorum* alteraciones morfológicas de las hojas a una intensidad de luz de $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$.

La luz es importante desde la etapa *in vitro*, en Lilium se ha encontrado mayor formación de bulbos al someterlos a tratamientos con mayor número de horas luz que en aquellos donde se tuvo mayor número de horas oscuridad (Jeong y Lee 1996; Lim *et al.*, 1998) y Capellades *et al.*, (1990), observaron en *Rosa multiflora* que el número de estomas y la longitud de las células epidérmicas de la parte abaxial y adaxial de las hojas fueron mayores cuando se establecieron *in vitro* con una intensidad de luz de $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$ y 75% de humedad relativa en comparación con aquellas que se sometieron a una intensidad $25 \mu\text{mol m}^{-2}$ de luz y 100% de humedad relativa.

Laforge *et al.*, (1991) estudiaron la influencia de la luz (0, 125 y $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$), de densidad de flujo fotónico fotosintético (DFFF) y del CO_2 (330, 1650 y $3000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$) aplicados en el enraizamiento *ex vitro* de tres especies (fresa, frambuesa y espárragos); en la etapa de aclimatación, determinaron que la mayor concentración de CO_2 aplicado *in vitro* a brotes, incrementaron el peso seco de la planta en 26% y redujo en dos semanas el período de aclimatación, observando una interacción lineal y cuadrática para la intensidad de luz y concentración de CO_2 respectivamente, tanto para peso seco de la hoja, como para área foliar y número de hojas y aunque el peso seco

acumulado se incrementó significativamente para los niveles de mayor intensidad de luz y CO₂, la respuesta se debió al efecto de este último. De la misma forma, encontraron una tendencia similar para el área foliar y la concentración del CO₂, sin embargo para el primero determinaron que a 330 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$ y 125 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$ de DFFF la respuesta fue óptima, mientras que el número de hojas favoreció a altos niveles de DFFF.

Dejardins *et al.* (1987), Estudiaron el efecto del CO₂ (a 330, 900 y 1,500 ppm.) y de la intensidad lumínica (condiciones externas y 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$), en plántulas de fresa durante la aclimatación, observaron que las mayores concentraciones de CO₂ favorecieron el peso seco de la raíz y del brote y la intensidad lumínica afectó el peso seco de la hoja y de la raíz desde los 10 primeros días. Estos resultados favorecieron una reducción en 15 días a la etapa de aclimatación, obteniéndose la mejor respuesta con 900 ppm de CO₂ y 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$ de intensidad lumínica.

3.4.2. Humedad

La humedad relativa es considerada como el factor que más afecta a la aclimatación de plantas producidas por cultivo de tejidos. Las plantas originadas *in vitro* tienen la cutícula escasamente desarrollada debido a la alta humedad relativa del medio 90-100%, por consiguiente al transferir la planta *in vitro* se produce una transpiración cuticular extra por la diferencia de humedad, por lo que se requiere un cambio gradual durante la adaptación de las plantas, de lo contrario se marchitan y eventualmente mueren (Preece y Sutter, 1991; Granada, 1990; Ghashghaie *et al.*, 1992).

La supervivencia y desarrollo de la plantas procedentes del cultivo *in vitro* aún es un problema para algunos cultivos. Las plantas que se transfieren del tubo de cultivo al invernadero o campo, deben someterse a un programa de endurecimiento gradual con períodos de disminución de la humedad relativa. A pesar de que existen protocolos de aclimatación en donde se usa nebulización

intermitente, frecuentemente ocurren pérdidas significativas, particularmente en especies leñosas de dicotiledóneas (Capellades *et al.*, 1990).

Durante la aclimatación es muy importante considerar las condiciones ambientales que se encuentran dentro del tubo, ya que se presentan cambios del 40 hasta el 60% de las condiciones *in vitro* a *ex vitro* (Read y Fellman, 1985). Con los sistemas de microaspersión, además de mantener una alta humedad relativa, también se incrementa el contenido de humedad del sustrato debiéndose procurar que no sea muy alta, ya que se pueden provocar niveles anormales de O₂ y CO₂, lo que inhibirá el crecimiento de las plantas en proceso de adaptación. En general, es recomendable que una vez trasplantadas, se coloquen en un ambiente cerrado para mantener con mayor eficiencia una alta humedad relativa, sin necesidad de incrementar el contenido de humedad en el sustrato.

La supervivencia de los tejidos cultivados *in vitro* después de sacarse del medio de cultivo, puede depender del balance de los factores que involucran las características de las plantas para el transporte de agua, que están relacionados con el incremento en longitud y el contacto que tienen las raíces con el agua, pudiendo ser importante que la supervivencia dependa de una regulación estomática o cuticular (Shackel *et al.*, 1990). Debergh y Maene (1981), indica que la falta de cierre estomático, durante el cultivo de tejidos, es la causa de la deshidratación de las plántulas en la fase de aclimatación, lo cual puede atribuirse al desarrollo anormal de las microfibrillas de las células guarda de las hojas desarrolladas *in vitro*.

Wardle *et al* (1983), indican que a una humedad relativa del 45% las plantas de crisantemo *in vitro* tuvieron una alta mortalidad (cerca del 70%), debido a un severo retraso en el desarrollo de estomas, por lo que su diferenciación celular fue menor que aquellas que se desarrollaron en humedades relativas altas (90%). Brainerd y Fuchigami (1981), encontraron que durante la fase de aclimatación de manzano se presenta mayor supervivencia cuando las plantas son sometidas a condiciones de humedad relativa baja (30 a 40%) en un lapso de 4 a 5 días posteriores a la transferencia, observando mejor respuesta estomática y un mayor desarrollo de las plántulas.

Arellano y González (1985), registraron la supervivencia a los 30 y 60 días después del trasplante en ciruelo y fresa; en ciruelo a los 30 días se obtuvo 81% y en fresa 77%, mientras que a los 60 días en fresa fue de 71% y para ciruelo en 69%. En contraste, los resultados de supervivencia obtenidos en fresa por Acosta (1993), fueron casi del 100% en los tratamientos probados, por lo que indica que esta especie no tiene problemas; sin embargo la concentración de NH_4NO_3 durante el cultivo *in vitro* repercutió en el desarrollo de las plantas durante su aclimatación.

En conclusión, se puede mencionar que el valor de la humedad relativa (en promedio 100%) es de suma importancia durante los primeros 30 días de la aclimatación, siendo el factor determinante en la supervivencia de las microplantas. Cabe señalar que en este período es donde se resisten con mayor grado los cambios en los intervalos de humedad, favoreciendo o no el éxito del experimento. Pasando este período la humedad relativa se considera como un factor complementario, ocupando mayor jerarquía los nutrimentos.

3.4.3. Temperatura

La mayoría de los autores han considerado que la temperatura es un factor importante pero complementario; temperaturas altas o bajas, así como las fluctuaciones muy drásticas pueden dar como resultado un crecimiento muy irregular. El desarrollo de raíces puede acelerarse con el uso de camas calientes, especialmente cuando la temperatura del ambiente es baja. Se ha recomendado regular la temperatura del invernadero con el empleo de un termostato cuando se cuenta con instalaciones automatizadas, es decir, invernaderos con muro húmedo, extractores y calefacción (Wardle *et al.*, 1983). Lilien-Kipnis y Kochba (1987), consideran que la supervivencia de las plántulas de gladiolo después de transferirlas a suelo, dependió de la temperatura, encontrando que a 27°C ninguna plántula enraizó y las raíces formadas *in vitro* murieron. Después de tres semanas, alrededor del 56% de las plantas que sobrevivieron no mostraron crecimiento y el follaje presentó clorosis. A 17°C todas las plantas sobrevivieron, las raíces crecieron y emergieron nuevas

hojas. Posteriormente, las plantas se desarrollaron a una temperatura ambiente de 27 a 28°C diurna y 19 a 21°C nocturna, presentando del 84 al 92% de arraigo. Resultados similares se han encontrado en lechuga (Koevary, *et al.*, 1978) y frambuesa (Palonen y Buszard, 1998) donde se reportó mayor supervivencia durante la fase de aclimatación, cuando las plantas fueron tratadas inicialmente con temperaturas entre 15 a 18°C, aunque no consideraron que la temperatura fuera el único factor que interviniera en este comportamiento.

En plántulas de calabaza (*Cucumins sativus* L.), Burke y Oliver (1993) observaron que la temperatura óptima de incubación fue entre los 20 y 25°C, ya que con temperaturas inferiores o superiores se afectó la actividad enzimática involucrada en procesos de fijación de carbono.

3.4.4. Sustratos

Las mezclas de sustratos a usar en el trasplante (musgo, agrolita, vermiculita, arena, tierra de hoja, etc.) influyen en el porcentaje de supervivencia y en el subsecuente desarrollo de las plantas. Las distintas especies pueden desarrollarse bien en diferentes sustratos, sin que exista una norma general para todas las plantas con respecto a que sustrato utilizar; sin embargo, es aconsejable utilizar los métodos convencionales de propagación vegetativa (Granada, 1990).

En la mayoría de las plantas es importante que el sustrato sea poroso, con buen drenaje, buena aireación y con un pH adecuado. En general el sustrato debe contener al menos 50-60% de materia orgánica, el pH se debe mantener entre 5.5 y 6.5 (Granada, 1990; Rogers y Tija, 1990).

Si bien las plantas pueden tener alguna capacidad genética de resistencia a enfermedades, cuando son sacadas de los recipientes de cultivo *in vitro*, son muy susceptibles al ataque de patógenos. Por tanto, la esterilización del sustrato y contenedores, son muy importantes. Con frecuencia se utilizan

fungicidas para prevenir el ataque de hongos durante el proceso de adaptación, los cuales se aplican directamente al sustrato o bien a las plantas antes y/o después del trasplante (Granada, 1990).

Existen diferentes ingredientes que pueden ser combinados para lograr un sustrato apropiado para las plántulas, tomando en cuenta que estas presentan raíces pequeñas y delicadas y requieren sustratos de textura fina. Las mezclas empleadas más comúnmente contienen aproximadamente 50% de turba más perlita, vermiculita o agrolita, con tierra de hoja previamente esterilizada. Después del establecimiento en la cámara, las plantas están listas para el trasplante en macetas más grandes (Wardle *et al.*, 1983).

En zarzamoras se obtuvo el 4.3% de supervivencia de plantas enraizadas *in vitro* después de trasplantadas en turba, mientras que los brotes sin raíz trasplantados y enraizados directamente en turba, sobrevivieron el 71% (Skirvin y Chua, 1981). Rugini y Fontanizza (1981), reportan que en la transferencia a suelo de plantas enraizadas *in vitro* y colocadas en bloques de turba de 11 x 46 mm obtuvieron el 100% de supervivencia.

Damiano (1980) mencionó que los mejores resultados los obtuvo con turba con un pH de 5.5 a 7. Asimismo, Linenberger (1983) señala que después de 21 días microestacas de cerezo cv Hally Jolivette enraizaron *in vitro* el 78% y su supervivencia en el suelo en una mezcla sin esterilizar de turba y perlita 1:1 (v/v) fue mayor, sin embargo, en aquellas plantas que enraizaron *in vitro* presentaron el 80% de supervivencia.

3.5 Características de las plantas propagadas *in vitro*.

La anatomía y fisiología de las plantas propagadas *in vitro* presentan alteraciones en sus características y procesos, con relación a las plantas que crecen en ambientes naturales, por lo que se hace necesaria una gradual adaptación o aclimatación a las condiciones naturales medioambientales que

favorezcan un crecimiento normal de las plantas (Read y Fellman, 1985; Debergh y Maene 1991).

Durante el cultivo de tejidos, los explantes son confinados a un ambiente casi o totalmente hermético y controlado, lo que puede ocasionar modificaciones tanto en la composición de los gases de la atmósfera del frasco de cultivo, como en la morfología, anatomía y fisiología de las plantas (Cournac *et al.*, 1991; Dube y Vidaver, 1992; Yue *et al.*, 1992).

En general, las plantas no presentan cambios morfológicos observables a simple vista, sin embargo, se ha encontrado que las vitroplantas no llegan a presentar algunas características como pubescencia en la lámina foliar y su tamaño y grosor es comparablemente menor al de las plantas formadas por condiciones naturales (Guerrero, 2000), pero al observar la anatomía de las plantas, se encuentran grandes diferencias como el grosor de cutícula, menor número de vasos del sistema de conducción y células menos isodiamétricas, entre otras características.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Características del área de investigación

La presente investigación se realizó en dos fases; la primera fase se llevó a cabo en el laboratorio de cultivo de tejidos, la segunda etapa se llevó a cabo en uno de los invernaderos de cubierta plástica de la facultad, ambas áreas de investigación pertenecen a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán de la Universidad Nacional Autónoma de México, en el municipio de Cuautitlán Izcalli, Edo. de México, ubicada en los paralelos 19° 27" y los 19° 45" de la latitud norte y entre los 99° 07" y 99° 14" de longitud oeste; a una altura promedio de 2250 msnm; con un clima C (wo) (w) b (i), según Köppen modificado por García (1981), clima templado el más seco de los subhúmedos con un régimen de lluvia en verano y un bajo porcentaje de lluvias en invierno (menor al 5% del total), con una temperatura media anual de 19° C, siendo el mes más frío Enero y el más cálido Mayo, con una precipitación anual de 600 mm (Arellano y González 1985).

4.1.1 Fase de Laboratorio

La primera fase (*in vitro*) se realizó en el laboratorio de Cultivo de Tejidos de la FES-C en el departamento de Ingeniería Agrícola el cual cuenta con las instalaciones y equipo necesarios como campana de flujo laminar de aire filtrado, Área de Incubación con un sistema de iluminación, donde la temperatura que se mantenía era en promedio de 24 °C.

4.1.2 Fase de Invernadero

La segunda fase, (fase *ex vitro*) de este experimento se llevó a cabo en un invernadero tipo dos aguas, con cubierta de cristal, utilizando en su interior malla sombra de 35% de reflexión de luz.

4.1.3 Material Vegetativo

Se utilizaron vitroplantas de *Agave tequilana* var. Azul obtenidas previamente *in vitro*, a partir de brotes de hijuelos de rizoma, en el medio de cultivo de Cruz-Pizarro (2000), (tabla 2), de 6 semanas en tubo, de las cuales se obtuvieron los brotes para así realizar el trasplante a nuevos tubos con medios de diferente composición de MS al 100%, MS al 50% y el medio de cultivo Cruz Pizarro.

4.1.4 Sustratos

De acuerdo a las características físico-químicas que presentan los sustratos y en trabajos similares sobre aclimatación, se decidió utilizar una mezcla de turba (Peat moss) y agrolita en una proporción 3:1 v/v, con la finalidad de mantener suficiente humedad en el medio de anclaje y proporcionar cierta cantidad de nutrimentos derivados del sustrato orgánico (turba).

4.2. Diseños experimentales

Se utilizaron dos diseños experimentales, ya que se evaluaron diferentes variables se utilizó un diseño experimental completamente al azar. Para la fase de laboratorio o fase *in vitro*, el segundo diseño experimental fue del tipo bloques al azar, que se utilizó en la segunda fase, de campo o fase *ex vitro*.

4.2.1 Diseño experimental de la fase *in vitro*

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar, con tres tratamientos utilizando diferentes concentraciones nutritivas M.S. al 100%, M.S. al 50% y Cruz-Pizarro, se establecieron siete repeticiones por tratamiento considerando como unidad experimental una planta, lo cual generó 21 unidades experimentales (Anexo 1).

4.2.2 Diseño experimental de la fase *ex vitro*

Se utilizó un diseño experimental, del tipo bloques al azar, con tres diferentes concentraciones de Radix, las concentraciones utilizadas fueron, R-1,500 ppm, R-5,000 ppm y finalmente R-10,000 ppm. Para ello se utilizaron dos plantas por concentración, radix, tomando en cuenta las diferentes concentraciones nutritivas utilizadas en la fase *in vitro*, esto quiere decir que por cada solución nutritiva utilizada en la fase *in vitro* se usaron las 3 concentraciones de radix, teniendo un total de 6 plantas por cada solución nutritiva y con las tres concentraciones, dando un total de 18 plantas utilizadas para la fase *ex vitro*. Asimismo se evaluaron las mismas parámetros de evaluación que en la fase *in vitro*. (Anexo 2). (Ambos diseños experimentales se llevaron acabo conforme a los diseños experimentales en Microsoft Office Excel 2007). Para las dos fases se evaluó:

- Número de hojas
- Altura de planta
- Tamaño de Raíz

4.3 Parámetros de evaluación

En ambas fases se consideraron los índices de cultivo y crecimiento de nuevos tejidos de hoja y tallo, por tanto, se realizándose ocho evaluaciones con intervalos de siete días durante la fase de cultivo *in vitro* considerando número y longitud de hoja; tamaño de raíz, también se hicieron las mismas evaluaciones de las variables arriba mencionadas en la fase de aclimatación, realizando cinco evaluaciones con un intervalo de siete días.

4.3.1 Número de hojas

El registro inicial de datos para esta variable se llevo a cabo antes de efectuar el trasplante, obteniendo el registro de los datos cada siete días, posteriormente al trasplante se realizó la misma actividad, contabilizando únicamente las hojas totalmente separadas del cogollo. Todos los datos fueron considerados para determinar su comportamiento, pero únicamente la diferencia entre la medición inicial y final se analizó estadísticamente.

4.3.2 Longitud de planta

La primera medición se hizo a la primera semana del establecimiento de la planta *in vitro* realizándose posteriormente cada siete días, una vez terminada esta fase se llevo a cabo el trasplante, después del cual se continuó con la medición a la tercera semana del mismo, para lo cual se utilizó un vernier; la altura de planta se tomó de la base hasta el ápice de las hojas (espiga apical). Los resultados de cada muestro fueron considerados para determinar el crecimiento relativo y el comportamiento del crecimiento.

4.3.3 Tamaño de raíz

Para esta variable la medición fue llevo a cabo de dos formas, la medición realizada en la fase *in vitro* se colocó el tubo sobre una hoja de papel milimétrico para así obtener la longitud en cada planta. En la fase *ex vitro* se determinó por el método de Bohn (1979), colocando las raíces deben ser colocadas en una charola de cristal con papel milimétrico en el fondo, contabilizando las intersecciones de las raíces con la cuadrícula y aplicando la formula siguiente:

$$R = N \times UC \times 0.7857$$

Donde:

R = Longitud de raíz en cm

N = Número de intersecciones

UC = Unidad de la cuadrícula (0.5 cm)

4.4 Manejo agronómico

4.4.1 Trasplante

Se extrajeron las plantas del medio de cultivo, lavando las parte basal de las vitroplanta, para eliminar los residuos del medio de cultivo, posteriormente se eliminaron las raíces formadas durante la fase *in vitro* y se sumergieron en una solución fungicida (Captan a razón de 3.5 gL^{-1}) durante 10 segundos, finalmente se aplicaron auxinas en tres concentraciones: 1,500, 5,000 y 10,000 ppm de radix, con la finalidad de promover el desarrollo de un nuevo sistema radical y así asegurar un mayor porcentaje de arraigo.

Posteriormente se trasplantaron en macetas de plástico 4" de diámetro, cubriéndolas con bolsas de plástico transparente durante los primeros 7 días para mantener la humedad relativa alta y evitar la deshidratación y muerte de las plantas.

4.4.2 Riegos

Se aplicó un riego ligero diariamente, con un gasto de $40 \text{ ml por planta}^{-1}$, desde el inicio hasta el final de la investigación. Aplicándose 20 ml por la mañana y 20 ml por la tarde, medios con una probeta.

4.4.3 Control fitosanitario

Las condiciones ambientales del invernadero con elevada HR y temperatura, son idóneas para el desarrollo de enfermedades fungosas, por lo que se realizó en forma preventiva, la aplicación de fungicida cada siete días, (Captan 3 gL^{-1}). Se preparo en una cubeta con capacidad de 10 litros, agregando dos litros de agua con 6 gramos de captan agitándose y se aplico con un atomizador con capacidad de un litro.

V. RESULTADOS Y ANÁLISIS

5.1 Fase *In vitro*

Al realizar el análisis de varianza, de los diferentes parámetros que fueron evaluados durante la fase *in vitro*, no se encontró diferencia significativa entre tratamientos (Anexo 3); a pesar de ello, se lleva a cabo un análisis del comportamiento de cada variable, estableciendo las diferencias que presentan las plantas sometidas a los diferentes tratamientos considerando los muestreos semanales hasta la culminación de la investigación.

5.1.1 Número de hojas

En cuanto a la variable número de hojas, (Cuadro 2). Se encontró que en todos los tratamientos existió un incremento progresivo, siendo las plantas del tratamiento en solución MS 50%, las que presentaron el mayor número de hojas desde la primera semana, lo cual se mantuvo esta tendencia, aunque con variaciones hasta el final de los muestreos, donde presentaron entre 7 y 8 hojas en promedio, con una diferencia de 37% y 55% superior a las plantas tratadas con los medios Cruz-Pizarro y MS 100, respectivamente.

Cuadro 2. Comportamiento del número de hojas en ocho muestreos semanales de plantas de *Agave tequilana*, sometidas a tres medios de cultivo *in vitro*.

Número de hojas			
Semana	Cruz-Pizarro	MS 100 %	MS 50 %
1	1.57	1.28	1.71
2	2.57	2.14	2.28
3	2.85	3.14	2.85
4	3.71	3.00	3.85
5	3.71	2.85	5.00
6	3.57	2.14	5.14
7	3.42	3.14	5.57
8	4.85	3.42	7.71

Las deficiencias de nutrientes en una planta alteran el comportamiento en el crecimiento de las mismas, de igual forma si existe un exceso de los mismos pues entre ellos existen sinergias y antagonismos, ocasionando

malformaciones y hasta la muerte de las plantas. De tal forma aquellas plantas que fueron tratadas con MS 100, a pesar de ser la solución que contiene mayor cantidad de nitrógeno, tuvieron el menor número de hojas, lo cual pudo ocurrir por que pudieron generar que al haber un exceso de nitrógeno, para una planta de lento crecimiento como son las agaváceas, en lugar de existir la formación de nuevos órganos, se alteran las funciones normales de la planta por exceso de nutrimentos que al tener que transformarse para poder ser almacenados o utilizados, el vegetal tiene que ocupara la energía para lograr estos procesos y por ende no existe el crecimiento esperado. Comparando los medios de cultivo, un elemento que es evidente su mayor concentración en MS 100, es el nitrógeno siendo estas las plantas que tuvieron menor crecimiento; mientras en el medio Cruz Pizarro que presenta la menor concentración de este compuesto genero plantas con una altura intermedia. (Cuadro 3).

Cuadro 3. Diferencias entre plantas de *Agave tequilana* Weber, obtenidas *in vitro*, bajo tres diferentes medios de cultivo.

Tratamientos	Número de Hojas	Altura de Planta (cm)	Tamaño de Raíz (cm)
M. S. (1962)al 50%	7.71	7.61	6.28
Cruz-Pizarro (2000)	4.85	7.57	8.42
M. S. (1962)al 100%	3.42	7.08	6.57

5.1.2 Altura de planta

En cuanto a la altura de planta se refiere el comportamiento fue muy similar al del número de hojas, desde el inicio del experimento, en la cual el tratamiento Cruz-Pizarro las plantas iniciaron teniendo una mayor altura hasta la segunda semana (Cuadro 4); sin embargo, al finalizar los muestreos, las plantas tratadas desarrolladas en esta solución, tuvieron en promedio una ganancia en altura ligeramente a las tratadas con M.S. al 50%, las cuales superaron solo alrededor de un 0.6% y 7% más que las cultivadas con la solución Cruz-Pizarro y M.S. al 100%, respectivamente. De tal forma, al realizar el análisis de varianza correspondiente, se encontró que no existe diferencias significativas

entre tratamientos a pesar de que se utilizaron medios de cultivo con diferencial importante en la concentración de macronutrientes, la posible razón de dicho comportamiento puede deberse a una condición genética de la especie, pues la altura no está relacionada directamente con la distancia de los entrenudos como en otras especies, sino con el tamaño de las hojas, de tal forma, las hojas; crecieron a un tamaño estándar según el tiempo de vida de las mismas, el cual fue el mismo en todos los tratamientos.

Cuadro 4. Promedios finales de la altura de planta de *Agave tequilana* Weber.

Incremento de altura en cm			
Medio de Cultivo			
Semana	CP	MS 100 %	MS 50 %
1	3.5285	3.1714	4.0571
2	6.5714	4.9000	6.5857
3	6.8714	6.0285	6.9714
4	6.9428	6.6428	7.2000
5	7.0285	6.800	7.3428
6	7.1857	6.8142	7.4142
7	7.4142	6.9000	7.600

5.1.3 Crecimiento de raíz

Con referencia al crecimiento de la raíz se puede observar que en todos los casos se tuvo un incremento semanal muy similar (Cuadro 5), aunque las plantas que tuvieron mayor longitud de raíz a partir de la segunda semana hasta el término de los muestreos en la octava semana fueron las tratadas con el medio de cultivo Cruz-Pizarro, de hecho, presentando un mayor tamaño de raíz que las plantas tratadas con MS al 100 al 50%. Por el comportamiento presentado por todas las plantas los datos reflejan que el medio de cultivo Cruz-Pizarro (2000) favorece el crecimiento de raíz aunque demerita el número de hojas y la altura de planta; al contrario, las plantas tratadas con MS al 50% presentan el menor tamaño de raíz aunque mayor tamaño del área foliar. La respuesta de un órgano de la planta no puede verse en forma aislada sino que existe una interrelación entre el desarrollo de unos y otros generando competencia nutricional, de tal forma al existir un mayor crecimiento de la parte subterránea de la planta puede generar un menor crecimiento de la parte

aérea como lo que puede observarse en la respuesta a los medios de cultivo Cruz Pizarro y MS 50 respectivamente.

Cuadro 5 Registros obtenidos en la medición de la
crecimiento de la raíz de la planta de *Agave tequilana* Weber.
Incremento

Crecimiento de raíz			
Semana	CP	MS 100 %	MS 50 %
1	1,4286	2,2857	2,4286
2	5,1429	5,0000	5,2857
3	7,4286	5,0000	5,2857
4	7,5714	5,1429	5,4286
5	7,7143	5,2857	5,4286
6	8,1429	6,1429	5,5714
7	8,4286	6,1429	6,0000
8	8,4286	6,5714	6,2857

Nota: para la fase *ex vitro* las mediciones se iniciaron 3 semanas después del trasplante ya que al inicio del mismo las plantas no contaban con raíz

5.2 Fase *ex vitro*

Al realizar el análisis de varianza, de los diferentes parámetros que fueron evaluados durante la fase *ex vitro*, (Anexo 4); con relación a los resultados obtenidos en las diferentes variables de los tratamientos efectuados durante la fase de aclimatación, donde se llevó a cabo la aplicación de diferentes concentraciones de auxinas, se obtuvieron los comportamientos siguientes:

5.2.1 Número de hojas

Al realizar el análisis de varianza para esta variable, no se encontró respuesta de enraizamiento; sin embargo, cabe mencionar que las plantas obtenidas *in vitro* y que se colocaron bajo condiciones de aclimatación, se presentó una pérdida significativa de hojas en aquellas que fueron tratadas con radix 1500, lo cual pudo deberse a que al existir menor formación de raíces no se tuviera con respecto a la parte aérea no se tuviera un abasto para cubrir las necesidades de la planta y por ende se presentó la pérdida de las hojas. En las plantas de

los otros tratamientos, se presentó un incremento en el número de hojas, con respecto a las formadas *in vitro*, a excepción de MS 50%, donde algunas plantas perdieron una hoja.

Se puede observar que, en promedio las plantas tratadas con MS a 50% tuvieron un mejor comportamiento durante la fase de aclimatación, en lo referente al incremento de formación de hojas, pues obtuvo mayor ganancia que las plantas tratadas con MS al 100% (Cuadro 6) y en comparación con las tratadas con medio Cruz-Pizarro, solo las superaron de la concentración de radix. De tal forma, que se puede precisar, que para esta parametro, los medios de cultivo si tienen una influencia directa en la respuesta durante la fase de aclimatación.

En lo referente a la acción de auxinas como enraizador, las plantas que fueron tratadas con la mayor concentración (radix 10,000), desarrollaron mayor número de hojas, lo cual pudo deberse a una rápida formación de raíces y con ello tener una mayor adaptación a las condiciones ambientales externas permitiendo un desarrollo normal en comparación con las plantas de los demás tratamientos.

Cuadro 6 Número de hojas en *Agave tequilana* Weber cv. Azul, obtenidas *in vitro* en diferentes medios de cultivo y diferentes concentraciones de radix.

Semana	Medios de Cultivo								
	radix 1,500			radix 5,000			radix 1000		
	C-P	MS 100%	MS 50%	C-P	MS 100%	MS 50%	C-P	MS 100%	MS 50%
0	4.85	3.42	7.71	4.85	3.42	7.71	4.85	3.42	7.71
1	2.50	1.00	3.50	5.67	3.67	7.67	7.00	6.67	6.33
2	3.50	1.33	4.00	6.67	3.67	8.33	7.00	7.00	7.00
3	4.00	1.33	4.67	6.67	4.67	9.33	8.00	7.50	8.67

4	4.67	2.50	4.67	7.33	4.67	10.67	8.67	8.67	9.33
5	5.33	2.67	5.33	8.00	5.33	10.67	10.00	10.00	10.33

5.2.2 Longitud de planta

Al realizar la comparación de medias para esta variable, se encontró diferencia estadística, se encontró que las plantas tratadas con Cruz-Pizarro durante la fase *in vitro* y tratamiento con radix a 5,000 ppm, durante la aclimatación tuvieron el mejor comportamiento, pero fueron estadísticamente similares a las plantas tratadas con MS al 50 % con 5,000 ppm, así como a Cruz Pizarro y MS al 100%, ambos a 10,000 ppm de radix. A su vez MS al 50% con 5,000 ppm de radix fue estadísticamente similar a todos los tratamientos a excepción de las plantas provenientes del medio Cruz Pizarro y MS al 50%, ambos con la adición de 1,500 ppm de radix. Asimismo a partir de las plantas tratadas con el medio de cultivo Cruz Pizarro y a una concentración de 10,000 ppm todos los tratamientos resultaron estadísticamente similares entre sí (cuadro 7).

Cuadro 7 Comparación de medias de *Agave tequilana* Weber cv. azul, obtenidas *in vitro* en diferentes medios de cultivo.

Medios de cultivo	Longitud de raíz	Altura de planta	Número de hojas
MS 100	3,51 a	7,92 a	4,03 A
CP	3,48 b	7,02 a	4,90 A
MS 50	3,15 c	6,77 a	8,07 A

Nota: Letras iguales son estadísticamente similares entre si según la prueba de Tukey α 0.05

En general, todas las plantas presentaron una disminución de altura con respecto a los datos de la fase *in vitro* lo cual se debió a que la lamina foliar se ve afectada por el cambio del ambiente, generando la pérdida de las partes apicales de las hojas. Este fenómeno fue más notorio en las plantas que fueron tratadas durante la aclimatación con radix 1,500 ppm pues una importante cantidad de hojas se perdieron posiblemente por la formación de la raíz. Por los datos presentados en el cuadro cinco, en todos los casos se tuvo un incremento paulatino a partir de la segunda semana, pero claramente se puede observar que las plantas que desarrollaron mayor número de hojas, fueron las que menor incremento de altura tuvieron, razón por la cual se tiene una

correlación negativa entre las variables número de hojas vs. altura de planta; de tal forma, se puede considerar que al crecimiento de un órgano de la planta disminuye otro, en virtud de la relación fuente-demanda que se presenta por el abasto que debe darse a una parte del vegetal, generando la disminución o poco crecimiento de otro órgano.

En cuanto a la influencia de los medios de cultivo *in vitro* durante la fase de aclimatación, se pueden observar importantes diferencias, haciendo que las plantas tratadas con el medio Cruz-Pizarro, las que mayor altura alcanzaron, de tal forma que se sigue conservando la hipótesis de que los medios de cultivo tienen una influencia en el crecimiento durante la aclimatación (cuadro 8).

Por otra parte se puede ver que en las concentraciones altas y bajas de auxinas, no presentó el mejor comportamiento, haciendo que las plantas tratadas con radix 5,000 las que presentaron mayor ganancia en altura, a excepción de aquellas que en la fase *in vitro* se les aplicó MS 50%, en donde hubo mayor incremento al disminuir la concentración de auxinas.

Cuadro 8 Comparación entre altura de planta de *Agave tequilana* Weber cv. azul, obtenidas *in vitro* en diferentes medios de cultivo.

Altura en cm.									
Semana	1,500 ppm			5,000 ppm			10,000 ppm		
	C-P	MS 100%	MS 50%	C-P	MS 100%	MS 50%	C-P	MS 100%	MS 50%
0	7.57	7.08	7.61	7.57	7.08	7.61	7.57	7.08	7.61
1	5.42	5.80	3.87	8.00	5.90	13.10	7.23	8.17	6.67
2	6.00	6.10	4.20	12.07	7.00	13.27	8.33	8.63	7.33
3	6.23	7.67	4.30	13.93	8.13	14.27	9.30	9.17	8.00
4	6.33	8.13	5.13	15.47	9.80	14.27	9.93	9.50	8.23
5	6.73	8.75	5.80	16.63	10.10	14.87	11.47	10.97	8.53

5.2.3 Tamaño de raíz

Para este parámetro, no fue posible establecer una relación entre los órganos formados *in vitro* y *ex vitro*, debido a que se eliminó la raíz previamente al proceso de aclimatación; tampoco se observan resultados que puedan indicar una influencia de los medios de cultivos aplicados *in vitro*, sin embargo, si se observan diferencias importantes al incrementar la concentración de auxinas, pues en las plantas tratadas con radix 10,000 se presentó un mayor crecimiento respecto a aquellas a las que se les aplicó radix 1,500 (cuadro 9).

Cuadro 9 Comparación entre longitud de raíz de *Agave tequilana* Weber cv. azul, obtenidas *in vitro* en diferentes medios de cultivo.

Tamaño de raíz en cm.									
Semana	radix 1,500 ppm.			radix 5,000 ppm.			radix 10,000 ppm.		
	C-P	M. S. al 100%	MS 50%	C-P	M. S. al 100%	MS 50%	C-P	M. S. al 100%	MS 50%
0	2.50	2.40	2.47	3.10	2.83	2.61	3.60	3.30	3.10
1	2.53	2.60	2.53	3.40	3.00	2.80	4.00	3.63	3.33
2	3.03	3.70	2.77	5.27	3.90	3.83	4.57	4.27	3.53
3	4.23	3.85	4.73	5.33	4.93	4.40	4.80	4.53	3.77
4	4.33	3.87	4.80	5.40	5.07	4.47	5.10	4.67	4.07
5	4.37	4.47	5.03	5.57	5.30	5.20	5.73	4.77	4.27

VI Conclusiones

Para los parámetros No. de hojas, Altura de planta y longitud de raíz.

1. Durante la fase *in vitro* bajo diferentes medios de cultivo no se presentaron diferencias estadísticas en los parámetros número de hoja, altura de planta y longitud de raíz.
2. El tratamiento donde las plantas alcanzaron mayor número de hojas y altura durante la fase *in vitro*, fue MS al 50%.
3. Las plantas tratadas con MS al 100% *in vitro* fueron las que menores valores presentaron en los diferentes parámetros evaluados.
4. El medio de cultivo Cruz Pizarro permitió tener, durante la fase *in vitro*, mayor tamaño de raíz y una altura de planta prácticamente igual a la del mejor tratamiento aunque el número de hojas se vio disminuido
5. No se encontró diferencia estadística significativa en los parámetros número de hojas y longitud de raíz, durante la fase de aclimatación.
6. La aplicación de radix 10,000 ppm tuvo un mejor efecto en la formación de hojas, que las de menor concentración del enraizador.
7. El número de hojas en radix 10,000 ppm, fue prácticamente igual en cualquiera de los tratamientos de medio de cultivo.
8. Las plantas que tuvieron menor respuesta para la variable número de hojas durante la fase de aclimatación, fueron aquellas que se extrajeron del medio de cultivo MS al 100%.
9. Las plantas extraídas del medio de cultivo Cruz-Pizarro sobresalieron de las plantas de los demás tratamientos en lo que se refiere a las variables altura de planta y longitud de raíz, durante la fase de aclimatación, a excepción de aquellas donde se adicionó radix a 1,500 ppm.
10. Las plantas provenientes del medio de cultivo MS al 100% y con adición de 1,500 ppm de radix superaron en longitud de raíz a las provenientes de los otros dos medios de cultivo y bajo la misma concentración de auxinas.
11. El medio de cultivo MS al 50% se presentó el menor crecimiento de la raíz durante la fase de aclimatación, con radix 5,000 y 10,000 ppm.
12. No se encontraron diferencias significativas para determinar que los medios de cultivo tuvieran un efecto durante la aclimatación de las plantas de *Agave tequilana*.

13. La mejor concentración de auxinas fue la de radix 5,000 ppm en donde las plantas presentaron el mayor tamaño de la planta y de la raíz, aunque no fue el mejor en la formación de hojas.

VII Anexos

Anexo 1. Distribución de unidades experimentales completamente al azar de *Agave tequilana* cv. Azul, obtenido *in vitro*, bajo diferentes concentraciones de medios nutritivos M.S. al 100%, M. S. al 50% y C. P.

T1 R3	T3 R6	T1 R7	T2 R4	T1 R5	T1 R6	T2 R7
T2 R2	T1R1	T2 R3	T2 R6	T3 R7	T3 R2	T2 R5
T3 R3	T2 R1	T1 R2	T3 R4	T1 R4	T3 R5	T3 R1

Anexo 2. Distribución de unidades experimentales de *Agave tequilana* cv. azul, obtenido *in vitro*, bajo diferentes concentraciones de medios nutritivos M.S. al 100%, M.S. al 50% y C. P.

Medio de Cultivo M. S. Al 100%		Medio de Cultivo Cruz Pizarro Cultivo		Medio de Cultivo M. S. Al 50%	
#	Radix	#	Radix	#	Radix
r1	1,500	r1	1,500	R1	1,500
r1	1,500	r1	1,500	R1	1,500
r2	5,000	r2	5,000	R2	5,000
r3	10,000	r3	10,000	R3	10,000
r2	5,000	r2	5,000	R2	5,000
r3	10,000	r3	10,000	R3	10,000

Anexo 3.

Análisis de varianza para el cultivo *in vitro* Número de hojas.

Fuentes de Variación	G.L.	S.C.	C.M.	F.C.	F.O. 5%	F.O. 1%
Tratamientos	2	19.04	9.52	1.11	3.61	4.70
Error	18	154.00	8.55			
Total	20	173.05				

Altura de planta en cm.

Fuentes de Variación	G.L.	S.C.	C.M.	F.C.	F.O. 5%	F.O. 1%
Tratamientos	2	0.3448	0.17	0.01	3.61	4.70
Error	18	299.39	16.63			
Total	20	299.74				

Tamaño de raíz

Fuentes de Variación	G.L.	S.C.	C.M.	F.C.	F.O. 5%	F.O. 1%
----------------------	------	------	------	------	---------	---------

Tratamientos	2	5.4150	2.70	0.23	3.61	4.70
Error	18	210.85	11.71			
Total	20	216.27				

Anexo 4.

Análisis de varianza *ex vitro* Número de Hojas

Fuentes de Variación	G.L.	S.C.	C.M.	F.		
				Observada	Requerida	
				0.05	0.01	
Total	8	204,74	25.59			
Bloques	2	107,19	53.59	11.12		
Tratamientos	16	36,81	2.30	23.29	3.53	4.54
Error	26	348,74				

Altura de Planta. Análisis de Varianza

Fuentes de Variación	G.L.	S.C.	C.M.	F.		
				Observada	Requerida	
				0.05	0.01	
Total	8	303,48	37,93	6,26		
Bloques	2	70,85	35,42	5,84	3.53	4.54
Tratamientos	16	97,02	6,06			
Error	26	471,34				

Longitud de raíz Análisis de Varianza

Fuentes de Variación	G.L.	S.C.	C.M.	F.		
				Observada	Requerida	
				0.05	0.01	
Total	8	6.77	0.85	1.25		
Bloques	2	3.58	1.79	2.64	3.53	4.54
Tratamientos	16	10.86	0.68			
Error	26	21.22				

Tabla 2. Composición química del medio nutritivo Cruz-Pizarro utilizado en la propagación *in vitro* de *Agave tequilana* Weber cv. azul.

Sales Minerales mgL ⁻¹			
COMPUESTO QUÍMICO	Cruz-Pizarro 2000	M. S. (1962) al 100%	M.S. (1962) al 50%
NH ₄ NO ₃	200	1950	975

KNO ₃	1010	1900	950
Ca(NO ₃) ₂ &4H ₂ O	295	----	----
KH ₂ PO ₄	170	170	85
MgSO ₄ · 7H ₂ O	----	370	185
MgSO ₄ & 7 H ₂ O	369	----	----
Fe SO ₄ & 7 H ₂ O	25	----	----
Na – EDTA	38	----	----
Mn SO ₄ & H ₂ O	0.84	----	----
H ₃ BO ₃	6.1	6.2	3.1
Na ₂ MoO ₄ & 2 H ₂ O	0.24	0.25	0.125
Zn SO ₄ & 7 H ₂ O	8.6	----	----
Cu SO ₄ & 5 H ₂ O	0.0000249	0.025	0.0125
CoCl ₂ & 6 H ₂ O	0.0000238	----	----
CaCl ₂ · 2H ₂ O	----	440	220
KI		0.83	0.415
MnSO ₄ · 4H ₂ O	----	22.3	11.15
CaCl ₂ · 6H ₂ O		0.025	0.0125
Mio-inositol	100	100	100
Tiamina. HCl	0.1	0.1	0.1
Piridoxina. HCl	0.5	0.5	0.5
Ácido nicotínico	0.5	0.5	0.5
AIB	0.1	0.1	0.1
BA	0.5	0.5	0.5
Sacarosa	30000	30000	30000
Agar	6000	6000	6000

El pH es ajustado a 5.7

Tabla 3. Composición de iones de los medios de cultivo Cruz-Pizarro, M.S. al 100% y M. S. al 50 %.

COMPUESTO QUÍMICO	Cruz-Pizarro (2000)	M. S. (1962) al 100%	M. S. (1962) al 100%
NH ₄	2.5	24.37	12.18
NO ₃	15.4	43.18	21.59
K	11.23	21.53	10.76
Ca	2.95	5.94	2.97

Buy Now to Create PDF without Trial Watermark!!

PO4	1.24	2.72	1.36
Mg	2.99	3.00	1.50
SO4	2.99	3.00	1.50

Created by eDocPrinter PDF Pro!!

LITERATURA CITADA

- Acosta, M. C. 1993. Efecto del NH₄: NO₃ en la micropropagación de fresa y su relación en la aclimatación, con base en su capacidad fotosintética. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. Montecillo, México 107 p.
- Adrijany, V.S., G. Indrayanto and L.A.I Soehono. 1999. Simultaneous effect of calcium, magnesium. Copper and cobalt, ions on sapogenin steroids content in callus of *Agave amaniensis*. Plant Cell Tissue Culture and Organ Culture 55: 103-108.
- Arellano, O. G. Y S. B. González. 1985. Efecto del recipiente, intensidad de luz y microambiente en el establecimiento en el establecimiento a suelo de *fragaria x ananassa* Dueh. y *Prunus cerisifera* obtenidas *in vitro*. Tesis de licenciatura. UNAM. F.E.S. – Cuautitlán, México. 122p
- ASERCA. 2000. Claridades Agropecuarias. El Agave tequilero; pencas que abrazan al mundo. Num. 87. ASERCA. SAGAR. México. 7 p.
- Atta-Allay Van, 1997. Micropropagación and establishment of *Yucca aloifolia*. Plant, cell, Tissue Culture and Organ Culture 48:209-212.
- Bidwell R. 1993 Fisiología Vegetal. Trad. Jerónimo G.; Rojas M. Segunda Edición. México. AGT Editor S.A. 780p.
- Bonh, L.T., L. T. Mui T.D. Tang and T D. Pong, 1990. Rapid propagation of *Agave cantala*, *A. forcroydes* y *A. sisalana* by tissue cultura. Plant Cell Tissue Cultura and Organ Culture 23:67-70.
- Brainerd K. E. And L. H. Fuchigami. 1981. Acclimatization of aseptically cultured apple plants to low relative humidity. J Amer. Soc. Hort. Sci. 106:515-518.

- Brand M. H. 1993. Agar and ammonium nitrate influence hyperhydricity, tissue nitrate and total nitrogen content of serviceberry (*Amelanchier arborea*) shoots *in vitro*. Plant cell, Tiss. Org. Cult. 35: 203-209.
- Burke J. J. And M. J. Oliver. 1993. Optimal thermal environments for plant metabolic processes (*Cucumis sativus* L.) light-harvesting chlorophyll a/b pigment-protein complex of photosystem II and seedling establishment in cucumber. Plant Physiol. 102:295-302.
- Chua, B.U., J.T. Kunisaki, and Y. Sagawa. 1981 *In vitro* propagation of *Dracaena marginata* var. Tricolor J. Amer. Soc. Hort. Sci. 16:494.
- Capellades M., R Fortarnau., C. Carulla. And P. Debergh. 1990. Environment influences in anatomy of stoma and epidermal cells in tissue culture of *Rosa multiflora*. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 115:141-145.
- Castro-Concha, L., M.V. Loyola-Vargas, J.L. Chan and 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.
- Consejo Regulador del Tequila. 2000 Avances en la Investigación científica del *Agave tequilana* Weber cv. Azul. Comité Técnico Agrícola. Boletín No. 1 Junio de 2000. México. 14 p.
- Cournac L., B. Dimon, C. Patrick, A. Lohou and P. Chaguardieff. 1991. Growth and photosynthetic characteristics of *Solanum tuberosum* plantlets cultivated *in vitro* in different conditions of aeration, sucrose supply and CO₂ enrichment. Plant Physiol. 97:112-117.
- Cruz-Pizarro, F. 2000 Niveles de sacarosa y relación de NO₃:NH₄ en el cultivo de brotes de vid (*Vitis vinifera*) "Malaga Roja". Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados. México. 78 p.

- Damiano C. 1980. Strawberry. micropropagation. Proc. Conference Nursery Production of fruit through tissue culture application and feasibility. U.S.D.A. Agricultural Research. pp. 11-22.
- Darnell R. L. and D. C. Ferree. 1983 The influence of environment on apple tree growth, leaf wax formation and foliar absorption. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 108:506-511.
- Das, T. 1992. Micropropagation of *Agave sisalana*. Plant Cell Tissue Culture and Organ Culture 31:253-255.
- Debergh, P. C. and L. J. Maene. 1981. A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue. J. Amer. Soc. hort. Sci. 14:335-345.
- Dejardins, Y., A. Gosselin and S. Yerle. 1987. Acclimatization of *ex vitro* strawberry plantlets in CO₂ enriched environments and supplementary lighting. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 112:5: 846-851.
- Devlin R. M. 1980. Fisiología vegetal. Trad *Llimona X*. Tercera edición Omega. Barcelona, España., S. A. 517p.
- Donnely, D. J. and W. E. Vidaver. 1984. Leaf anatomy of red raspberry transferred from culture to soil. J. amer. Soc. Hort. Sci. 109:172-17
- Dubé S. L. and W. E. Vidaver. 1992. Photosynthetic competence of plantlets grown and system for measurement of photosynthesis *in vitro*. Physiologia Plantarum. 84:409-416.
- Elkonin L. and N. Pakhomova. 2000. Influence of nitrogen and phosphorus on induction embryogenic callus of sorghum. Plant Cell, Organ and Tissue Culture 61 (2): 115-123.

- Endress, R. 1994. Plant Cell biotechnology. Berlín Alemania, Springer-Velag. 353p.
- Evalddelson, I.E. and N.T. Welander, 1995. The effects of ´médium composition on *in vitro* propagation and *in vitro* growth of *Cordyline terminalis* cv. Atoom. . J. Amer. Soc. Hort. Sci. 60:4, 525-530.
- Fabbri, A., E. Sutter and S. K. Dunton. 1996 Anatomical changes in persisten leaves of tissue cultured strawberry plants after removal from culture. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 28:331-337.
- George E. F. And P. D. Sherrington. 1984. Plant propagation by tissue culture. Handbook and Directory of Comercial Laboratorios Enegetic Limited. Great Britain. 690 pp.
- Ghashghaie, J., F. Brenckman and B. Saugier. 1992. Water relations and growth of roseplants cutured *in vitro* under various relative humidities. Plant Cell Tissue and Organ Culture 30:51-57.
- Gracián-Sandoval, S. Y M. Cruz 1987. Propagación *in vitro* de mezcal tequilero (*Agave tequilana* Weber). En Anónimo (1987) III Reunión Nacional de Bioquímica y Cultivo de Tejidos Vegetales (resúmenes). Irapuato, Gto. Centro de Investigaciones.
- Granada, C. L. 1990. Manejo de plantas en invernadero. In: Fundamentos teóricos-prácticos del cultivo de tejidos vegetales V. M. Villalobos A. (ed). CP-FAO. Roma, Italia. pp. 85-87.
- Granados, S.D. Los Agaves en México. 1993 Universidad Autónoma de Chapingo. México. pp 74-76.

- Guerrero A. J. R. 2000. Acimatación de *Lilium longiflorum* con diferentes relaciones nutrimentales. Tesis de Maestría en Ciencias, especialidad en fruticultura, Colegio de Postgraduados. Montecillo, México. p 68.
- Hartmann, H. T. D.E. Kester, F.T. Davies, Jr., and R.L. Geneve 1997. Plant Propagation: Principles and Practices. Sixth edition. Prentice Hall. pp 71-72, 429-513.
- Harza, S. K., Sudripa, Das and A. K. Das. 2002. Sisal plant regeneration by organogenesis. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 70:235-240.
- Hughes, K. W. 1980. Ornamental species. In: Cloning Agricultural Plants Via *in vitro* techniques. Conger, B. V. (ed) Crv Press, Inc. Boca Raton, Florida. pp 1-33.
- Jeong J., J. Lee and M. Roh. 1996. *In vitro* propagation of bulb scale section of several *Korean native lilies*. *Acta Horticulturae*. 414:269-276.
- Jimenez, Z. A. 2004. Micropropagación de plátano (*Mussa aab*, cv. Curraré) en un Medio de Cultivo con Sustitución de Insumo. Tesis: Bach. Agr. Instituto Tecnológico de Costa Rica., San Carlos, Costa Rica. 58p.
- Koevary K., L. Rappaport and L. L. Morris. 1978. Tissue culture propagation of head lettuce. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 13:39-41.
- Krikoria, A. D. 1991. Propagación clonal *in vitro*. En: Roca, W. M. y L.A. Mroginski, (eds.). Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia. 41-77.
- Kubota Ch. And N. C. Rajapakse. 1996. Low-Temperature storage of micropagated plantlets under selected light environments. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 31:449-452.

- Kunisaki, J. T. 1975. *In vitro* propagation of *Cordyline terminalis* (L) Kurth. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 10:601-602.
- Laforge, F., C. Lussier, Y. Desjardins and A. Gosselin. 1991. Effect of lighth intensity and CO2 enrichment during *in vitro* rootind on subsequent growth of strawberry, raspberry and asparagus in aclimatization. J Amer. Soc. Hort. Sci. 47:259-269.
- Lilien – Kipnis, H. and M. Kochba. 1987. Mass propagation of new gladiolus hybrids. Acta Horticulture. 212:631-638.
- Linenberger D., R. 1983. Shoot proliferation, rooting and transplnt survival of tissue. Culturef “Hally jolivette” cherry. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 18:2: 182-185.
- Lozoya, S. H. 1985. Micropropagación de especies herbáceas. En: El cultivo de tejidos vegetales en México. Centro de Investigación Científica de Yucatán. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. M. L. Robert y V. M. Loyola (eds) pp 65-79.
- Madrigal. L. R., G.M.R. Dorantes y J.L. Rodríguez de la O. 1981. Propagación *in vitro* de henequén (*Agave frourcroydes* Lem.) Primer Simposium de Agave. Merida, Yuc., K´tun-Cordemex. 12p.
- Margara, J. 1988. Métodos de multiplicación *in vitro* En: multiplicación Vegetavica y Cultivo *in vitro*. Los meristemos y la organogénesis. J. Margara 2ª ed. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España. pp. 47-50.
- Mee, G.W.P. 1978. Propagation of *Cordyline terminalis* from callus culture. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 13:660.

- Montie J. L. 1981. Does Light limit crop production. In Physiological processes limiting plant productivity. C.B. Johnson (ed) London Butterworths. pp. 23-28.
- Nava, C.A. 1988. *Agave tequilana in vitro*: un modelo para el estudio de morfogénesis. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. México. 214p.
- Nikam, T.D. 1997. High frequency in *Agave sisalana*. Plant Cell Tissue Cultura and Organ Culture 51:225-228.
- Palonen, P. and D. Buszard. 1998. *In vitro* screening for cold hardiness of raspberry cultivars. Plant Cell Tissue Cultura and Organ Culture 53:213-216.
- Parker, R. 2000. La ciencia de las Plantas. Tompson editores Spain. pp. 256,261.
- Pierik, R.L.M. 1990 Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. De Mundi-Prensa, Madrid, España. pp. 127-132.
- Podwyszynska, M., Olsewski, T. 1995. Influence of Gelling Agent on shoot multiplication and uptake of macroelements by *in vitro* cultura of *Rosecordyline* and homalomena. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 64:77-84.
- Portillo M.L. 1997. Embriogénesis somática indirecta en *Agave tequilana* Weber. Efecto genético del Agave. Víctor González. Universidad de Guadalajara. 30 de junio de 1997. pp. 3-57.
- Preece, J. E. and E. G: Sutter. 1991. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field In: Micropropagation. Deberg. P. C. and R. H. Zimmerman (eds). Kluwer Academic Publishers, Netherlands. 71-93.
- Quintero, A., V. Rosas, M. Baca y A. Romo de Vivar. 1980. Estudio de las condiciones de cultivo de células de *Yucca pilifera* y su cuantificación de

sarsasapodenina. En: Anónimo (ed.) Yucca. Saltillo Coah., Centro de Investigaciones en Química Aplicada. pp. 223-227.

- Ramage C. M. and R. R. Williams 2002. Mineral nutrition and plant morphogenesis. *In vitro* Cell. Dev. Biol.-Plant 38:116-124.
- Read, P. E. and C. D. Fellman, 1985. Accelerating acclimation of *in vitro* propagated woody ornamentals. Acta Horticulture 166:15-20.
- Reyes, T., T. A. Nell, J. E. Barret and Ch. A. Conover. 1996. Irradiance level end fertilizer rate effect acclimatization of *Chamaedorea elegans* Mart. J. Amer. Soc Hort. Sci. 31:839-842.
- Ritchie, G.A.C. Boggiano, K.C. Short and M.R. Davey. 1990. The effects of relative humidity on plant morphology and stomal physiology of *in vitro* growth *Chysanthemum*. Bull. Soc. Bot. Frnc. 137:123-168.
- Roca, W. M. y L. A. Mroginski 1991. Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia. 19-40.
- Rodríguez-Garay, B., Gutiérrez-Mora and A. Acosta-Dueñas, B. 1996. Somatic Embryogenesis of *Agave victoriana-reginae* Moore. Plant Cell Tissue Culture and Organ Culture 46:85-87.
- Rogers, M.N. and B.O. Tija .1990. Production and culture of cut gerberas In: Gerbera production. M.N. Rogers and B.O. Tija (eds). Timber Press Grower Handbook Series. pp. 7-75.
- Rubluo. I.A. 1993. Strategies for the recovery of endangered orchids and cacti through *in vitro* culture. *Biological* conservation. 63:163-169.

- Rugini E. and G. Fontanazza. 1981. *In vitro* propagation of “*Dolce agogia*” olive J. Amer. Soc. Hort. Sci. 16:492-499.
- Sahckel, K. A., Novello, V. and Sutter, E. G. 1990. Stomatal function and cuticular conductance in whole tissue-cultured apple shoots. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 115:3:468-472.
- Santacruz-Ruvalcaba, F., Gutiérrez-Pulido and H., Rodríguez-Garay, B. 1999. Efficient *in vitro* propagation of *Agave Parrasana* Berger. Plant Cell Tissue Culture and Organ Culture 56:163-167.
- Seibert, M. and P. G. Kadkade. 1982. Environmental factors: A: Light In: Plant tissue culture as a source of biochemicals, E. J. Staba (ed) Florida, CRC Press. pp. 123.
- Seiskandarajah S.; R. Skirvin and H. Abu-Gaound. 1990. The effect of some macronutrients on adventitious roots on scion apple cultivars *in vitro*. Plant Cell, Organ and Tissue Culture 21(2): 185-189.
- Skirvin R. M. and M. C. Chua. 1981. *In vitro* propagation of forever your rose. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 14:608-610.
- Téllez, M. E. 2003. Multiplicación *in vitro* de *Agave tequilana* Weber. Tesis de licenciatura. UNAM F.E.S. Cuautitlán. Cuautitlán Izcalli. Estado de México. pp. 51-68.
- Valenzuela, Z. A. 1994. El Agave Tequilero: Su cultivo e Industrialización. Monsanto. México. pp. 119.
- Vélez, G. C. 1997. Selección celular para resistencia a filtrados microbianos en *Agave tequilana* Weber. En Gaceta Universitaria. Desarrollan Metodología para el mejoramiento genético de *Agave*. Universidad de Guadalajara. 30 de Junio de 1997. pp. 3-54.

- Wardle, K. E., B. Dobbs and K. C. Short. 1983. *In vitro* acclimatization of aseptically cultured plantlets to humidity. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 108:386-389.
- Wuslter G., H. W. Janes and H. Gude. 1997. Effects of supplemental light quality, quantity and differential temperature on growth and development of easter lily (*Lilium longiflorum*). Acta Horticulturae. 418:153-157.
- Yue, D. Y. Desjardins, M. Lamarre and A. Gosselin. 1992. Photosynthesis and transpiration of *in vitro* cultured asparagus plantlets. J. Amer. Soc. Sci. 49:9-