



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Micropropagación de *Agave guiengola* Gentry, especie
endémica amenazada del estado de Oaxaca, México

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

ALAN JONATHAN VARGAS VALENCIA



DIRECTOR DE TESIS:

M. en C. OCTAVIO GONZÁLEZ CABALLERO

2017

Ciudad Universitaria, CDMX



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

1. Datos del alumno

Vargas
Valencia
Alan Jonathan
55 26 44 25
Universidad Nacional Autónoma
de México
Facultad de Ciencias
Biología
310225513

2. Datos del tutor

M. en C.
Octavio
González
Caballero

3. Datos del sinodal 1

Dr.
Víctor Manuel
Chávez
Avila

4. Datos del sinodal 2

Dr.
Abisaí Josué
García
Mendoza

5. Datos del sinodal 3

Dra.
Josefina
Herrera
Santoyo

6. Datos del sinodal 4

Biól.
Marisela
Yañez
Martínez

7. Datos del trabajo escrito

Micropropagación de *Agave
guiengola* Gentry, especie
endémica amenazada del
estado de Oaxaca, México
84 p
2017

A mi madre y mis hermanas: Soledad, Antonieta y Nancy.

Agradecimientos

A la Facultad de Ciencias y a la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme todas las oportunidades y experiencias que me hicieron crecer como persona y como científico.

Al Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Jardín Botánico, lugar donde realicé esta investigación y que me proporcionó todo el equipo y material necesario.

Al Laboratorio de Anatomía Vegetal del Jardín Botánico y a la Dra. Estela Sandoval Sapotitla por la asesoría académica y técnica en la realización del estudio histológico.

Al Doctor Abisaí Josué García Mendoza por proporcionarme el material biológico con el que inicié mi investigación, por su disposición a responder mis dudas y compartir conmigo su conocimiento sobre los agaves.

Al Dr. Víctor Manuel Chávez Avila por todo el apoyo académico y personal que me brindó durante mi estancia en el laboratorio. A él, mi más sincero respeto y admiración.

Al M. en C. Octavio González Caballero, tutor de esta tesis, por contagiarme su pasión por el cultivo de tejidos vegetales, por guiarme en cada experimento que realicé, por ayudarme a resolver dudas e inquietudes que se me presentaban en el camino y por ser de los mejores profesores que he tenido.

A los miembros del jurado por sus valiosas aportaciones a este proyecto.

Dr. Víctor Manuel Chávez Avila

Dr. Abisaí Josué García Mendoza

M. en C. Octavio González Caballero

Dra. Josefina Herrera Santoyo

Biól. Marisela Yañez Martínez

Índice

| | |
|---|----|
| Abreviaturas | 5 |
| Resumen..... | 6 |
| 1. Introducción | 7 |
| 1.1 Antecedentes..... | 9 |
| Biodiversidad..... | 9 |
| Biodiversidad en México | 9 |
| Importancia de la biodiversidad | 10 |
| Amenazas a la biodiversidad | 10 |
| Familia Agavaceae | 11 |
| Género Agave | 11 |
| Importancia biológica y económica del género Agave..... | 12 |
| Agave guiengola Gentry | 15 |
| Clasificación taxonómica | 15 |
| Características | 15 |
| Hábitat | 17 |
| Tipos de vegetación | 19 |
| Importancia biológica y ecológica..... | 19 |
| Usos | 20 |
| Problemática y conservación..... | 20 |
| Estrategias de conservación | 20 |
| Cultivo de tejidos vegetales | 21 |
| Auxinas | 24 |
| Citocininas | 25 |
| Oxidación | 25 |
| Morfogénesis | 26 |
| Organogénesis | 27 |
| Embriogénesis somática..... | 27 |
| Activación de yemas preformadas | 29 |
| Enraizamiento y aclimatización | 29 |

| | |
|--------------------------------------|----|
| Cultivo in vitro de Agave | 31 |
| 1.2 Justificación | 35 |
| 1.3 Objetivos | 36 |
| 2. Materiales y métodos | 37 |
| Material vegetal..... | 37 |
| Desinfección..... | 37 |
| Germinación | 37 |
| Inducción de morfogénesis..... | 38 |
| Análisis histológico..... | 40 |
| Aclimatización | 41 |
| Análisis estadístico | 42 |
| 3. Resultados | 43 |
| Desinfección..... | 43 |
| Germinación | 43 |
| Oxidación | 46 |
| Morfogénesis y callogénesis..... | 47 |
| Análisis histológico..... | 50 |
| Organogénesis y enraizamiento..... | 58 |
| Aclimatización | 60 |
| 4. Discusión | 61 |
| Desinfección..... | 61 |
| Germinación | 62 |
| Oxidación | 65 |
| Embriogénesis somática..... | 67 |
| Organogénesis | 68 |
| Enraizamiento y aclimatización | 70 |
| 5. Conclusiones | 74 |
| 6. Referencias..... | 76 |
| Anexos | 85 |

Figuras

| | |
|--|----|
| 1.1. <i>Agave guiengola</i> | 17 |
| 1.2. Localización geográfica del Cerro Guiengola. | 18 |
| 1.3. Selva baja caducifolia en el Cerro Guiengola. | 16 |
| 1.4 Vías morfogénicas del CTV. | 26 |
| 1.5 Estudios histológicos de organogénesis | 27 |
| 1.6 Estudios histológicos de embriogénesis somática en <i>Agave</i> | 28 |
| 2.1 Disección de plántula de <i>A. guiengola</i> y la obtención de explantes. | 38 |
| 2.2 Brotes enraizados y listos para transferencia a sustrato. | 42 |
| 3.1. Porcentaje de germinación. | 44 |
| 3.2. Semillas de <i>A. guiengola</i> y etapas de germinación y desarrollo de la plántula hasta la aparición de la primera hoja verdadera. | 46 |
| 3.3. Porcentaje de oxidación por tipo de explante. | 47 |
| 3.4. Respuestas obtenidas en el Tratamiento control y Tratamiento 1 (ANA/BAP-0.5/1.5 mg/L). | 52 |
| 3.5 Respuestas obtenidas en el Tratamiento 1 (ANA/BAP-0.5/1.5 mg/L). | 53 |
| 3.6 Respuestas obtenidas en el Tratamiento 2 (ANA/BAP-0.5/2 mg/L). | 54 |
| 3.7 Respuestas obtenidas en el Tratamiento 3 (2,4-D/BAP-1.5/0.2 mg/L). | 55 |
| 3.8 Respuestas obtenidas en el Tratamiento 4 (2,4-D/BAP-3/0.2 mg/L). | 56 |
| 3.9 Análisis histológico de muestras de callo en tratamientos ANA/BAP después de 60 días desde la siembra de los explantes. | 57 |
| 3.10 Proliferación de brotes adventicios a partir de plantas previamente regeneradas. ... | 59 |
| 3. 11 Plantas micropropagadas creciendo en invernadero, a seis meses de su transferencia a suelo | 60 |

Tablas

| | |
|---|----|
| 1.1 Especies de <i>Agave</i> que se encuentran en la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, en alguna categoría de riesgo. | 12 |
| 1.2 Distintos usos que se les da a diferentes especies de <i>Agave</i> | 14 |
| 1.3 Ejemplos de plantas de importancia alimenticia propagadas por cultivo de tejidos vegetales. | 22 |
| 1.4 Diferencias morfológicas de las plantas clonadas por CTV y plantas que se encuentran en condiciones <i>ex vitro</i> | 30 |
| 1.5 Especies de <i>Agave</i> propagadas por CTV. | 33 |
| 2.1 Tratamientos con reguladores de crecimiento vegetal. | 39 |
| 3.1 Porcentaje de germinación <i>in vitro</i> y <i>ex vitro</i> | 43 |
| 3.2 Número de semillas germinadas cuantificado en intervalos de 3 días. | 44 |
| 3.3 Total de explantes sembrados y porcentaje de explantes con respuesta, por tipo de explante y por tratamiento con reguladores de crecimiento. | 48 |
| 3.4 Tipo de respuesta de cada explante en cada tratamiento. | 48 |
| 3.5 Respuesta organogénica. | 58 |

Abreviaturas

| | |
|---|--|
| 2,4-D: ácido 2,4-diclorofenoxiacético | min: minutos |
| AAs: ácido ascórbico | ml: mililitros |
| AC: ápice de cotiledón | MPa: megapascal |
| ACi: ácido cítrico | MS: Murashige y Skoog, 1962 |
| AIA: ácido indol-3- acético | PR: parte de la raíz próxima al tallo |
| AIB: ácido indol-3-butírico | PVP: polivinilpirrolidona |
| ANA: ácido 1-naftalenácetico | RCV: reguladores de crecimiento vegetal |
| AT: ápice de tallo | SEMARNAT: Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales |
| BAP: 6-benzilaminopurina | T1: tratamiento 1 |
| BC: base de cotiledón | T2: tratamiento 2 |
| BT: base de tallo | T3: tratamiento 3 |
| cm: centímetros | T4: tratamiento 4 |
| cm ² : centímetros cuadrados | TBA: alcohol terbutílico-etanol-agua |
| CTV: cultivo de tejidos vegetales | TDZ: thidiazuron |
| d: días | v/v: concentración volumen sobre volumen |
| DR: parte de la raíz distal al tallo | |
| g: gramos | |
| h: horas | |
| ha: hectáreas | |
| HV: hoja verdadera | |
| Kg: kilogramos | |
| KIN: kinetina | |
| L: litros | |
| m/v: concentración masa sobre volumen | |
| m: metros | |
| mg: miligramos | |

Resumen

Agave guiengola Gentry es una especie endémica de Oaxaca, su hábitat se restringe al Cerro Guiengola, en el municipio de Tehuantepec. Es una especie con importantes funciones ecológicas y gran potencial ornamental. La especie se ha visto severamente afectada por el deterioro de su hábitat por lo que está catalogada bajo el estatus de Amenazada de acuerdo a la NOM-059-SEMARNAT-2010. El cultivo de tejidos vegetales ha demostrado ser una alternativa para la propagación de especies del género *Agave* amenazadas o en peligro de extinción. El objetivo de esta investigación fue establecer condiciones de cultivo *in vitro* que permitieran dirigir las respuestas morfogénicas y lograr la micropropagación de esta especie. Para ello se germinaron asépticamente 45 semillas en medio MS (Murashige y Skoog, 1962) con sacarosa al 3% en frascos gerber, y otras 45 semillas en sustrato de tepojal y tierra negra (proporción 3:1) en charolas de plástico. Se obtuvo el 88.9% de germinación después de 12 días en condiciones *in vitro* y 71.1% en condiciones *ex vitro*. Las plántulas de condiciones *in vitro* de 50 días de edad se disectaron y se obtuvieron 7 tipos de explantes: base y ápice de tallo (BT y AT), parte proximal y distal de raíz (PR y DR), base y ápice de cotiledón (BC Y AC), y hoja (HV). Los explantes se cultivaron en medio MS con sacarosa al 3%, 2g/L de PVP, 150 mg/L de ácido cítrico, 150 mg/L de ácido ascórbico y combinaciones de reguladores de crecimiento vegetal ANA/BAP (0.5/1.5 y 0.5/2 mg/L) y 2,4-D/ BAP (1.5/0.2 y 3/0.2 mg/L) durante 60 días. Los explantes presentaron un porcentaje de oxidación menor al 30%. Los explantes BT fueron los más regenerativos con la combinación ANA/BAP (0.5/1.5 y 0.5/2 g/L) ya que más del 75 % de los explantes respondieron y se obtuvieron promedios de 89.94 y 108.15 brotes por explante, respectivamente. Se realizaron análisis histológicos para señalar que la respuesta obtenida fue organogénesis indirecta. Al término de 12 meses de iniciados los cultivos se propagaron 4827 plantas. Después de 14 meses, 158 plantas propagadas fueron transferidas a macetas con sustrato de tepojal y tierra negra (proporción 3:1) y colocadas dentro de bolsas de plástico transparentes y a la sombra durante 1 semana y posteriormente trasladadas a condiciones de invernadero obteniendo un porcentaje de supervivencia del 78.48 %. Los resultados obtenidos hasta ahora vislumbran los alcances sobre la conservación de éste y otros agaves escasos en la naturaleza en riesgo de extinción.

1. Introducción

La familia Agavaceae es endémica de América, se distribuye desde el sur de Canadá hasta Bolivia y Paraguay (García-Mendoza y Chávez-Rendón, 2013). La familia se conforma de 9 géneros y 340 especies conocidas. México es el centro de mayor riqueza y diversidad pues 261 especies (76% de las especies totales) se encuentran en la República Mexicana, de éstas, el 70% son endémicas (García-Mendoza, 2011). Dentro de la familia, el género *Agave* tiene registradas un total de 166 especies para todo el mundo, de las cuales 125 se consideran como especies nativas de México y de éstas, aproximadamente 58% son endémicas (García-Mendoza y Galván, 1995). De las 125 especies en nuestro país, 18 se encuentran en la NOM-059-SEMARNAT-2010 (SEMARNAT, 2010).

En general, los agaves cumplen importantes funciones en los ecosistemas pues contribuyen a disminuir la erosión del suelo, detención de sedimentos y disminución de aguas de escorrentías (Arias, 2011). Por otro lado, también representan uno de los recursos naturales de mayor importancia desde el punto de vista económico, social y agroecológico en México. Ejemplos son el henequén (*Agave fourcroydes* Lem.) y el sisal (*Agave sisalana* Perr.) para la obtención de fibras, el tequila (*Agave tequilana* Weber) y bacanora (*Agave angustifolia* Haw.) que son fuente de bebidas alcohólicas, y el *Agave victoriae-reginae* que es muy preciada como planta ornamental (Robert *et al.*, 2006). A pesar del potencial económico de los agaves, pocas especies han sido estudiadas a fondo para dilucidar dicho potencial. Contradictoriamente, aquellas especies utilizadas no son propagadas por métodos eficientes que hagan sustentable su aprovechamiento y, en muchos casos, son saqueadas de su medio ambiente, esto combinado con la destrucción de sus hábitats (por actividades humanas principalmente), sus largos ciclos de vida (entre 8 a 20 años, dependiendo de la especie) y la reproducción sexual limitada (con únicamente una floración a lo largo de su vida) las han colocado en una categoría de riesgo en la NOM-059-SEMARNAT-2010 (Lock, 1985).

Para abordar el reto de la preservación de estas especies existe una estrategia de conservación *ex situ* llamada cultivo de tejidos vegetales (CTV).

En la presente investigación se utilizó esta estrategia para la micropropagación de *Agave guiengola* Gentry. Esta especie es endémica de Oaxaca, su hábitat se restringe al Cerro Guiengola, en el municipio de Tehuantepec. Es una especie no aprovechada ni cultivada, pero con importantes funciones ecológicas y gran potencial ornamental. La especie se ha visto severamente afectada por el deterioro de su hábitat debido a la extracción de mármol en la parte baja de la montaña donde crece, por lo que está catalogada bajo el estatus de Amenazada de acuerdo a la NOM-059-SEMARNAT-2010.

Se logró la germinación, la regeneración *in vitro* de plantas completas, la micropropagación y aclimatización de *A. guiengola* con el fin de generar conocimiento sobre la especie, contribuir a su conservación y a su aprovechamiento sustentable.

1.1 Antecedentes

Biodiversidad

El término “biodiversidad” fue utilizado por primera vez, en 1985, por Walter Rosen del National Research Council de los Estados Unidos como una contracción de diversidad biológica (Krishnamurthy, 2003). La “biodiversidad” se refiere a todas las formas en que la vida se manifiesta en la Tierra (Martínez-Meyer *et al.*, 2014). En su sentido más amplio, la biodiversidad no se limita al número de especies que han existido en la historia de la vida, sino que también incluye desde la variación genética en individuos y poblaciones, hasta la diversidad de ecosistemas (Wilson, 1988). La biodiversidad abarca, por lo tanto, tres niveles de expresión de variabilidad biológica: ecosistemas, especies y genes (Neyra y Durand, 1998).

Biodiversidad en México

Se reconoce que México es uno de los países con mayor biodiversidad en el mundo; esta aseveración puede comprobarse al comparar cifras de especies de los principales grupos de organismos identificados y registrados en el mundo, con las cifras que se conocen, o estiman, de las especies en México (Toledo y Ordoñez, 1988). Los cálculos indican que presenta entre el 8.59% (Martínez-Meyer *et al.*, 2014) y el 12% (Mittermeier *et al.*, 1997; Sarukhán *et al.*, 2009; Toledo y Ordoñez, 1988) de la diversidad total del mundo.

Con respecto a otros niveles de organización biológica, México también es un país rico en términos de sus ecosistemas terrestres, costeros y marinos. Para los ecosistemas terrestres existen varias clasificaciones que varían según la especificidad con que describen los componentes bióticos y la estructura fisonómica de las comunidades vegetales (Miranda y Hernández, 1963; Rzedowski, 1978). Challenger y Soberón (2008) los engloban en 7 clases: (1) bosques tropicales perennifolios, (2) bosques tropicales caducifolios, (3) bosques mesófilos de montaña, (4) bosques templados de coníferas y latifoliadas, (5) matorrales xerófilos, (6) pastizales y (7) humedales. Bajo esta clasificación, los matorrales xerófilos son las comunidades vegetales de mayor extensión del territorio y los bosques mesófilos

y los humedales los de distribución más restringida y con mayor vulnerabilidad (Martínez-Meyer *et al.*, 2014).

Para el caso de las plantas terrestres, la División Magnoliophyta registra actualmente en México: 53 órdenes, 247 familias, 2 685 géneros y 21 841 especies, valor que ubicaría al país como el tercero o cuarto con la mayor riqueza, muy parecida en magnitud a la de China, tal vez solamente superada por Brasil y Colombia. El número de especies equivale al 8.7 % del total mundial y de las cuales el 50.4 % son endémicas del territorio mexicano (Martínez-Meyer *et al.*, 2014; Villaseñor y Ortiz, 2014).

Importancia de la biodiversidad

La biodiversidad, principalmente la vegetal, contribuye a la regulación del equilibrio ecológico del planeta y nos proporciona múltiples componentes ambientales o lo que en ecología se conocen como servicios ecosistémicos: la regulación del clima, la formación de suelos, la captación del agua, la generación de oxígeno, la mitigación y la absorción de gases, la fijación y regulación de ciclos biogeoquímicos, además de que genera distintos tipos de energía, entre otros. La biodiversidad es esencial para la adaptación a ambientes específicos y para la continua evolución de las especies. Cuanto mayor sea la diversidad vegetal en el mundo, más seres vivos se pueden valer de ella (González-Caballero, 2008; Neyra y Durand, 1998).

Amenazas a la biodiversidad

El estudio de la biodiversidad ha revelado que las actividades humanas ejercen una marcada influencia en la disminución del número de especies, en el tamaño y la variabilidad genética de las poblaciones silvestres y en la pérdida irreversible de hábitats y ecosistemas, esto se debe a (1) sobreexplotación por parte del hombre, incluyendo actividades legales (como la pesca) e ilegales (como el tráfico de especies amenazadas); (2) destrucción de hábitats causada por diversas actividades productivas, que incluyen principalmente la deforestación; (3) los efectos negativos de las interacciones con enemigos naturales introducidos o

favorecidos por las actividades humanas (como depredadores, patógenos y competidores) y (4) la influencia de compuestos químicos y tecnologías utilizados en la fertilización de suelos, fumigación de cultivos y la construcción de grandes obras de ingeniería (contaminación) (Neyra y Durand, 1998).

El uso y el conocimiento de la biodiversidad, junto con la industria y el comercio, son fundamentales para el desarrollo de un país, por lo que la biodiversidad debe ser conservada y aprovechada adecuadamente, de tal manera que ambos procesos, desarrollo y conservación, se encuentren estrechamente vinculados (Neyra y Durand, 1998).

En la enorme diversidad vegetal de nuestro país, destaca la familia Agavaceae dado que la mayoría de sus especies se encuentran en nuestro país.

Familia Agavaceae

En este estudio se sigue la propuesta de clasificación de Dahlgren *et al.* (1985) para esta familia. En años recientes, el APG IV (Angiosperm Phylogeny Group) (2016) considera a la familia Agavaceae (como subfamilia Agavoideae) dentro de la familia Asparagaceae. Sin embargo, esta propuesta no es conclusiva pues está basada en análisis moleculares con apenas el 5% de las especies consideradas en la familia Agavaceae (García-Mendoza y Chávez-Rendón, 2013).

La familia Agavaceae se distribuye únicamente en el continente americano (García-Mendoza y Chávez-Rendón, 2013). Se conforma de 9 géneros y 340 especies conocidas. México es el centro de mayor riqueza y diversidad con 261 especies (76% de las especies totales) y el 70% son endémicas (García-Mendoza, 2011).

Género *Agave*

La distribución de este género abarca desde el norte en el estado de Dakota del Norte en los Estados Unidos de América y, al sur, se extiende a través de Los Andes hasta Bolivia y Paraguay, incluyendo las Antillas (García-Mendoza, 1995). Los agaves se agrupan en el género *Agave*, que quiere decir “noble” o “admirable”, y fue propuesto por Carlos Linneo en 1753 (Carreón *et al.*, 2011). Se tienen

registradas un total de 166 especies para todo el mundo, de las cuales 125 se consideran como especies nativas en México y de éstas, aproximadamente 58% son endémicas (García-Mendoza y Galván, 1995). De las 125 especies en nuestro país, 18 se encuentran en alguna categoría de riesgo en la NOM–059–SEMARNAT-2010 (Tabla 1.1) (SEMARNAT, 2010).

Tabla 1.1. Especies de *Agave* que se encuentran en la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, en alguna categoría de riesgo. (Pr= sujeta a protección especial, A= amenazada y P= en peligro de extinción)

| Especie | Nombre común | Distribución | Categoría de riesgo |
|-----------------------------|-----------------------|--------------|---------------------|
| <i>Agave bracteosa</i> | Maguey huasteco | Endémica | A |
| <i>A. chiapensis</i> | Maguey chamula | Endémica | Pr |
| <i>A. congesta</i> | Maguey tzotzil | No endémica | Pr |
| <i>A. dasylirioides</i> | Maguey intrépido | Endémica | A |
| <i>A. guiengola</i> | Maguey plateado | Endémica | A |
| <i>A. gypsophila</i> | Maguey gipsófilo | No endémica | Pr |
| <i>A. impressa</i> | Maguey masparillo | Endémica | A |
| <i>A. kewensis</i> | Maguey de Grijalva | Endémica | Pr |
| <i>A. lurida</i> | Maguey de la luna | Endémica | P |
| <i>A. nizandensis</i> | Maguey de Nizanda | Endémica | P |
| <i>A. ornithobroma</i> | Maguey pajarito | No endémica | Pr |
| <i>A. parrasana</i> | Maguey de Parras | Endémica | Pr |
| <i>A. parviflora</i> | Maguey sóbari | No endémica | A |
| <i>A. peacockii</i> | Maguey fibroso | Endémica | Pr |
| <i>A. polianthiflora</i> | Maguey de colibrí | No endémica | A |
| <i>A. titanota</i> | Maguey del sol | Endémica | Pr |
| <i>A. victoriae-reginae</i> | | Endémica | P |
| <i>A. vizcainoensis</i> | Maguey de El Vizcaíno | Endémica | Pr |

Importancia biológica y económica del género *Agave*

Los agaves tienen gran relevancia ecológica dado que pueden jugar un papel preponderante en la estructura trófica, funcional y fisonómica del ecosistema. A nivel fisonómico pueden presentar dominancia o codominancia en matorrales xerófilos, especialmente aquellos denominados crasicales y rosetófilos (Rzedowski, 1978).

En zonas áridas son un recurso importante debido a su naturaleza perenne, ya que en época de secas son la única fuente de néctar y agua (Rzedowski, 1978; Nobel, 1994; Arizaga *et al.*, 2000). En cuanto a su historia de vida, los agaves son semélparos, es decir, se reproducen sexualmente sólo una vez en su ciclo de vida: realizan un gran esfuerzo reproductivo, con grandes inflorescencias que generalmente poseen abundante néctar y duran varios meses o más de un año (Young y Augspurger, 1991). Esta característica es importante ya que interacciona con una amplia variedad de animales polinizadores y ladrones de néctar y polen como: abejas, abejorros, moscas, hormigas, colibríes, calandrias y otras especies de aves, polillas y murciélagos (Gentry, 1982; Cadaval, 1999; Arizaga *et al.*, 2000). A su vez, las pencas también son recursos alimenticios de otros organismos, como polillas (gusanos de maguey), hongos y bacterias, y son refugios para insectos, arañas, reptiles y roedores (Tambutti, 2002).

También contribuyen a la conservación de suelos: disminuyen la erosión y favorecen la detención de sedimentos y disminución de aguas de escorrentías. Al crecer en suelos de poca profundidad o muy escasos, son parte de las plantas que dan inicio a la sucesión vegetal (Arias, 2011).

La cantidad de frutos y semillas viables que produce un agave varía de acuerdo a la especie. Aunque la proporción de semillas viables es alta, en el campo es difícil que la mayoría de ellas germinen y que las plántulas se establezcan debido a desecación y herbivoría (Arias, 2011).

Por otro lado, los agaves representan uno de los recursos naturales de mayor importancia desde el punto de vista económico, social y agroecológico en México. El uso del agave se remonta a la época prehispánica, cuando los pueblos indígenas del centro y norte del país encontraron en esta planta una fuente de materias primas para elaborar una gran cantidad de productos (García-Herrera *et al.*, 2010). Los principales usos de importancia socioeconómica y agroecológica se citan en la Tabla 1.2.

Tabla 1.2 Distintos usos que se les da a diferentes especies de *Agave*. Modificado de García-Herrera *et al.*, 2010 y Rivera, 2015.

| Usos | Producto | Parte de la planta | Especies |
|---------------------|--|---|---|
| Alimentación | Guisos | Flores y frutos (cápsulas frescas) | <i>A. americana</i> , <i>A. angustifolia</i> , <i>A. angustiarum</i> , <i>A. applanata</i> , <i>A. chiapensis</i> , <i>A. karwinskii</i> , <i>A. marmorata</i> , <i>A. potatorum</i> , <i>A. rhodacantha</i> , <i>A. salmiana</i> , <i>A. seemanniana</i> . |
| | Dulce | pedúnculo floral (quiote) | |
| | Envoltura de barbacoa y mixiotes | Hojas | |
| | Pan de pulque | Tallo | |
| Bebidas | Aguamiel, atole de aguamiel, pulque, mezcal, tequila, bacanora, vinagre, jarabe. | Tallo | <i>A. americana</i> var. <i>americana</i> , <i>A. americana</i> var. <i>oaxacensis</i> , <i>A. mapisaga</i> , <i>A. salmiana</i> var. <i>ferox</i> , <i>A. salmiana</i> var. <i>salmiana</i> , <i>A. tequilana</i> , <i>A. angustifolia</i> , <i>A. potatorum</i> , <i>A. vivipara</i> , <i>A. karwinskii</i> , <i>A. marmorata</i> , <i>A. rhodacantha</i> , <i>A. seemanniana</i> . |
| Agrícola | Abono orgánico (fertilizante) | Composta de hojas | <i>A. tequilana</i> |
| Forraje | Alimento para ganado bovino, caprino y porcino | Hojas, flores y parte de la inflorescencia, bagazo. | <i>A. americana</i> , <i>A. angustifolia</i> , <i>A. atrovirens</i> , <i>A. ghiesbreghtii</i> , <i>A. karwinskii</i> , <i>A. macroacantha</i> , <i>A. rhodacantha</i> , <i>A. salmiana</i> , <i>A. scaposa</i> , <i>A. stricta</i> . |
| Construcción | Cercas, casas (jacales), corrales. | Escapo floral y plantas completas. | <i>A. americana</i> , <i>A. angustiarum</i> , <i>A. angustifolia</i> , <i>A. atrovirens</i> , <i>A. ghiesbreghtii</i> , <i>A. karwinskii</i> , <i>A. macroacantha</i> , <i>A. marmorata</i> , <i>A. salmiana</i> , <i>A. stricta</i> . |
| | Materiales compuestos: resinas termoplásticas o termófilas + fibras. | Residuos de fibras. | |
| Fibras | Cordelería, jarcería, cestería, escobetillas y cepillos para limpieza con jabón incluido, estropajos, tejido y vestuario | Fibras de hojas y raíces | <i>A. americana</i> var. <i>americana</i> , <i>A. americana</i> var. <i>oaxacensis</i> , <i>A. angustiarum</i> , <i>A. angustifolia</i> , <i>A. convallis</i> , <i>A. horrida</i> , <i>A. fourcroydes</i> , <i>A. sisalana</i> . |
| Medicinal | Alivio contra golpes y lesiones internas, tratamiento en personas con falta de movimiento en extremidades, prevención de escorbuto, antiinflamatorio, tratamiento contra la anemia | Hojas | <i>A. americana</i> , <i>A. angustiarum</i> , <i>A. marmorata</i> , <i>A. potatorum</i> . |
| Ornamental | Adornos corporales | Semillas | <i>A. americana</i> , <i>A. victoriae-reginae</i> , <i>A. angustifolia</i> , <i>A. applanata</i> , <i>A. dasylirioides</i> , <i>A. guiengola</i> , <i>A. isthmensis</i> , <i>A. macroacantha</i> , <i>A. salmiana</i> , <i>A. stricta</i> . |
| | Arcos florales | Fibras de las hojas | |
| | Ornamental en jardines, calles y camellones | Planta completa | |
| Otros usos | Industria química, farmacéutica, medicamentos y productos esteroides (saponinas), productos de celulosa para papel, producción de etanol, celulosa y glucósidos. | Principalmente hojas | <i>A. tequilana</i> . |

Ejemplos son el henequén (*Agave fourcroydes* Lem.) y el sisal (*Agave sisalana* Perr.) del cual se obtienen fibras duras para la fabricación de cuerdas, sacos, esterillas, así como el tequila (*Agave tequilana* Weber), y bacanora (*Agave angustifolia* Haw.), que son fuente de bebidas alcohólicas. Algunas especies como el *Agave victoriae-*

reginae, T. Moore son muy apreciadas como plantas ornamentales. Los productos adicionales que se pueden obtener a partir de agaves incluyen esteroides para productos farmacéuticos y alimentos para animales, jarabes de altos niveles de fructosa, derivados de inulina para la producción de prebióticos, etc. (Robert *et al.*, 2006).

A pesar del potencial económico de los agaves, pocas especies han sido estudiadas a fondo para dilucidar dicho potencial. Aquellas especies utilizadas no son propagadas por métodos eficientes que hagan sustentable su aprovechamiento y, en muchos casos, son saqueadas de su ambiente, esto combinado con la destrucción de sus hábitats (por actividades humanas principalmente), sus largos ciclos de vida (entre 8 a 20 años, dependiendo de la especie) y la reproducción sexual limitada (con únicamente una floración a lo largo de su vida) las han colocado en una categoría de riesgo (Lock, 1985).

Agave guiengola Gentry

Clasificación taxonómica (Dahlgren *et al.*, 1985)

Superorden: Liliiflorae

Orden: Asparagales

Familia: Agavaceae

Género: *Agave*

Especie: *Agave guiengola* Gentry, 1960

Nombre común: Maguey plateado

Características

Descripción: Plantas acaules, rosetas de tamaño medio, abiertas, simples. Hasta 30 hojas por roseta (Figura 1.1a). Hojas 30-42 cm de largo, 14-19 cm de ancho, ovadas a ovado-lanceoladas, glaucas o blanquecinas, cortamente acuminadas, epidermis densamente papilada; espina de 10-20 mm de longitud, acicular, pardo oscuro, margen aserrado, dientes planos (Figura 1.1c). Inflorescencia espigada (Figura 1.1b), (1.6-) 2-4 (-5) m de longitud, con flores casi desde la base, erecta, brácteas

oscuras. Flores 30-45 mm de longitud, inconspicuas, amarillo-blanquecinas; tubo 2-4 mm, infundibuliforme, tépalos más largos que el tubo, elípticos a lanceolados, amarillo- pálidos o blanco-amarillentos; filamentos 15-21 mm, amarillentos; ovario ínfero, 11-14 mm de longitud, profundamente surcado, con el cuello constreñido, verde (Figura 1.1c-d). Frutos 2.2-2.4 x 1.3-1.8 cm, oblongos. Semillas pequeñas, oscuras (Eggli, 2001), 60 semillas por fruto aproximadamente (obs. pers., 2017). De acuerdo a Gentry (1982), algunos individuos desarrollan hijuelos.

Fenología: Las flores se desarrollan durante los meses de febrero y marzo y los frutos en abril (IB, 2010). Produce aproximadamente 1600 flores y mismo número de frutos (obs. pers., 2017).

Distribución: Una pequeña población de *A. guiengola* se encuentra en el Municipio de Tehuantepec, Distrito de Tehuantepec, en el Estado de Oaxaca, México (Figura 1.2) (Palma, 1991). La especie se conoce únicamente del Cerro Guiengola (en zapoteco significa 'piedra grande' o 'piedra antigua'), Oaxaca. El área de distribución de *A. guiengola* es aproximadamente 4530 hectáreas (García-Mendoza, 2003), la cual es una superficie muy restringida comparándola con la distribución de otras especies oaxaqueñas como *A. potatorum* (presente en Oaxaca y Puebla) y *A. macroacantha* (Valle de Tehuacán y norte de Oaxaca) (Gentry, 1982).



Figura 1.1. *Agave guiengola*. (a) Plantas creciendo sobre una pirámide de la zona arqueológica del cerro; (b) Inflorescencia; (c) esquema de hojas y flores de *A. guiengola* (Gentry, 1960); (d) flor de *A. guinegola*.

Hábitat

A. guiengola crece en los acantilados del Cerro Guiengola, se desarrolla al pie y en las paredes del cerro, en pendientes de hasta 90°, de la porción NW del cerro. Habita en climas cálidos húmedos con lluvias en verano y otoño, en altitudes de 200 a 800 m. y con temperatura promedio anual de 28.2 °C (Palma, 1991). Se encuentra sobre litosoles, suelos jóvenes con una profundidad menor de 10 cm y son muy

susceptibles a la erosión, incluso crece sobre vestigios arqueológicos presentes en el cerro (1.1a) (Torres-Colín, 1989).

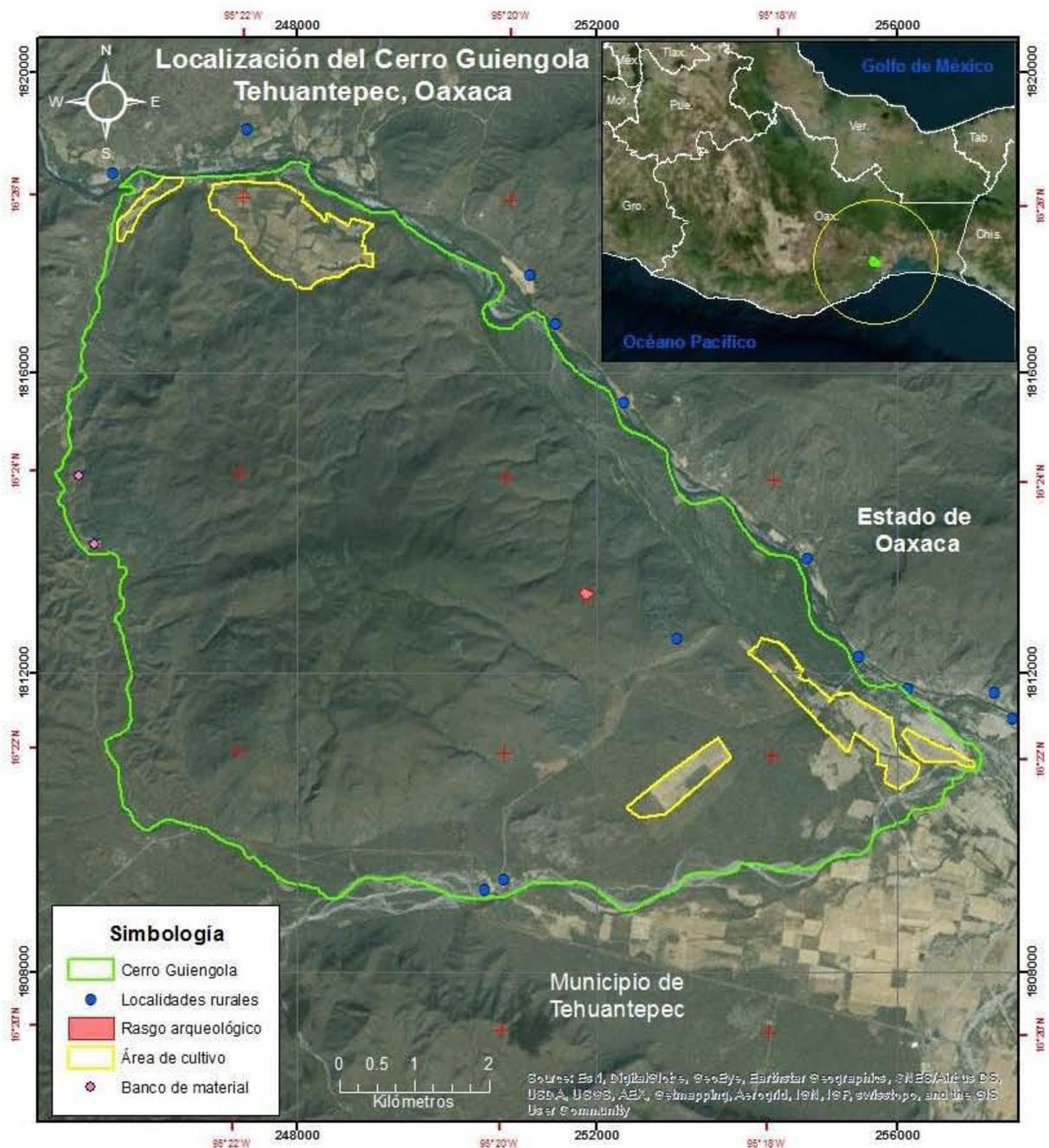


Figura 1.2. Localización geográfica del cerro Guiengola.

Tipo de vegetación

Corresponde a selva baja caducifolia y caducifolia espinosa (Figura 1.3), las especies arbóreas más abundantes son: *Ceiba parvifolia*, *Fouquieria formosa*, *Bursera simaruba*, *Plumeria rubra* y *Lysiloma divaricata*; además de los árboles, las formas básicas de estas selvas son los arbustos, lianas y hierbas, también se hallan cactáceas y plantas de formas arrosetadas que se encuentran representadas por especies de los géneros *Agave*, *Cephalocereus*, *Escontria*, *Pereskia* y *Stenocereus* (Torres–Colín 2004).



Figura 1.3. Selva baja caducifolia en el Cerro Guiengola.

Importancia biológica y ecológica

A. guiengola es relevante debido a su interacción con sus polinizadores, además es fuente de alimento para distintos organismos, refugio para varias especies y

favorece la formación y conservación de suelo. Sin embargo, no existen trabajos relacionados con su ecología o su papel en la dinámica del Cerro Guiengola.

Usos

Es una especie de uso ornamental (Tabla 3.2) por sus distintivas hojas glaucas (verde azuladas), gruesas y anchas y por sus dientes oscuros y anchos en el borde de sus hojas, lo que las hace más atractivas a los coleccionistas. Howard S. Gentry (1960) menciona que localmente se usa el mucílago de sus hojas, sin embargo, no se menciona con qué objetivo ni de qué forma. Actualmente, los habitantes cercanos al cerro comentan que no le dan ningún uso a esta especie.

Problemática y conservación de *Agave guiengola*

Se ha reportado que en la parte baja de la montaña se lleva a cabo la extracción de mármol (García-Mendoza, 2003), lo que a mediano o largo plazo podría destruir el hábitat de *A. guiengola*. De acuerdo a testimonios de habitantes aledaños al cerro, ocasionalmente se hace extracción de individuos de esta especie por parte de personas ajenas a la comunidad. Por otro lado, los mismos habitantes señalan que la región vive en sequía desde hace tres años, lo que ha repercutido en la muerte de muchos ejemplares de esta especie y otras más que habitan en el cerro.

Debido a lo anterior, la especie está catalogada como (A) amenazada por la NOM-059-SEMARNAT-2010. Lo que significa que la especie podría llegar a encontrarse en peligro de desaparecer a corto o mediano plazo si siguen operando los factores que inciden negativamente en su viabilidad, al ocasionar el deterioro o modificación de su hábitat o disminuir directamente el tamaño de sus poblaciones. A pesar de esto, no existen proyectos o estrategias de conservación y manejo específicas para esta especie (García-Mendoza, 2003).

Estrategias de conservación

En relación a las estrategias para la conservación de los recursos naturales (en este caso, los recursos vegetales) se pueden llevar a cabo dos formas: la conservación *in situ* y la conservación *ex situ* (Bacchetta *et al.*, 2008).

La conservación *in situ* está orientada a preservar el hábitat natural y las especies que éste contiene con el objetivo de proteger la diversidad genética y mantener su dinámica y complejidad (interacciones entre los organismos y su ambiente) (Primack *et al.*, 2001).

La conservación *ex situ* se realiza fuera del hábitat natural y se considera como complementaria a la conservación *in situ*. Está orientada a prevenir la extinción de especies bajo condiciones artificiales y supervisión humana, ejemplos son los jardines botánicos (Jardín Botánico del Instituto de Biología, UNAM), bancos de germoplasma (Banco Nacional de Germoplasma Vegetal, UACH) y cultivos *in vitro* (cultivo de tejidos vegetales), de modo que es posible preservar parte de la diversidad genética de aquellas especies vegetales en alguna categoría de riesgo (Primack *et al.*, 2001; Primack, 2002; Bacchetta *et al.*, 2008).

Como estrategia *ex situ*, el Cultivo de Tejidos Vegetales es una eficiente herramienta para la conservación y la propagación de *Agave guiengola* y de otras especies de *Agave* en peligro de extinción, pues nos permite obtener gran cantidad de plantas con poco material vegetal inicial y además es una herramienta que facilita el realizar estudios sobre fisiología y bioquímica (Lascuráin *et al.*, 2009).

Cultivo de tejidos vegetales

El cultivo de tejidos vegetales (CTV) es la rama de la biotecnología dedicada al cultivo de células, tejidos u órganos de plantas aislados de la planta madre, en un medio artificial. Incluye técnicas y métodos que hacen posible dividir un organismo en sus bloques constituyentes y cultivar asépticamente *in vitro*: protoplastos, células, tejidos, órganos, embriones y plántulas en condiciones controladas (medio nutritivo, luz, temperatura, pH, reguladores de crecimiento vegetal, etc.), permitiendo al investigador variar las condiciones de cultivo y el tipo de explante y llegar a dirigir las respuestas morfogénicas y biosintéticas de las células, pudiendo lograr una vez superada la fase experimental una gran variedad de objetivos: almacenamiento o conservación de germoplasma, mejoramiento genético, hibridación, investigación básica, propagación y la obtención de plantas libres de patógenos. El cultivo de tejidos vegetales se fundamenta en la totipotencialidad celular, por lo que

teóricamente de cualquier parte de la planta se pueden generar nuevas plantas. (George *et al.*, 2008; González-Caballero, 2008).

El CTV nos permite realizar la micropropagación de cualquier especie. George y col. (2008) definen la micropropagación como el cultivo de fragmentos de plantas (explantes) con métodos de propagación *in vitro* para aumentar considerablemente el número de plantas.

Tabla 1.3. Ejemplos de plantas de importancia alimenticia propagadas por cultivo de tejidos vegetales.

| Especie | Nombre común | Explante | Medio y RCV | Respuesta / observaciones | Referencia |
|---------------------------------|--------------|--------------------------------|-------------------------------|--|--------------------------------|
| <i>Fragaria vesca</i> | Fresa | Meristemo apical | Knop; BAP 1 mg/L | Plantas libres de virus | Boxus <i>et al.</i> , 1977. |
| <i>Solanum tuberosum</i> | Papa | Yemas axilares | MS | Activación de yemas, 12, 000 plantas después de 12 semanas. | Hussey y Stacey, 1981. |
| <i>Vitis vinífera</i> (híbrido) | Vid | Ápices de ramas | MS; BAP 3 mg/L | 12, 000 brotes en 4 meses | Harris y Stevenson, 2016. |
| <i>Psidium guajava</i> | Guayaba | Embriones cigóticos inmaduros, | MS; 2,4-D 2 mg/L | Embriogénesis somática indirecta, 250 embriones por explante en 10 semanas | Akhtar, 2013. |
| <i>Cucumis sativus</i> | Pepino | Cotiledón | MS; ANA 2.6 mM y BAP 4.44 mM. | Organogénesis indirecta, 35 brotes por explante en 16 semanas | Selvaraj <i>et al.</i> , 2007. |

Con el aumento acelerado de la población humana, la demanda mundial de productos vegetales (principalmente para la alimentación) se incrementará en las próximas décadas, así como las necesidades ecológicas de reforestación, lo que hace necesario producir plantas en suficiente cantidad. Los métodos tradicionales de propagación por semillas y por vía vegetativa ya no resultan eficientes para cubrir la demanda de alimentos o con fines de reforestación por lo que buscar y aplicar una mejor alternativa de producción es indispensable. A nivel mundial, el cultivo de

tejidos vegetales ha permitido propagar especies agrícolas y agronómicas (Tabla 1.3) en un tiempo y cantidad que podrían abastecer las necesidades actuales y futuras lo que hace a esta biotecnología una alternativa viable (González-Caballero *et al.*, 2012).

El CTV puede dividirse en 5 fases o etapas:

En la etapa 0 se hace la selección de las plantas madre y su preparación. Antes de que comience el cultivo *in vitro* se debe prestar atención a la selección de la planta madre. La planta debe corresponder a la especie o variedad deseada y que cumpla con ciertas características que se desee conservar en las plantas clonadas (Debergh y Maene, 1981).

La etapa 1 consiste en el establecimiento aséptico del cultivo. Para ello primeramente se debe elegir el tipo, tamaño y estado de desarrollo del explante y someterlo a un proceso de desinfección para posteriormente sembrarlo, en condiciones asépticas (Murashige, 1974).

La composición del medio de cultivo es factor determinante para el desarrollo de las células y tejidos vegetales *in vitro*. Los medios de cultivo se componen, además de macro y micronutrientes, de agua destilada, algunas vitaminas, algunos aminoácidos, una fuente de carbono (comúnmente sacarosa), y, si se trata de un medio semisólido, un gelificante (George *et al.*, 2008).

Los requerimientos nutricionales básicos para el crecimiento óptimo de células y tejidos *in vitro* pueden variar con respecto a la especie que se cultiva, por lo que no existe un medio de cultivo universal para todas las especies, sin embargo, diferentes composiciones de medios nutritivos que se han formulado con base en requerimientos específicos para sistemas de cultivo en particular, han sido extensamente utilizadas como punto de partida para el establecimiento de distintas especies (Fuentes-Molina, 2013).

El medio de cultivo más comúnmente utilizado es el medio MS (George *et al.*, 2008). El medio de Murashige y Skoog (1962) se caracteriza, por una alta concentración

de nitrógeno (aproximadamente 60 meq/L, el cual una tercera parte está disponible en forma reducida), y una concentración igualmente elevada de potasio (Margara, 1988). En el Anexo 1 se enlistan todos los componentes del medio MS y la concentración de cada uno.

Otros componentes que pueden agregarse al medio de cultivo y que son de gran importancia para la inducción de respuestas morfogénicas son los reguladores de crecimiento vegetal.

Las fitohormonas son compuestos orgánicos que sintetizan las plantas superiores en sus tejidos (es decir, endógenamente), que tienen efecto a muy bajas concentraciones y que tienen actividad regulatoria en el crecimiento y en el desarrollo. Existen compuestos sintéticos con actividad fisiológica similar a las hormonas de crecimiento y cuando estos compuestos (incluso también los compuestos de origen natural) son añadidos al medio de cultivo (es decir, exógenamente) se les denomina como reguladores de crecimiento vegetal (RCV; George *et al.*, 2008; Fernández-Tellez, 2014).

Hasta la fecha se reconocen distintos tipos o grupos de hormonas vegetales: auxinas, citocininas, giberelinas, etileno, ácido abscísico, brasinoesteroides, ácido salicílico y jasmonatos (George *et al.*, 2008).

Las auxinas y las citocininas son las más importantes para la regulación del crecimiento y la morfogénesis en el CTV.

Auxinas

Las auxinas son extensamente usadas en el CTV y usualmente son parte integral del medio de cultivo. Las auxinas promueven *in vitro*, principalmente en combinación con citocininas, la formación y crecimiento de callo, proliferación de células en suspensión y crecimiento de órganos, y también regulan la dirección de la morfogénesis. A nivel celular, las auxinas controlan procesos básicos tales como la división y elongación celular. Debido a que son capaces de iniciar la división celular están involucradas en la formación de meristemas los cuales pueden dar lugar ya sea a tejido desorganizado o a órganos bien definidos. En tejidos organizados, las

auxinas están involucradas en el establecimiento y mantenimiento de la polaridad, y en toda la planta su efecto más notable es el mantenimiento de la dominancia apical y la mediación de tropismos (George *et al.*, 2008).

Entre las auxinas naturales más comúnmente empleadas en CTV se encuentra el ácido indol-3- acético (AIA) y el ácido indol-3-butírico (AIB), y las sintéticas son el ácido naftalen-1-acético (ANA) y el ácido-2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D); su efecto *in vitro* produce: elongación celular, expansión de los tejidos, división celular, frecuentemente son empleadas en altas concentraciones para la inducción de la embriogénesis somática y la formación de callo, mientras que en concentraciones bajas predomina la formación de raíces adventicias (Pierick, 1990).

Citocininas

Las citocininas son sustancias orgánicas, derivadas de la adenina o de la difenilurea, involucradas en la división celular, el rompimiento de la dominancia apical y la activación de yemas axilares. En CTV, concentraciones elevadas en el medio de cultivo pueden inducir la activación de yemas preformadas (axilares) ya que rompen con la dominancia apical, en combinación con auxinas se promueve la formación de brotes adventicios de forma tanto directa como indirecta, a bajas concentraciones (en combinación de auxina) induce la formación de callo embriogénico, y altas concentraciones inhiben la formación de raíces. La 6-bencilaminopurina (BAP), la N-6 dimetil alil aminopurina (2iP), la TDZ y la Kinetina (KIN) son las citocininas que se utilizan frecuentemente en el CTV (Pierick, 1990; George *et al.*, 2008).

Oxidación

Cuando se cultiva *in vitro*, la oxidación puede ocasionar serios problemas en el establecimiento y supervivencia de los explantes de la mayoría de las especies; cuando los tejidos son dañados se liberan especies reactivas de oxígeno y compuestos fenólicos, que se manifiestan con un ennegrecimiento del medio de cultivo alrededor del explante y que se puede extender a todo el medio, provocar daños al crecimiento y hasta la muerte del explante. Una de las prácticas más comunes para evitar la oxidación fenólica es agregar antioxidantes al medio de

cultivo que son inhibidores de la polifenol oxidasa o agentes reductores, o adsorbentes que se usan para adsorber compuestos tóxicos o los RCV en exceso que están presentes en el medio de cultivo (Preece y Compton, 1991; George *et al.*, 2008). Los antioxidantes más empleados son los ácidos ascórbico y cítrico, y los adsorbentes más comunes, el carbón activado y la polivinilpirrolidona (PVP), este último compuesto adsorbe fenoles a través de puentes de hidrógeno previniendo su oxidación y polimerización (Díaz *et al.*, 2006; Fernández-Tellez, 2014).

Morfogénesis

En la etapa 2 se da la proliferación del tejido. En esta etapa se da el aumento en número de órganos y otras estructuras que en última instancia darán lugar a nuevas plantas (Murashige, 1974). Son tres vías morfogénicas para la propagación *in vitro*: (1) embriogénesis somática directa e indirecta, (2) organogénesis que puede ser directa e indirecta y (3) la formación de brotes a partir de yemas axilares (activación de yemas preformadas) y meristemos apicales (Figura 1.4) (Martínez, 1998).

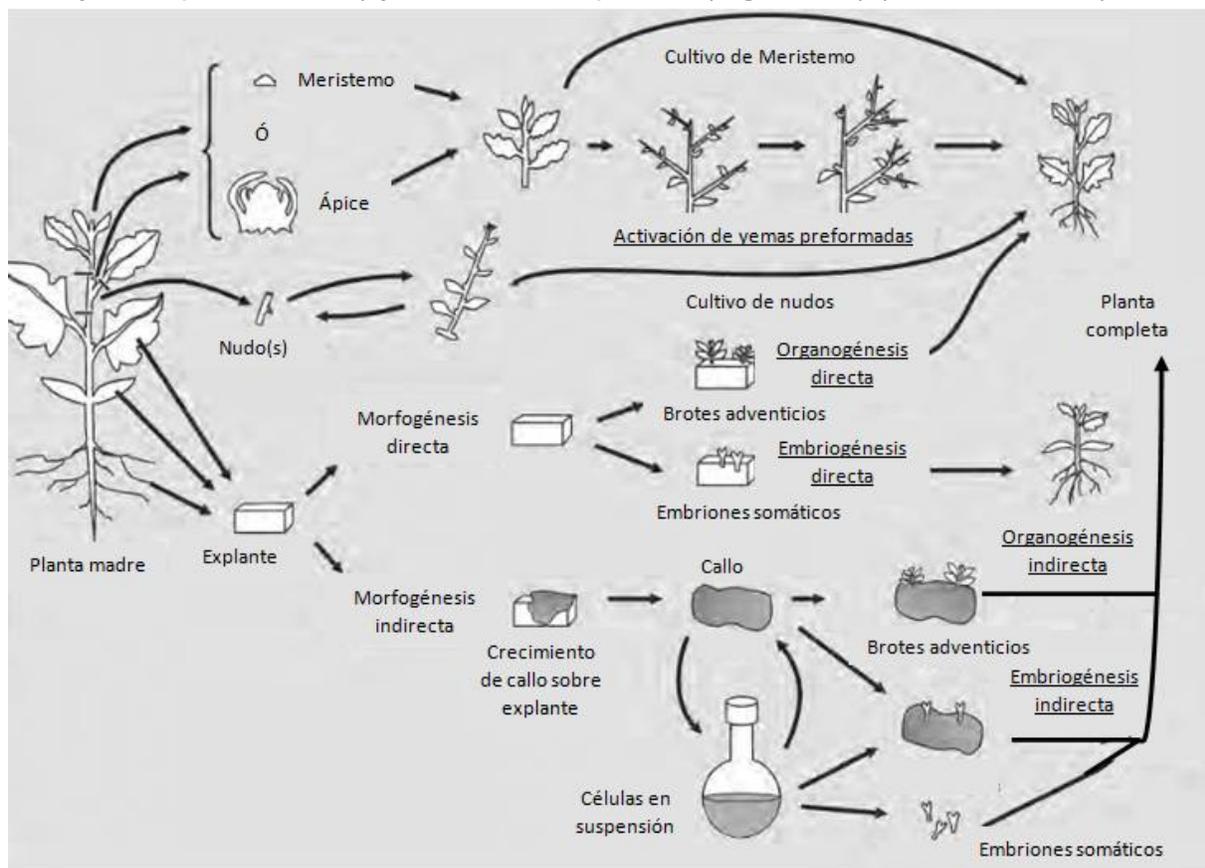


Figura 1.4 Vías morfogénicas del CTV. Modificado de George *et al.*, 2008.

Organogénesis

La organogénesis es la formación de órganos adventicios como tallos, raíces y hojas; generalmente se obtiene por acción de citocininas en mayor concentración que auxinas en el medio de cultivo (González-Caballero *et al*, 2012). Se puede obtener por dos vías: directa o indirecta. En la vía directa se desarrolla un órgano directamente a partir de las células del explante (hojas, tallo, raíces, etc.). La vía indirecta consiste en la formación de órganos a partir de un conjunto de células desorganizadas, indiferenciadas y con altas tasas de división celular (conocido como callo) (George *et al.*, 2008). En la Figura 1.5 se muestran estudios histológicos que comprobaron la organogénesis en distintas especies cultivadas *in vitro*.

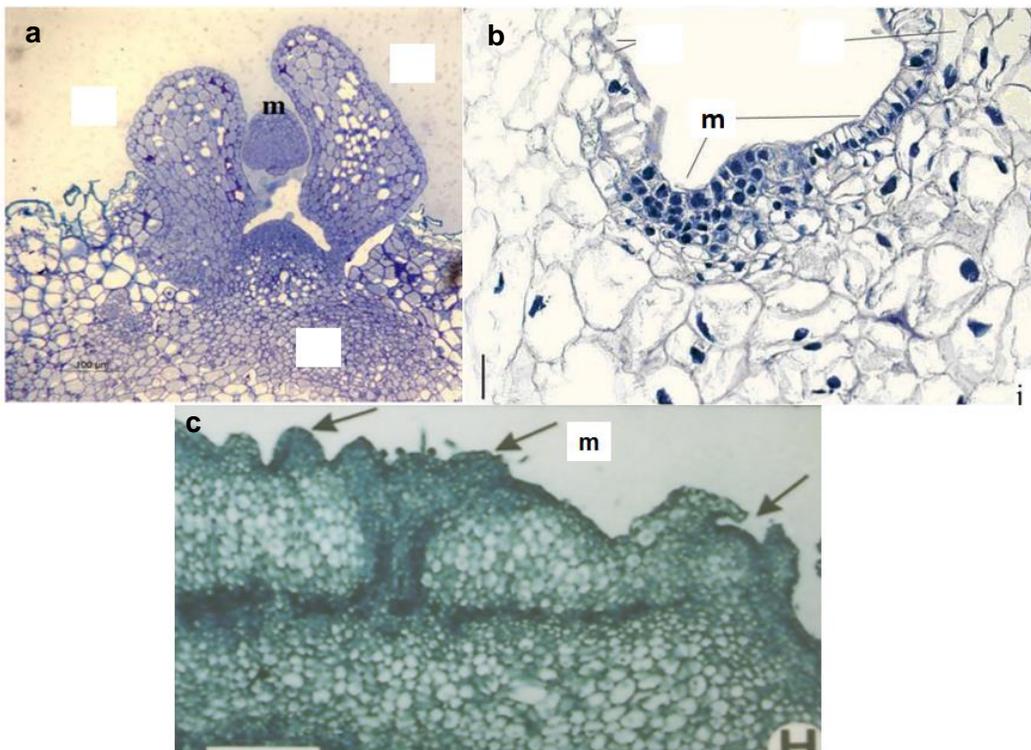


Figura 1.5. Estudios histológicos de organogénesis. (a) Corte longitudinal de entrenudo de *Citrus limon* dónde se observa el desarrollo de un meristemo apical (Navarro-García *et al.*, 2016). (b) Formación de tejidos meristemático en cultivo de botones florales de *Allium altissimum* (Poluboyarova *et al.*, 2014). (c) Corte transversal de cotiledón de *Phaseolus vulgaris* con desarrollo de meristemas (Franklin *et al.*, 1991).

Embriogénesis somática

La embriogénesis somática es la formación de embriones que no provienen de la fusión de los gametos masculinos y femeninos, sino que se desarrollan de una

célula de cualquier parte de la planta; de ahí el nombre de embriones somáticos (González-Caballero *et al.*, 2012). Generalmente se obtienen en un medio de cultivo con concentraciones de auxinas mayores a las concentraciones de citocininas. Su origen puede ser por vía directa o indirecta. La vía directa se refiere a la formación de embriones somáticos a partir de las células del explante, para ello las células del explante pueden estar en una condición predeterminada embriogénicamente (por ejemplo, anteras, ovarios, cotiledones, el hipocótilo, etc.) o adquirir esa condición (ciclos repetitivos de división celular). La embriogénesis somática por vía indirecta ocurre cuando los embriones se forman a partir de callo el cual se obtiene desde un explante que puede o no ser un tejido predeterminado embriogénicamente (George *et al.*, 2008). En la Figura 1.6 se presentan análisis histológicos de embriogénesis somática en especies de *Agave*.

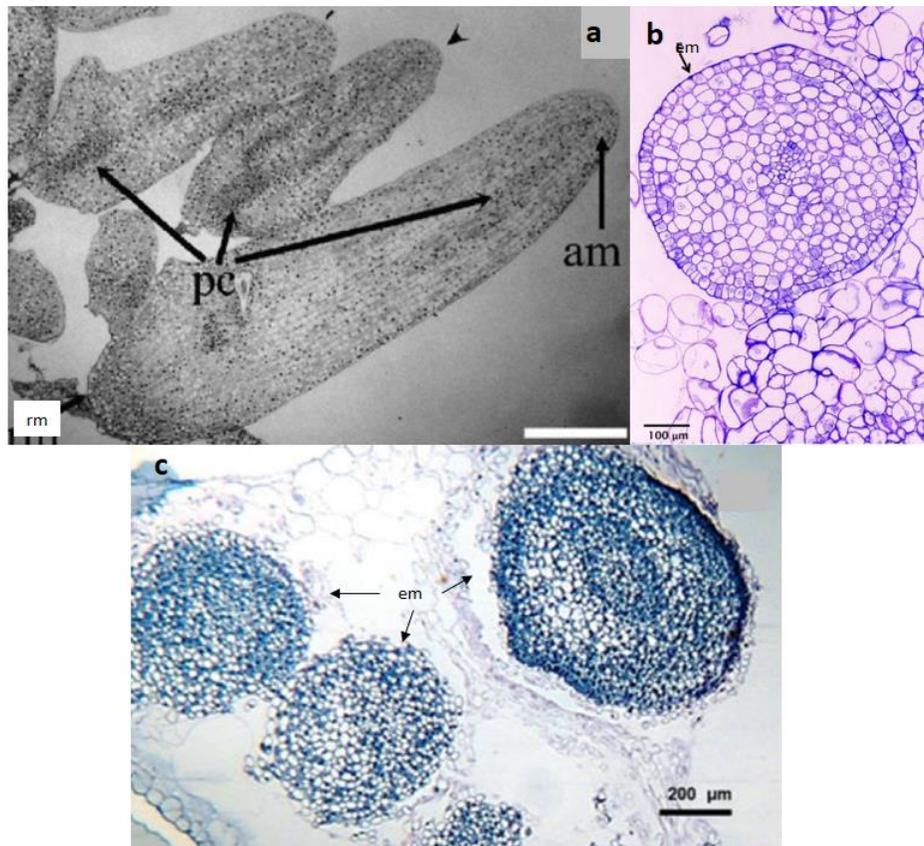


Figura 1.6. Estudios histológicos de embriogénesis somática en agaves. (a) Embriones somáticos en fase torpedo de *Agave tequilana* (Portillo *et al.*, 2007). (b-c) Embriones somáticos en estado globular en *A. victoriae-reginae* (b) y *Agave fourcroydes* (c) (Rivera, 2015; Monja-Mio y Robert, 2013). am: meristemo apical; em: embrión somático; pc: procambium; rm: meristemo radicular.

Activación de yemas preformadas

También existe la formación de brotes a partir de yemas preformadas. Las yemas o meristemos axilares se encuentran en las bases de las hojas, en la unión del peciolo con el tallo. Las yemas se desarrollarán en tallos luego de ser puestas en contacto con el medio de cultivo con citocininas para romper la dominancia apical y activar este tejido meristemático (González-Caballero *et al*, 2012).

Enraizamiento y aclimatización

La etapa 3 consiste en lograr que los brotes obtenidos en la etapa anterior queden individualizados, crezcan en tamaño y formen su raíz para ser plantas completas, para favorecer su posterior aclimatización. En el caso de las plantas clonadas por embriogénesis somática, en esta etapa se da la maduración y germinación de los embriones somáticos (González-Caballero *et al*, 2012).

Finalmente, en la etapa 4 lleva a cabo el proceso de transferencia de la planta de condiciones *in vitro* a condiciones *ex vitro*. Si no se lleva con cuidado, la transferencia puede resultar en la pérdida significativa del material propagado debido a lo siguiente: las plantas obtenidas por CTV se mantienen en condiciones de alta humedad, baja intensidad lumínica y total disponibilidad de nutrientes y fuente de carbono, por lo que presentan anomalías anatómico-fisiológicas (ceras cuticulares poco desarrolladas, mal funcionamiento de estomas y del mecanismo fotosintético) y que, al transferirlas a condiciones *ex vitro*, pierden agua rápidamente y son incapaces de sintetizar su propia fuente de carbono (George *et al.*, 2008). En la Tabla 1.4 se muestran algunas diferencias morfológicas entre las plantas propagadas *in vitro* y aquellas en condiciones *ex vitro*.

Las plantas *in vitro* tienen que adaptarse paulatinamente a las condiciones del suelo. Para una aclimatización exitosa se requiere un proceso previo de enraizamiento (Etapa III), su trasplante a un medio de cultivo con menor concentración de sales y libre de RCV. Después, las plantas se deben lavar cuidadosamente para eliminar todos los residuos del medio de cultivo, que pueden ser una fuente de contaminación. Posteriormente, se trasplantan a recipientes con suelo esterilizado

y se cubren con bolsas de polietileno, que se van perforando gradualmente con el objetivo de reducir poco a poco la humedad y adaptar paulatinamente las plantas a las condiciones del invernadero (Villalobos y Thorpe, 1991).

Tabla 1.4 Diferencias morfológicas de las plantas clonadas por CTV y plantas que se encuentran en condiciones *ex vitro*. Tomado de George *et al.*, 2008.

| Órgano | Tejido vegetal | <i>In vitro</i> | <i>Ex vitro</i> |
|--------------|-------------------|--|---|
| Tallo | Epidermis | Pequeña, limitada en desarrollo. | De mayor tamaño, completamente desarrollada. |
| | Corteza | Su desarrollo es incompleto, colénquima pequeño, gránulos de almidón en tallos viejos. | Completamente desarrollada, cilindro continuo del colénquima. |
| | Xilema y floema | Raíces se originan frecuentemente del parénquima floemático con citoplasma denso, almidón en células del parénquima en estadios tempranos. | Capas gruesas de esclerénquima en tejidos floemáticos de la estela. |
| | Haces vasculares | Poco desarrollados, el cambium tiene baja o nula actividad, gran número de gránulos de almidón. | Completamente desarrollados. |
| | Conexión con raíz | Discontinua, pobre conexión y poco desarrollo | Continua, conexión y desarrollo completos. |
| Hojas | Hojas | Pequeñas, brillantes e hiperhidratadas. | Tamaño normal y opacas. |
| | Epidermis | Paredes celulares delgadas y deformadas, irregulares. | Paredes celulares. |
| | Cutícula | Delgada y discontinua. | Gruesa y continua. |
| | Estomas | Células guarda irregulares, paredes celulares gruesas, estomas grandes. Siempre están abiertos | Células guarda normales. |
| | Mesófilo | Estructura irregular, parénquima en empalizado reducido, parénquima esponjoso altamente vacuolado y con muchos espacios aéreos. | Estructura regular y bien definida. Parénquima en empalizado y parénquima esponjoso bien diferenciados y desarrollados. |
| Raíz | Corteza | Amplia, irregular; células hipertrofiadas, alargadas e individuales; células corticales desordenadas. | Uniforme, compacta, células corticales ordenadas. |
| | Haces vasculares | Estrechos, inmaduros, limitada actividad del cambium. | Más amplios, actividad del cambium es normal. |

| | | |
|-------------------|---|---|
| Xilema y floema | Pobre desarrollo y diferenciación, limitado crecimiento secundario del xilema y floema, floema con plastidios y clorofila, gránulos de almidón. | Presencia de un xilema secundario definido. |
| Pelos radiculares | Escasos, gruesos, cortos y rectos, muchos fusionados. | Largos, finos y abundantes. |

Cultivo *in vitro* de *Agave*

Hasta el momento no se ha reportado ninguna investigación sobre cultivo *in vitro* de *Agave guiengola*. Sin embargo, se tiene gran cantidad de investigaciones sobre la propagación por CTV de distintas especies de *Agave*, por ejemplo *A. angustifolia*, *Agave arizonica*, *A. atrovirens*, *A. cupreata*, *A. difformis*, *A. fourcroydes*, *A. inaequidens*, *A. obscura*, *A. parrasana*, *A. potatorum*, *A. salmiana*, *A. sisalana*, *A. tequilana*, *A. victoriae-reginae* y *A. warelliana* (Tabla 1.5).

En estos trabajos los explantes iniciales utilizados son los tallos y hojas de plantas juveniles y también las semillas. En las investigaciones donde se usaron semillas, en todos los casos se reporta su desinfección superficial utilizando agua con jabón, etanol y cloro comercial + Tween 20.

Sobre la germinación *in vitro* de semillas de *Agave* cito a Martínez-Palacios y col. (2003) que trabajaron con semillas de *A. victoriae-reginae* y obtuvieron 90% de germinación después de 2 semanas y Ayala (2012) sembró semillas de *A. atrovirens* y obtuvo 50% de germinación. En ambos casos se sembraron en medio MS y fueron incubadas a 25°C, con fotoperiodo de 16 horas luz/oscuridad. Santos (2009) con *A. warelliana* obtuvo 88% de germinación después de 27 d igualmente a 25°C, pero en medio B5 y bajo oscuridad total. Rosales y col. (2008) sembraron semillas de *A. cupreata*, *A. difformis*, *A. karwinskii*, *A. obscura* y *A. potatorum* y reportan porcentajes de germinación de 68, 66, 63, 100 y 60 % respectivamente, en medio MS, incubadas a 25°C y expuestas a la luz las 24 horas. Mismas condiciones de incubación reporta Santos (2009), quien obtuvo 38% de germinación con semillas de *A. warelliana*.

Sobre las respuestas *in vitro* se han obtenido resultados efectivos de embriogénesis somática tanto directa como indirecta. Se ha obtenido principalmente a partir de los órganos de plántulas (hojas y tallo) y de embriones cigóticos maduros, en medio MS con alta concentración de auxina (2,4-D; 2-3 mg/L) y baja concentración de citocinina (BAP; 0.2 a 1 mg/L), generalmente en condiciones de obscuridad.

Por otro lado, se tienen gran número de reportes de organogénesis directa como resultado del cultivo *in vitro* de especies de *Agave*, con *A. parrasana* (Santacruz-Ruvalcaba *et al.*, 1999) se utilizaron los tallos de brotes propagados *in vitro* previamente, los cuales se sembraron en medio de cultivo con 10 mg/L de BAP regenerando brotes adventicios (hasta 48.6 brotes por explante después de 60 d); Sánchez-Urbina y col. (2008) sembraron plántulas de *A. grijalvensis* en medio de cultivo MS con 4, 8 o 12 mg/L de BAP obteniendo brotes adventicios (número total y promedio de brotes no publicado); Rosales y col. (2008) trabajaron con 5 especies de *Agave* usando los tallos de plántulas obteniendo también proliferación de brotes adventicios (hasta 10.5 brotes por explantes después de 90 d) cuando los explantes se encontraban en presencia de citocinina (BAP, 1.5 g/L).

En cuanto a organogénesis indirecta Groenewald y col. (1977) sembraron en medio de cultivo LS (Linsmaier y Skoog, 1965) con 5 mg/L de Kinetina y 1 mg/L de 2,4-D fragmentos de embriones cigóticos (*Agave* sp.) durante 6 meses, los cuales formaron callo y posteriormente se sembraron en medio sin reguladores donde se formaron brotes adventicios; Robert y col. (1987) utilizaron fragmentos de tallo de *A. fourcroydes* en medio MS con 1 mg/L de BAP y 0.25 mg/L de 2,4-D durante 7 semanas donde se formaron y proliferaron los callos a partir de los cuales, después de 16 semanas, se regeneraron brotes (6 brotes por explante); Hazra y col. (2002) utilizaron como explante hojas y tallo de plantas de *A. sisalana* propagadas *in vitro*, los cultivaron en medio MS con 1 mg/L de kinetina y 2 mg/L de 2,4-D durante 45 d lo que favoreció la formación de callo regenerativo, se subcultivó a medio de cultivo con 5 mg/L de BAP y se obtuvo 25.3 brotes por gramo de callo al término de 90 d; con *A. tequilana* Valenzuela-Sánchez y col. (2006) cultivaron fragmentos del tallo plantas juveniles (cortes longitudinales y transversales) en medio MS con 10 mg/L

de BAP y 0.25 mg/L de 2,4-D durante 30 d y obtuvieron callos regenerativos y brotes (14.5 brotes por explante) después de 30 d. Cabe resaltar que los explantes obtenidos por cortes transversales fueron más regenerativos mientras que en los explantes por corte longitudinal predominó la formación de callo.

Sobre el enraizamiento de brotes se obtuvieron excelentes resultados en medio MS al 100% y sin RCV en las siguientes especies: *A. arizonica*, *A. cupreata*, *A. difformis*, *A. inaequidens*, *A. obscura*, *A. parrasana*, *A. potatorum*, *A. tequilana* y *A. victoriae-reginae*, teniendo una supervivencia al transferirse a suelo de entre el 80 y 100 % después de 6 meses (Powers y Backhaus, 1989; Santacruz-Ruvalcaba *et al.*, 1999; Martínez-Palacios *et al.*, 2003; Valenzuela-Sánchez *et al.*, 2006; Aureoles-Rodríguez *et al.*, 2008).

Tabla 1.5. Especies de *Agave* propagadas por CTV.

| Especie | Explante | Medio de cultivo + RCV (mg/L) | Respuesta | Referencia |
|--|--|--|--|--|
| <i>A. angustifolia</i> | Embriones cigóticos maduros | MS 25% + 2,4-D (3) + BAP (1) durante 70 d. | ESI, 67.9 em/e después de 140 d. | Arzate-Fernández y Mejía-Franco, 2011. |
| <i>A. arizonica</i> | Base de hojas de bulbilos. | MS + ANA (1) + BAP (10) durante 14 semanas. | OI, hasta 10 brotes cada 12 semanas. | Powers y Backhaus, 1989. |
| <i>A. atrovirens</i> | Hojas de plántulas | MS + 2,4-D (2.4) * | ESI, em/e no publicado | Ayala, 2012. |
| <i>A. cupreata</i> ; <i>A. difformis</i> ; <i>A. obscura</i> ; <i>A. potatorum</i> | Tallos de plántulas | MS + TDZ (0.1-0.4) o BAP (0.5-2) * | OD, hasta 10.5 b/e después de 90 d. | Rosales <i>et al.</i> , 2008. |
| <i>A. fourcroydes</i> | Cortes transversales de tallos de plántulas. | MS + Dicamba (0.5) durante 1 mes | ESD, 92.22 em/e. | Monja-Mio y Robert, 2013. |
| <i>A. fourcroydes</i> | Fragmentos de tallo de 1 cm ³ | MS + BAP (1) + 2,4-D (0.25) durante 7 semanas. | OI, hasta 6 b/e después de 16 semanas. | Robert <i>et al.</i> , 1987. |

| | | | | |
|-----------------------------|---|---|---|---|
| <i>A. inaequidens</i> | Tallo, secciones transversales (3 mm de grosor) | MS + BAP (3) durante 8 semanas. | OD, 72 b/e después de 8 semanas. | Aureoles-Rodríguez <i>et al.</i> , 2008. |
| <i>A. parrasana</i> | Tallos de plántulas | MS + BAP (10) * | OD, hasta 48.6 b/e después de 60 d. | Santacruz-Ruvalcaba <i>et al.</i> , 1999. |
| <i>A. salmiana</i> | Tallo, cortes transversales (2 mm de grosor) | MS + AIA (0.25) + BAP (1, 1.5 y 2) durante 45 d. | OD, hasta 20.5 b/e después de 45 d. | Silos-Espino <i>et al.</i> , 2007. |
| <i>A. sisalana</i> | Tallos y base de hojas | Inducción de callo: MS + 2,4-D (2) + kinetina (1) durante 45 d. Proliferación de brotes: MS + BAP (5) durante 45 d. | OI, 25.3 brotes por gramo de callo después de 90 d. | Hazra <i>et al.</i> , 2002. |
| <i>A. tequilana</i> | Cortes longitudinales y transversales de tallos | MS + 2,4-D (0.25) + BAP (10) durante 30 d. | OI, 14.5 b/e después de 30 d. | Valenzuela-Sánchez <i>et al.</i> , 2006. |
| <i>A. tequilana</i> | Hojas de plántulas | MS + 2,4-D (2) + BAP (0.3) durante 40 d. | ESI, 557 em/e después de 90 d. | Portillo <i>et al.</i> , 2007. |
| <i>A. victoriae-reginae</i> | Tallos de plántulas | MS + 2,4-D (0.5) MS + BAP (1) Ambos durante 10 semanas. | ESI, em/e no publicado. OD, 2.2 b/e después de 12 semanas. | Martínez-Palacios <i>et al.</i> , 2003. |

ESD: embriogénesis somática directa; ESI: embriogénesis somática indirecta; OD: organogénesis directa; OI: organogénesis indirecta; b/e: brotes por explante; em/e: embriones por explante; * tiempo de inducción no publicado.

1.2 Justificación

A. guiengola es una especie que cumple importantes funciones ecológicas, además es endémica de nuestro país y tiene un potencial económico como planta ornamental, sin embargo, la única población existente presenta una distribución muy restringida (4530 ha) que es afectada por la extracción de materiales de construcción lo que la coloca en la categoría de (A) amenazada de la NOM-059-SEMARNAT 2010.

Por lo anterior, el cultivo de tejidos vegetales como estrategia de conservación *ex situ* es una alternativa de conservación, propagación y aprovechamiento para esta especie. El CTV es conveniente ya que los individuos de la especie no siempre presentan la formación de hijuelos, sólo florece una vez en su vida y el establecimiento de plántulas en su hábitat es poco frecuente.

Lo anterior establece la necesidad de realizar estudios enfocados en la evaluación de su germinación *in vitro*, donde se comparen las respuestas morfogénicas de distintos tipos de explante con distintas concentraciones de reguladores de crecimiento vegetal y se evalúe la supervivencia durante la aclimatización. Con esta investigación se facilitará el establecimiento de procedimientos para su micropropagación, nos permitirán contar con un conjunto de plantas de resguardo en caso de que la población del Cerro Guiengola disminuya drásticamente, se pierda totalmente o que se haga un aprovechamiento económico de la especie, y servirá como guía para el estudio de otras especies de agaves que se encuentren amenazadas.

1.3 Objetivos

Objetivo general:

-Establecer condiciones de cultivo *in vitro* que permitan dirigir las respuestas morfogénicas y lograr la micropropagación de *Agave guiengola*.

Objetivos particulares:

-Comparar la germinación de semillas de *A. guiengola* en condiciones *in vitro* y *ex vitro*.

-Observar y comparar la respuesta morfogénica de distintos tipos de explantes: ápice del tallo, base del tallo, parte de la raíz próxima al tallo, parte de la raíz distal al tallo, base del cotiledón, ápice de cotiledón y las hojas verdaderas.

-Determinar el tipo de respuesta morfogénica obtenida con análisis histológicos.

-Evaluar la supervivencia de las plantas regeneradas *in vitro* durante la aclimatización y establecimiento en invernadero.

2. Materiales y métodos

Material vegetal

El material vegetal empleado en esta investigación constó de 130 semillas de *A. guiengola* las cuales fueron colectadas en el Jardín Etnobotánico de Oaxaca, Oaxaca, en el mes de marzo del 2014, las semillas provenían de plantas provenientes del Cerro Guiengola. Las semillas provenían de varios frutos de diferentes plantas silvestres, se almacenaron en bolsas de papel de estraza y se mantuvieron a temperatura ambiente.

Desinfección

Después de un año de su colecta, la desinfección de las semillas se realizó en jabón antibacterial 20% v/v 10 min, etanol 70% v/v 1 min, SoluVet® (Solución electrolizada de superoxidación SES con pH neutro a 0.006% de Cl activo) 4% v/v 10 min y, por último, en solución de cloro comercial (NaClO) 15% v/v y dos gotas (por cada 50ml) de surfactante Tween® 80 20 min. Se realizaron tres enjuagues con agua destilada esterilizada, este último paso, dentro de una campana de flujo laminar.

Germinación

In vitro. Se sembró un lote de 45 semillas en medio MS (Murashige y Skoog, 1962) con los compuestos orgánicos al 50%, sacarosa 3% m/v y gelificado con 3.5 g/L de gellan gum Gelrite®. Se colocaron 2 semillas por frasco (con 25 ml de medio de cultivo). Se incubaron a 25°C con fotoperiodo de 16 h luz / 8 h oscuridad. Posteriormente se sembraron 40 semillas en las mismas condiciones para contar con más material y ser utilizado en el siguiente experimento. En condiciones *in vitro*, en total se sembraron 85 semillas.

Ex vitro. En condiciones de invernadero otro lote de 45 semillas se sembró en sustrato de tepojal y tierra negra en proporción 3:1 (en 2 charolas de plástico de 15x15x10 cm), con riegos de agua destilada cada 8 d. El sustrato se esterilizó previamente en autoclave a 120°C y 1.5 Kg/cm² durante 30 min.

Como criterio de germinación de las semillas se consideró la emergencia de la radícula.

Inducción de morfogénesis

Después de 50 d (cuando todas las plántulas desarrollaron más de una hoja verdadera y medían aproximadamente 2 cm) de la germinación *in vitro*, las plántulas se disectaron para obtener los siguientes explantes: ápice del tallo (AT), base del tallo (BT), parte de la raíz próxima al tallo (PR), parte de la raíz distal al tallo (DR), base del cotiledón (BC), ápice de cotiledón (AC) y hojas verdaderas (HV) (Figura 2.1). Se sembraron 2 explantes por frasco en medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) con sacarosa 3% m/v, 150 mg/L de ácido cítrico, 150 mg/L de ácido ascórbico, 2 g/L de PVP (polivinilpirrolidona) y 3.5 g/L de gellan gum Gelrite®.

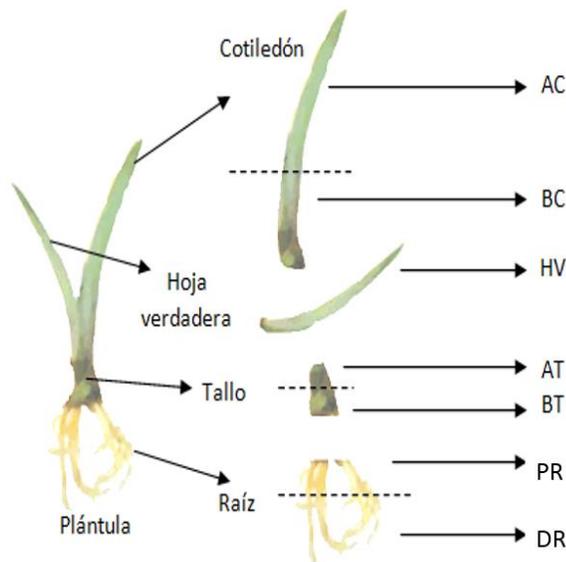


Figura 2.1. Disección de plántula de *A. guiengola* y la obtención de explantes. AC: parte apical de cotiledón, BC: parte basal del cotiledón, AT: ápice del tallo, BT: parte basal del tallo, DR: parte distal de raíces, PR: parte proximal de raíces, HV: hojas verdaderas; línea punteada representa corte transversal del órgano.

Se realizaron cuatro tratamientos distintos con RCV: (T1) 0.5 mg/L de ácido 1-naftalenacético (ANA) / 1.5 mg/L de 6-bencilaminopurina (BAP), (T2) 0.5 mg/L de NAA / 2 mg/L de BAP, (T3) 1.5 mg/L de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) / 0.2

mg/L de BAP y (T4) 3 mg/L de 2,4-D / 0.2 mg/L de BAP. Se utilizó medio de cultivo libre de RCV como control (Tabla 2.1a).

Tabla 2.1 Tratamientos con reguladores de crecimiento vegetal.

a. Concentraciones de reguladores de crecimiento vegetal en cada tratamiento.

| | ANA (mg/L) | 2,4-D (mg/L) | BAP (mg/L) |
|---------------------------|------------|--------------|------------|
| Tratamiento 1 (T1) | 0.5 | - | 1.5 |
| Tratamiento 2 (T2) | 0.5 | - | 2 |
| Tratamiento 3 (T3) | - | 1.5 | 0.2 |
| Tratamiento 4 (T4) | - | 3 | 0.2 |

b. Número de repeticiones y de ensayos por tipo de explante en cada tratamiento.

| | Control | T1 | T2 | T3 | T4 |
|-----------|---------|---------|---------|-----------|-----------|
| AC | 9 | 9 | 9 | 9 - 9 - 7 | 9 - 9 - 7 |
| BC | 9 | 9 | 9 | 9 - 9 - 7 | 9 - 9 - 7 |
| HV | 20 | 20 - 20 | 20 - 20 | 20 - 20 | 20 - 20 |
| AT | 9 | 9 - 9 | 9 - 9 | 9 | 9 |
| BT | 9 | 9 - 9 | 9 - 9 | 9 | 9 |
| PR | 9 | 9 - 9 | 9 - 9 | 9 | 9 |
| DR | 9 | 9 - 9 | 9 - 9 | 9 | 9 |

Cada explante se consideró como una repetición. Con los explantes DR, PR, BT, AT, AC y BC se realizó un primer ensayo con 9 repeticiones por tratamiento; para DR, PR, BT y AT un segundo ensayo de 9 repeticiones solamente para los tratamientos 1 y 2, mientras que para AC y BC fueron 9 repeticiones para los tratamientos 3 y 4. Con los explantes AC y BC se llevó a cabo un tercer ensayo con 7 repeticiones en el tratamiento 3 y 4, pero en este último, después de un mes, los callos fueron subcultivados a medio MS con 0.5 mg/L de 2,4-D y 0.2 mg/L de BAP durante 1 mes con el objetivo de permitir el completo desarrollo de embriones somáticos. Para el explante HV se realizó un primer ensayo con 20 repeticiones por tratamiento, y un segundo ensayo de 20 repeticiones por tratamiento exceptuando el tratamiento control. El número total de repeticiones por tratamiento se muestra en la Tabla 2.1b.

Los cultivos se incubaron a 25°C. Los tratamientos 1 y 2 así como el grupo control se incubaron en fotoperiodos con 16 h de luz, mientras que los tratamientos 3 y 4

se incubaron en oscuridad total. Todos los medios de cultivo fueron ajustados a un pH de 5.7 y esterilizados en autoclave a 120°C y 1.5 Kg/cm² durante 17 min.

Todos los explantes se mantuvieron en los medios de cultivo con RCV durante un periodo de 60 d.

Para evaluar la oxidación se contabilizaron los explantes que presentaron oscurecimiento total. El conteo se realizó 70 d después de que los explantes se sembraron. El promedio se hizo por explante.

Después de 60 d los explantes/callos/regenerantes se subcultivaron a medio MS libre de RCV con sacarosa al 3% (m/v), 150 mg/L de ácido cítrico, 150 mg/L de ácido ascórbico y 8.5 g/L de agar bacteriológico. Los callos obtenidos se cortaron en fragmentos de aproximadamente 0.5 cm³ para permitir el crecimiento de los regenerantes y facilitar el conteo de estos.

Al término de 12 meses de iniciados los cultivos se realizó un conteo total de regenerantes para obtener el número total y el promedio por número de explantes. Por último, se tomó una muestra de 100 plantas del total obtenido en los tratamientos con BT (tratamientos donde se obtuvo la mayor cantidad de plantas), y se calculó el porcentaje de enraizamiento (porcentaje de plantas con raíces).

Análisis histológico

Este método se aplicó únicamente a aquellos tratamientos donde se regeneraron brotes. Se tomó una muestra de callo de aproximadamente 0.5 cm³ de los siguientes tratamientos: BT, AT, y HV en ANA/BAP (T1 y T2), con 60 d después de iniciados los cultivos (tiempo en el que comenzó la aparición y desarrollo de regenerantes). Las muestras se colocaron en fijador Navashin mezcla 1:1 de la solución A:B (Anexo 2) durante 24 h, posteriormente se enjuagaron con abundante agua. Las muestras se sometieron a una deshidratación gradual con una mezcla de alcohol terbutílico-etanol-agua (TBA) (Anexo 3). Después del tercer cambio a TBA puro, las muestras se colocaron en una estufa a temperatura de 58-60°C y se agregaron escamas de paraplást cada 30 min hasta haber alcanzado el doble del volumen inicial. Posteriormente se dejó evaporar el TBA (durante 24 h) y se retiró el paraplást y se

reemplazó con paraplast previamente fundido. Se mantuvieron en paraplast durante 24 h y se elaboraron bloques de aproximadamente 1 cm³. Se realizaron cortes de 7 µm de grosor con micrótomo de rotación. Los cortes se colocaron en un baño de flotación a 30°C, posteriormente se montaron en portaobjetos y se dejaron secar durante 24 h (Sandoval *et al.*, 2005; Fernández-Tellez, 2014).

Para la desparafinación, los portaobjetos se introdujeron en una estufa a 60°C durante 40 min. Enseguida, se colocaron en xilol puro durante 20 min, después en una solución xilol-alcohol absoluto (1:1) durante 15 min y posteriormente los cortes se rehidrataron en una serie de alcoholes (etanol): 100%, 95%, 70%, 50% y 30% v/v durante 15 min en cada cambio (Sandoval *et al.*, 2005).

Después del alcohol al 30% v/v, los portaobjetos se colocaron en safranina durante 24 h. Se sumergieron en agua destilada durante 3 min y se procedió a deshidratar los cortes con alcoholes graduales de 30, 50, 70, 95 y 100% v/v durante 5 min en cada uno. Se colocaron en colorante verde rápido por 25 min, enseguida se colocaron en aceite de clavo y finalmente en citrosol durante 10 min en cada uno. Las preparaciones se montaron utilizando resina sintética y se dejaron secar durante 20 d (Sandoval *et al.*, 2005; Fernández-Tellez, 2014). Posteriormente las preparaciones se revisaron e interpretaron en microscopio óptico, y se tomaron fotografías.

Aclimatización

Luego de 14 meses de iniciados los cultivos de los explantes, se tomaron 158 plantas de 0.5-2 cm de largo, con 2-5 hojas y con raíces de 1-10 cm (Figura 2.2). Las plantas se sacaron de los frascos y se lavaron las raíces y hojas con agua de la llave para eliminar el medio de cultivo sobre ellas, se dejaron secar durante 15 minutos en papel periódico y se sembraron en sustrato de tepojal y tierra negra en proporción 3:1 (esterilizado previamente) en macetas de 7 cm de diámetro (2 plantas por maceta). Las macetas se mantuvieron dentro de bolsas de plástico transparentes cerradas y a temperatura ambiente expuestas a la luz natural durante 1 semana, posteriormente se retiraron las bolsas y se colocaron en condiciones de

invernadero. Se realizaron riegos con agua destilada cada 3 d durante 2 semanas, posteriormente se realizó un riego por semana.



Figura 2.2 Brotes ya enraizados y listos para transferencia a sustrato.

Análisis estadístico

En el caso del promedio de brotes por explante se realizó un análisis de varianza ANOVA de una vía para indicar diferencias significativas entre tratamientos y posteriormente se efectuó una prueba de Tuckey para señalar que tratamientos eran significativamente diferentes. En ambas pruebas se consideró un intervalo de confianza del 95%. Las pruebas estadísticas se realizaron en el programa STATISTICA 8.0 de StatSoft.

3. Resultados

Desinfección

Las semillas medían 4-4.5 mm de largo y 3-3.5 mm de ancho, con un peso promedio de 0.10803 g (Figura 3.2a).

El procedimiento de desinfección fue efectivo ya que el 100% de las semillas se establecieron asépticamente en condiciones *in vitro* y en condiciones *ex vitro*.

Germinación

El porcentaje de germinación en condiciones *in vitro* fue mayor que en condiciones *ex vitro*. Las semillas sembradas en condiciones *in vitro* tuvieron el 88.9% de germinación, correspondiente a 40 semillas germinadas de 45 totales sembradas. Para el caso de las semillas sembradas en condiciones *ex vitro*, 32 semillas germinaron de las 45 sembradas, correspondiente a un 71.1%. Los valores fueron tomados después de 12 d de la siembra (Tabla 3.1).

Tabla 3.1. Porcentaje de germinación *in vitro* y *ex vitro*, después de 12 d de la siembra.

| | <i>In vitro</i> | <i>Ex vitro</i> |
|-----------|-----------------|-----------------|
| SS | 45 | 45 |
| SG | 40 | 32 |
| SG / SS % | 88.89 | 71.10 |

SS: semillas sembradas, SG: semillas germinadas, SG / SS: promedio de semillas germinadas respecto a las semillas sembradas.

La germinación de las semillas *in vitro* ocurrió de manera asincrónica, 22 semillas lo hicieron en los primeros 3 d después de la siembra, al sexto día se tenía un total de 35 semillas germinadas, a los 9 d, 39 semillas germinadas y al día doce, 40 semillas germinadas (Tabla 3.2, Figura 3.1a-b). Al término de 30 d no hubo más eventos de germinación.

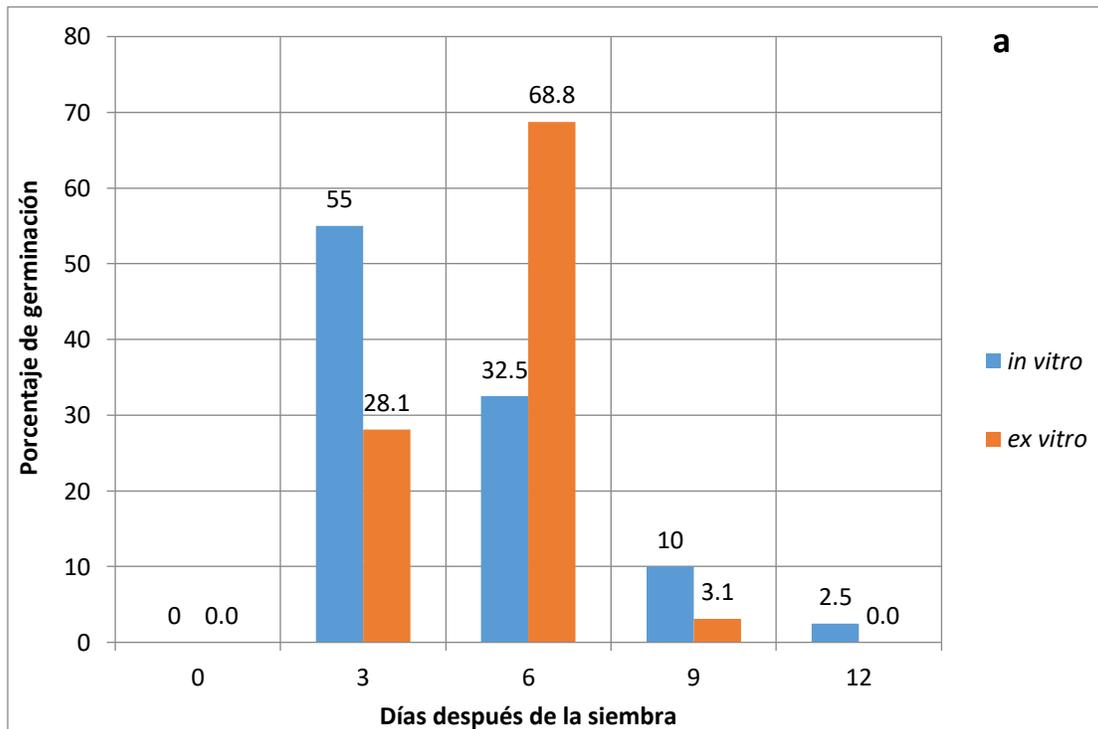
La germinación de las semillas en condiciones *ex vitro* también ocurrió de manera asincrónica, en los primeros 3 d después de la siembra únicamente germinaron 9 semillas, en el sexto día germinaron 22 semillas para un total de 31 semillas, al

noveno día se tuvo un total de 32 semillas germinadas (Tabla 3.2, Figura 3.1a-b). Después de 30 d no hubo más eventos de germinación.

Tabla 3.2. Número de semillas germinadas cuantificado en intervalos de 3 días.

| <i>In vitro</i> | Días después de la siembra | | | |
|-----------------------------------|----------------------------|-------|-------|-------|
| | 3 | 6 | 9 | 12 |
| SGT | 22 | 13 | 4 | 1 |
| TSGT | 22 | 35 | 39 | 40 |
| % semillas germinadas | 48.89 | 28.89 | 8.89 | 2.22 |
| % semillas germinadas (sumatoria) | 48.89 | 77.78 | 86.67 | 88.89 |
| <i>Ex vitro</i> | Días después de la siembra | | | |
| | 3 | 6 | 9 | 12 |
| SGT | 9 | 22 | 1 | 0 |
| TSGT | 9 | 31 | 32 | 32 |
| % semillas germinadas | 20 | 48.89 | 3.125 | 0 |
| % semillas germinadas (sumatoria) | 20 | 68.89 | 71.1 | 71.1 |

SGT: semillas germinadas durante el intervalo de 3 días, TSGT: total de las semillas germinadas hasta el intervalo de tiempo correspondiente.



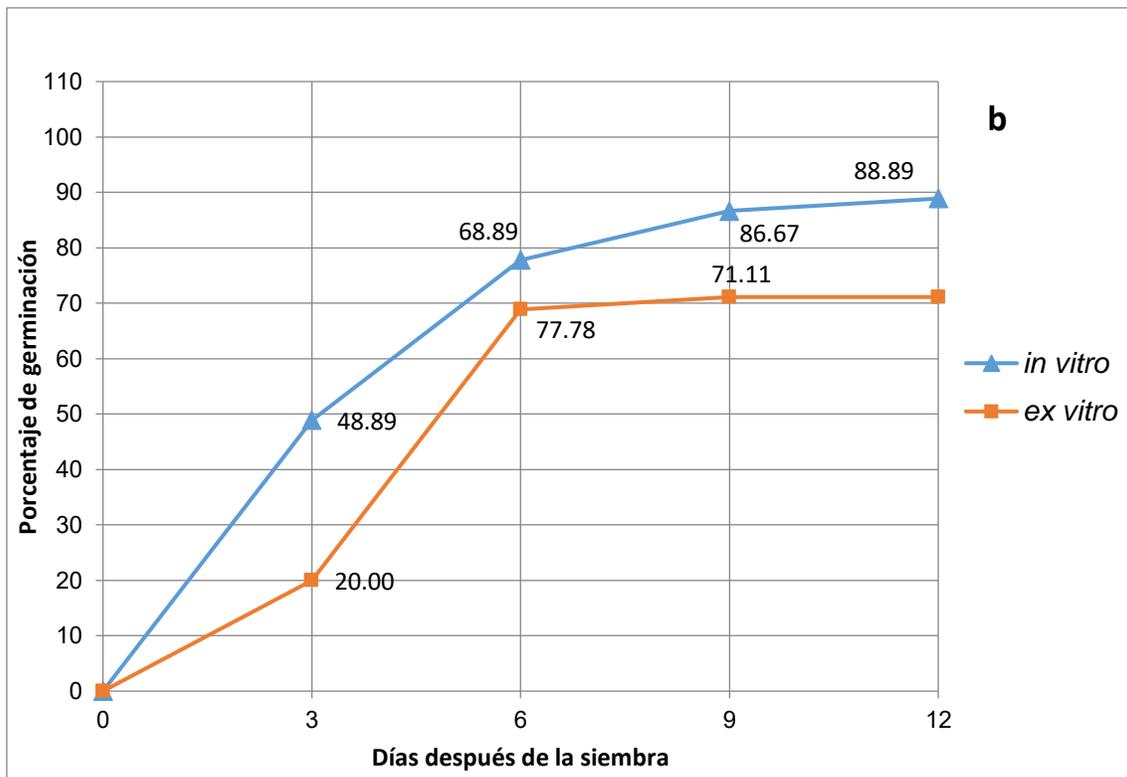


Figura 3.1. Porcentaje de germinación. (a) Comparación del porcentaje de semillas germinadas en condiciones *in vitro* y *ex vitro*. (b) Comparación de la sumatoria del porcentaje de semillas germinadas en condiciones *in vitro* y *ex vitro*.

Una vez que las semillas germinaron, durante los primeros 3 d posteriores a la germinación se observó la elongación del cotiledón; en el día 9 el cotiledón llegó a su tamaño máximo y se levantó del medio de cultivo colocándose en posición vertical; la plántula presentó su primera hoja verdadera a partir de 30 d; la hoja verdadera continuó su crecimiento y hasta el día 50 después de la siembra se presentó la segunda hoja verdadera (etapa del desarrollo en la cual se aplicó el proceso de inducción de organogénesis y embriogénesis) (Figura 3.2b-f). En este tiempo, el cotiledón y las primeras hojas verdaderas medían entre 1.5 y 2 cm de largo y 4 mm de ancho, el tallo no era mayor a 5 mm de ancho y largo, y el tamaño de las raíces era muy variable, entre 2 y 8 cm de largo tanto en condiciones *in vitro* como en condiciones *ex vitro*.

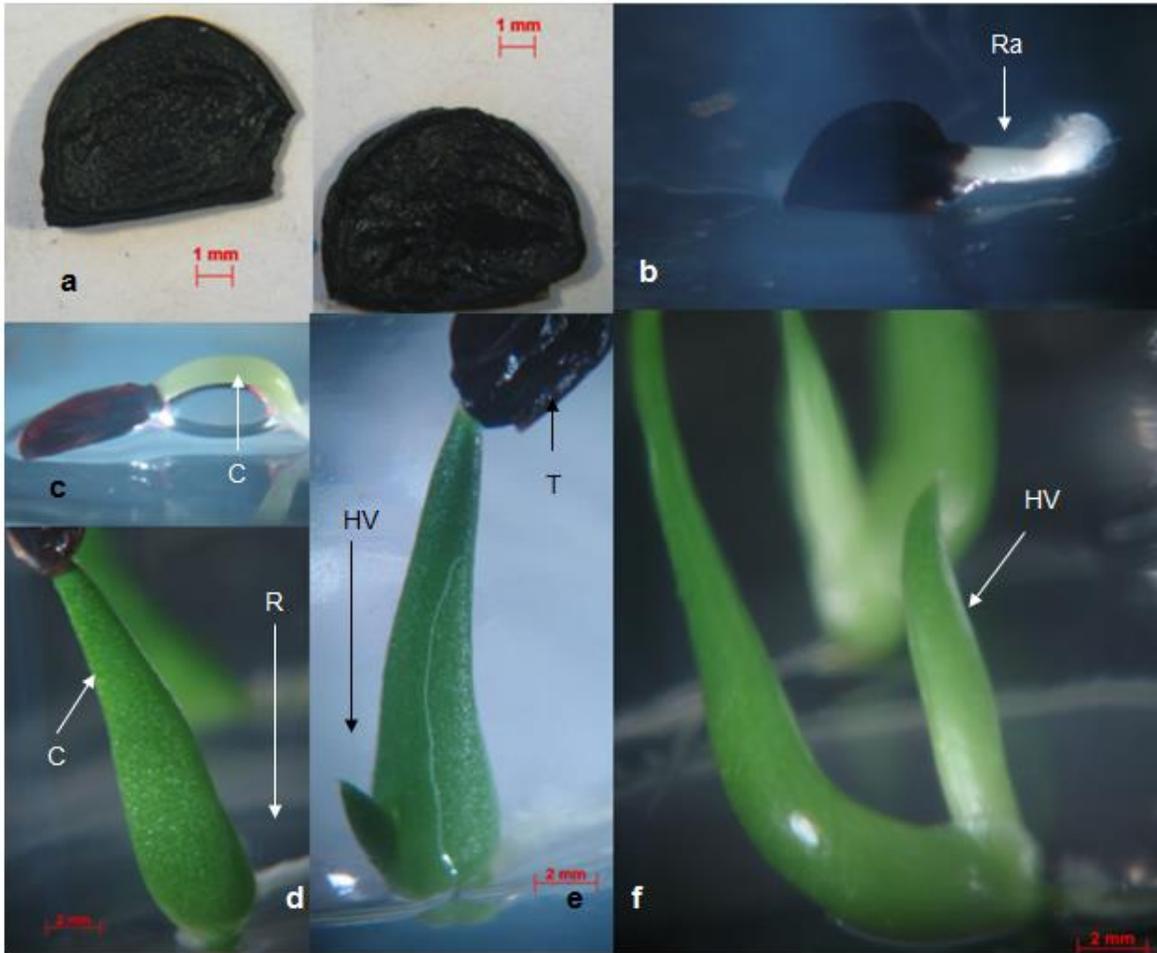


Figura 3.2. Semillas de *A. guiengola* y etapas de germinación y desarrollo de la plántula hasta la aparición de la primera hoja verdadera. (a) Semillas de *A. guiengola*. (b-f) germinación y desarrollo de plántula; (b) salida de la radícula (c) elongación del cotiledón a los 3 días después de la germinación, (d) cotiledón en posición vertical a los 9 días, (e) aparición de la primera hoja verdadera a los 30 días, (f) elongación de la primera hoja verdadera a los 40 días. C: cotiledón, Ra: radícula, HV: hoja verdadera, T: testa.

Oxidación

Después de 70 d, en todos los tipos de explantes se obtuvieron porcentajes bajos de oxidación. El tipo de explante con menor porcentaje (1.06 %) de oxidación fue la hoja verdadera (HV), mientras que el tipo de explante con mayor porcentaje (25.49 %) de oxidación fue la parte de la raíz próxima al tallo (PR) (Figura 3.3).

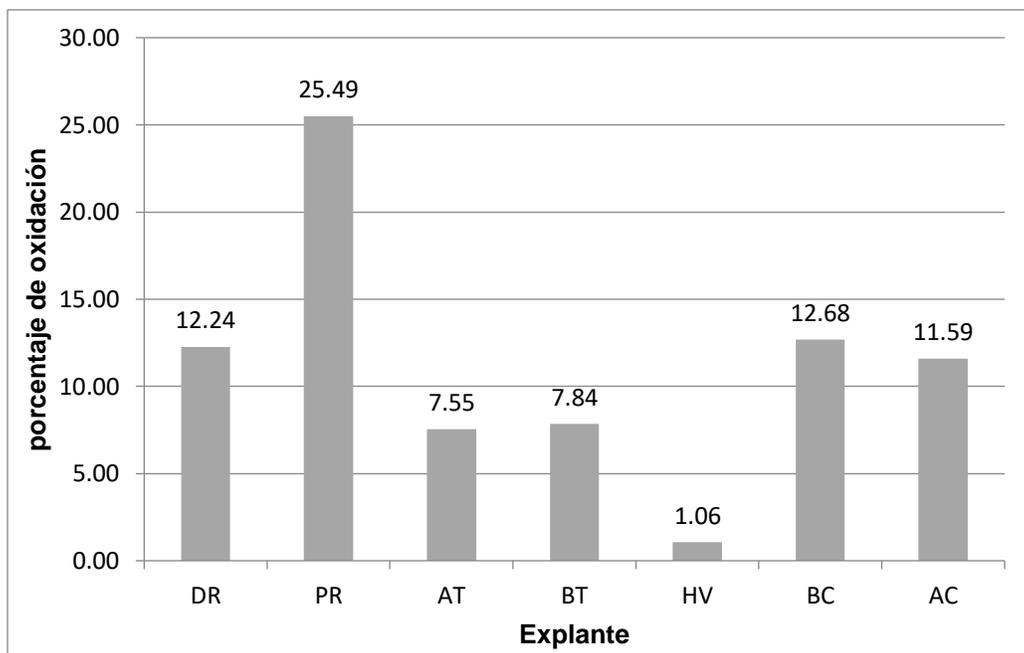


Figura 3.3. Porcentaje de oxidación por tipo de explante, 70 días después de su siembra. AC: parte apical de cotiledón, BC: parte basal del cotiledón, AT: ápice del tallo, BT: parte basal del tallo, DR: parte distal de raíces, PR: parte proximal de raíces, HV: hojas verdaderas. Barras con distinta letra indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Morfogénesis y callogénesis

Después de 60 d de que los explantes se encontraban en presencia de RCV se obtuvieron los porcentajes de explantes que presentaron algún tipo de respuesta. El porcentaje más alto (100 %) se dio en la base del tallo (BT) en el Tratamiento 2 (ANA/BAP 0.5/1.5 mg/L), mientras que el menor porcentaje (11.11 %) lo presentó la parte de la raíz próxima al tallo (PR) en el Tratamiento 3 (2,4-D/BAP 1.5/0.2 mg/L). En general, los tratamientos con ANA (T 1 Y T 2) presentaron mayores porcentajes de explantes con respuesta teniendo entre el 23 y 100 %, mientras que los tratamientos con 2,4-D (T3 y T4) presentaron porcentajes de 11 a 66 %. El ápice del tallo (AT) fue el tipo de explante con los porcentajes de respuesta más altos en todos los tratamientos mientras que el tipo de explante PR fue el que presentó los porcentajes más bajos (Tabla 3.3).

Tabla 3.3 Total de explantes sembrados y porcentaje de explantes con respuesta, por tipo de explante y por tratamiento con reguladores de crecimiento vegetal. Resultados obtenidos después de 60 días de que fueron sembrados.

| | Tratamiento (mg/L) | DR | | PR | | BT | | AT | |
|---|---------------------|-------------------|---------------------------------------|-------------------|---------------------------------------|-------------------|---------------------------------------|-------------------|---------------------------------------|
| | | Explantes totales | % explantes con respuesta morfogénica | Explantes totales | % explantes con respuesta morfogénica | Explantes totales | % explantes con respuesta morfogénica | Explantes totales | % explantes con respuesta morfogénica |
| 0 | 0 / 0 | 9 | 0 | 9 | 0 | 9 | 0 | 9 | 0 |
| 1 | ANA/BAP (0.5/1.5) | 17 | 52.94 | 17 | 23.52 | 17 | 100.00 | 17 | 82.35 |
| 2 | ANA/BAP (0.5/2) | 17 | 52.94 | 17 | 52.94 | 17 | 76.47 | 17 | 88.24 |
| 3 | 2,4-D/BAP (1.5/0.2) | 9 | 33.33 | 8 | 11.11 | 9 | 66.67 | 9 | 66.67 |
| 4 | 2,4-D/BAP (3/0.2) | 9 | 44.44 | 8 | 33.33 | 9 | 33.33 | 9 | 40.00 |

| | Tratamiento (mg/L) | HV | | BC | | AC | |
|---|---------------------|-------------------|---------------------------------------|-------------------|---------------------------------------|-------------------|---------------------------------------|
| | | Explantes totales | % explantes con respuesta morfogénica | Explantes totales | % explantes con respuesta morfogénica | Explantes totales | % explantes con respuesta morfogénica |
| 0 | 0 / 0 | 20 | 5.00 | 9 | 0 | 9 | 0 |
| 1 | ANA/BAP (0.5/1.5) | 46 | 90.91 | 9 | 62.50 | 9 | 25.00 |
| 2 | ANA/BAP (0.5/2) | 45 | 90.91 | 9 | 90.00 | 9 | 37.50 |
| 3 | 2,4-D/BAP (1.5/0.2) | 40 | 53.33 | 24 | 54.16 | 24 | 33.33 |
| 4 | 2,4-D/BAP (3/0.2) | 46 | 34.62 | 25 | 28.00 | 25 | 32.00 |

En el caso del tratamiento control, los explantes de raíz se mantuvieron entre 20 y 30 d sin cambio alguno y en algunos casos se presentó oxidación; en los explantes de tallo era frecuente observar que continuaba la formación y elongación de hojas verdaderas o simplemente la oxidación del explante; en los explantes de hoja verdadera y cotiledón ocurrió algo similar a los explantes de raíz donde se mantuvieron durante un largo periodo de tiempo (1 mes) sin cambio alguno hasta que comenzaron a oxidarse, únicamente en un explante de hoja verdadera (HV) se dio la formación de un brote adventicio por vía directa (Figura 3.4a).

Tabla 3.4. Tipo de respuesta de cada explante en cada tratamiento. 1, Callo friable color verde; 2, Callo friable color café; 3, Callo friable color blanco; 4, Callo compacto color lechoso; 5, Raíces por vía directa; 6, Raíces por vía indirecta; 7, Brotes por vía indirecta; 8, Brotes por vía directa.

| | Tratamiento (mg/L) | DR | PR | BT | AT | HV | BC | AC |
|---|---------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | | Respuesta |
| 0 | 0 / 0 | - | - | - | - | 8 | - | - |
| 1 | ANA/BAP (0.5/1.5) | 2 | 1,5,6, | 1,3,7 | 1,7 | 1,5,6,8 | 1,5 | 1 |
| 2 | ANA/BAP (0.5/2) | 2 | 2 | 1,7,8 | 1,7 | 1,7,8 | 1 | 1 |
| 3 | 2,4-D/BAP (1.5/0.2) | 4,5 | 5 | 4 | 4 | 4 | 4 | 5 |
| 4 | 2,4-D/BAP (3/0.2) | 4 | 2 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |

En cuanto al tipo de respuesta morfogénica y callogénica (Tabla 3.4) se obtuvo lo siguiente:

En los explantes DR en T1 y T2 se formó callo de aspecto friable de color café, color parecido a los explantes de raíz que presentaron oxidación (Figura 3.4e; Figura 3.6g). En T3 y T4 los explantes respondieron formando callo de aspecto compacto y color blanquecino, únicamente en el T3 se observó la formación de raíces adventicias provenientes directamente del explante (Figura 3.7c).

En los explantes PR en T2 se obtuvo la misma respuesta que en los explantes DR. En T1 los explantes formaron más raíces tanto por vía directa como indirecta (fase previa de callo friable de color verde) (Figura 3.4f). En T3 se formaron raíces adventicias por vía directa y en T4 se formaron callo compacto de color blanquecino.

El AT respondió a los tratamientos T1 y T2 con la formación de brotes adventicios por vía indirecta desde callo color verde y de consistencia friable (Figura 3.5a-b; Figura 3.6a); cuando los callos fueron subcultivados a medio sin RCV la regeneración de brotes adventicios aumentó considerablemente y la proliferación del callo se detuvo. En T3 y T4 se formó callo compacto color blanquecino (Figura 3.7a; Figura 3.8a y f)

Para el caso de los explantes BT, en T1 los explantes formaron callo de consistencia friable color blanco (en un mes en presencia de RCV), posteriormente (a los 45 d) el callo se volvió color verde y a partir de éste comenzaron a formarse brotes adventicios (Figura 3.5c-e). En T2 se dió el desarrollo de brotes adventicios a partir directamente del explante o se formó previamente callo color verde y apariencia friable y posteriormente el desarrollo de los brotes adventicios (Figura 3.6b), eventos muy similares a los ocurridos en AT. En T3 y T4 se obtuvo la misma respuesta que los explantes AT.

La respuesta obtenida en los tipos de explante BC (en T3 y T4) y AC (en T4) fue la formación de callo de aspecto compacto sobre el cual se formaron estructuras globulares (Figura 3.7d-e; Figura 3.8e); en todos los casos el callo continuó proliferando hasta cubrir completamente a las estructuras globulares aun cuando

estas estructuras fueron subcultivadas a medio con 0.5 mg/L de 2,4-D y 0.2 mg/L de BAP. Explantes AC en T3 presentaron la formación de raíces. BC y AC en T1 y T2 únicamente desarrollaron callo color verde con aspecto friable (Figura 3.5f; Figura 3.6e-f).

Los explantes de HV en T1 presentaron diversas respuestas: en la mayoría de los explantes se presentó la formación de callo friable color blanco o verde, a partir de los cuales en algunas regiones se presentó el desarrollo de raíces adventicias (Figura 3.4b) mientras que el resto del callo seguía proliferando. En otros explantes se desarrollaron únicamente raíces adventicias o brotes adventicios (Figura 3.4c-d) que surgían a partir de la zona donde se realizó el corte de los explantes, respuesta que se presentó sin una fase previa de callo.

En el T2 se presentaron respuestas similares a T1: raíces adventicias por vía directa e indirecta y desarrollo de callos no regenerativos (Figura 3.6c). En pocos explantes se obtuvieron brotes adventicios tanto por vía directa como por vía indirecta (Figura 3.6d). Por la vía directa, el proceso fue similar a lo ocurrido en el T1. En el caso de la vía indirecta, la zona del explante cercana al sitio donde se realizó el corte aumentó de volumen, posteriormente el tejido epidérmico se rompió y comenzó a desarrollarse el callo el cual era de consistencia friable y de color verde. Una vez que los callos fueron subcultivados a medios de cultivo sin RCV comenzaron a desarrollarse los brotes adventicios.

En tratamiento T3 y T4 la respuesta fue callo compacto color blanco donde, en pocos casos, se desarrollaron raíces adventicias (Figura 3.8b).

Todas las respuestas se presentaron entre 30-60 d desde la siembra de los explantes en medio de cultivo con RCV.

Análisis histológico

Después de 60 d de iniciados los cultivos, las muestras de callo provenientes de BT, AT y HV en el Tratamiento 1 y Tratamiento 2 (Figura 3.5 a y d; Figura 3.6 d) presentaron la formación de meristemas apicales (Figura 3.9a-d). En las regiones meristemáticas se observaron células pequeñas (en comparación con el resto de

las células del callo) e isodiamétricas, poseen un núcleo relativamente grande y no poseen vacuolas. Las regiones meristemáticas presentaron una capa externa de células cuyas divisiones celulares son anticlinales, es decir, de forma perpendicular a la superficie del meristemo, por lo que corresponde a la peridermis. En la Figura 3.9a se observó que en un meristemo también hay células alargadas y estrechas, y en la Figura 3.9e con la imagen polarizada se observaron en estas células la formación de anillos de lignina, por lo que se trata de tejido vascular muy joven, tejido que corresponde al procambium. Con esta evidencia se determinó que la respuesta morfogénica obtenida es organogénica (indirecta) y los regenerantes obtenidos son brotes adventicios.

En la Figura 3.9c podemos observar que el callo obtenido presenta distintos tipos celulares. En el centro del callo se tienen células desordenadas con pared celular primaria muy delgada, abundante citoplasma y núcleo relativamente pequeño, y es en esta región donde se desarrollan los meristemas de los brotes adventicios; en la periferia del callo se tienen células mucho más grandes que dejan grandes espacios intercelulares, posiblemente favoreciendo un mejor intercambio gaseoso en todas las células del callo, siendo su apariencia muy similar a un aerénquima. Estas son características de callos regenerativos por vía organogénica en *A. guineola*.

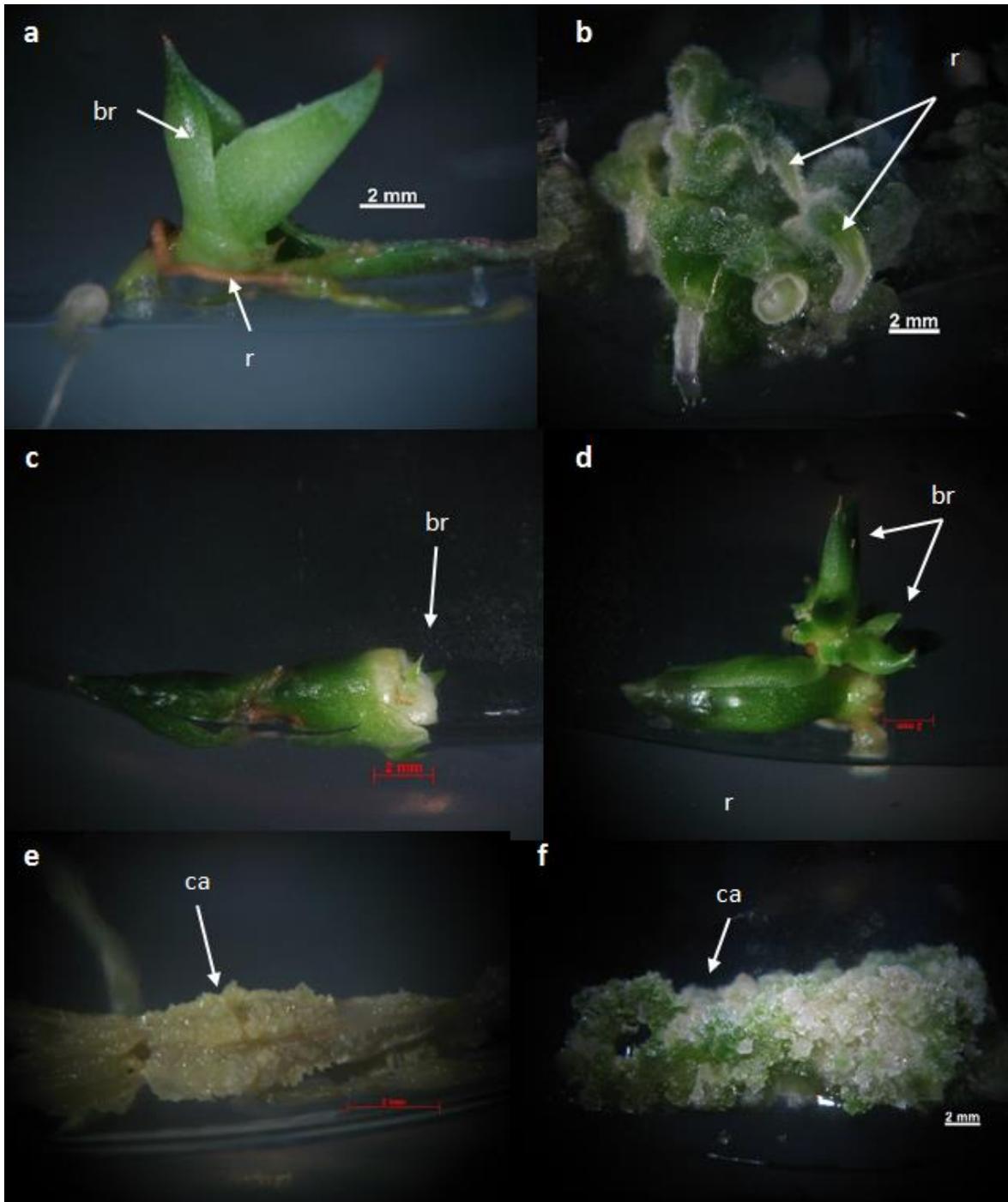


Figura 3.4. Respuestas obtenidas en el Tratamiento control y Tratamiento 1 (ANA/BAP-0.5/1.5 mg/L). (a) Organogénesis directa a partir de la base de una hoja verdadera (HV) en tratamiento control (T0) después de 6 meses de su siembra. (b) Rizogénesis directa a partir del tejido de hoja (HV) después de 60 días. (c-d) Organogénesis en la base de la hoja después de 30 días (c) y 60 días (d). (e) Formación de callo color café a partir de la parte de la raíz distal al tallo después de 1 mes en tratamiento. (f) Formación de callo friable a partir de la parte de la raíz próxima al tallo (PR). br: brote, ca: callo, r: raíz.

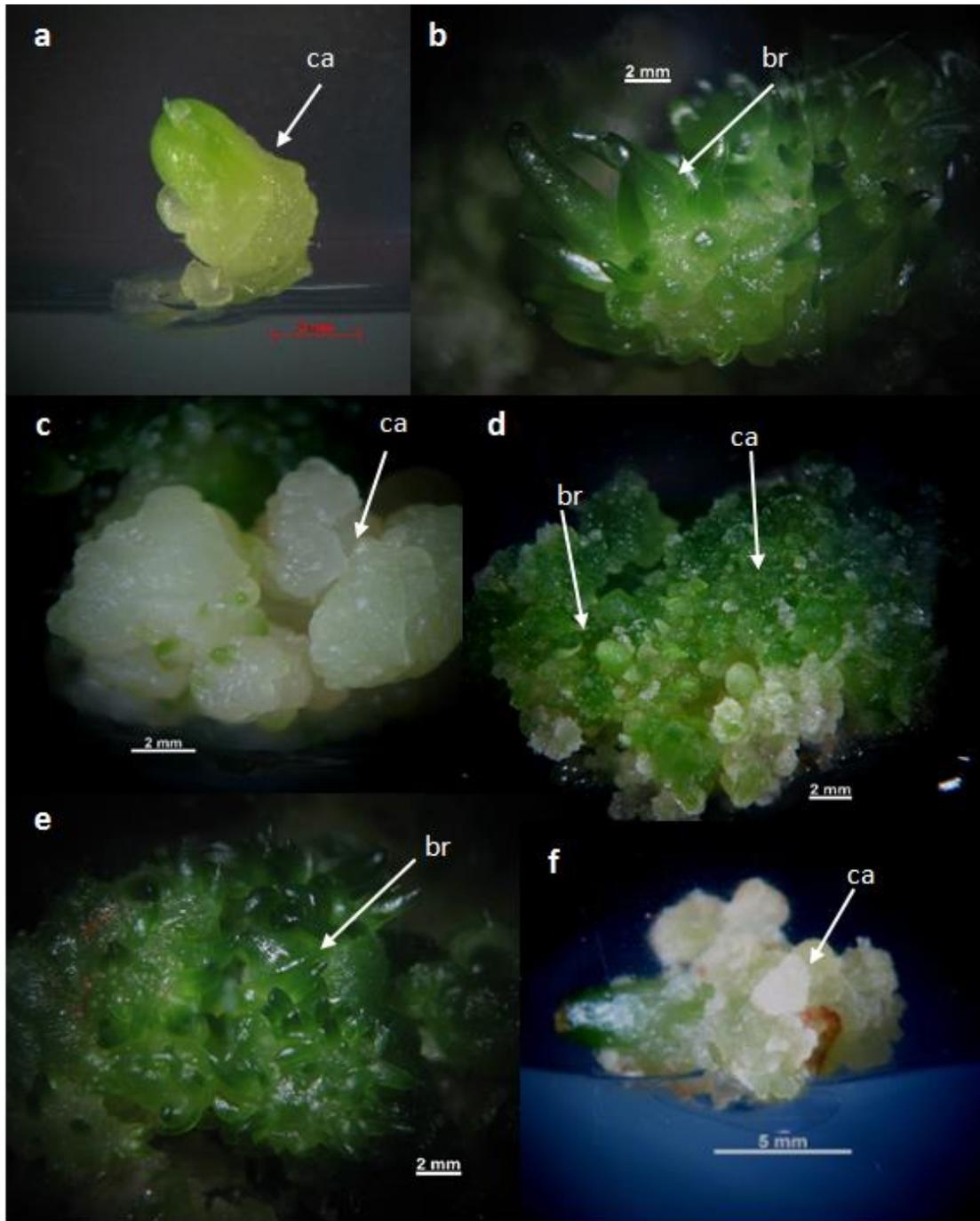


Figura 3.5. Respuestas obtenidas en el Tratamiento 1 (ANA/BAP-0.5/1.5 mg/L). (a-b) Organogénesis indirecta a partir del ápice del tallo (AT); (a) ensanchamiento del explante y formación de callo friable color verde después de un mes de inducción; (b) formación de brotes adventicios a partir de callo después de 4 meses. (c-e) Organogénesis indirecta a partir de la base del tallo (BT); (c) después de 30 días en tratamiento el explante formó callo de consistencia friable color blanco que, después de otros 60 días (d), se comenzaron a formar estructuras similares a esferas de color verde que, pasados 60 días (e) crecieron y formaron estructuras parecidas a hojas. (f) Ápice del cotiledón formando callo friable color verde-blancuzco después de 60 días desde su siembra. br: brote, ca: callo.

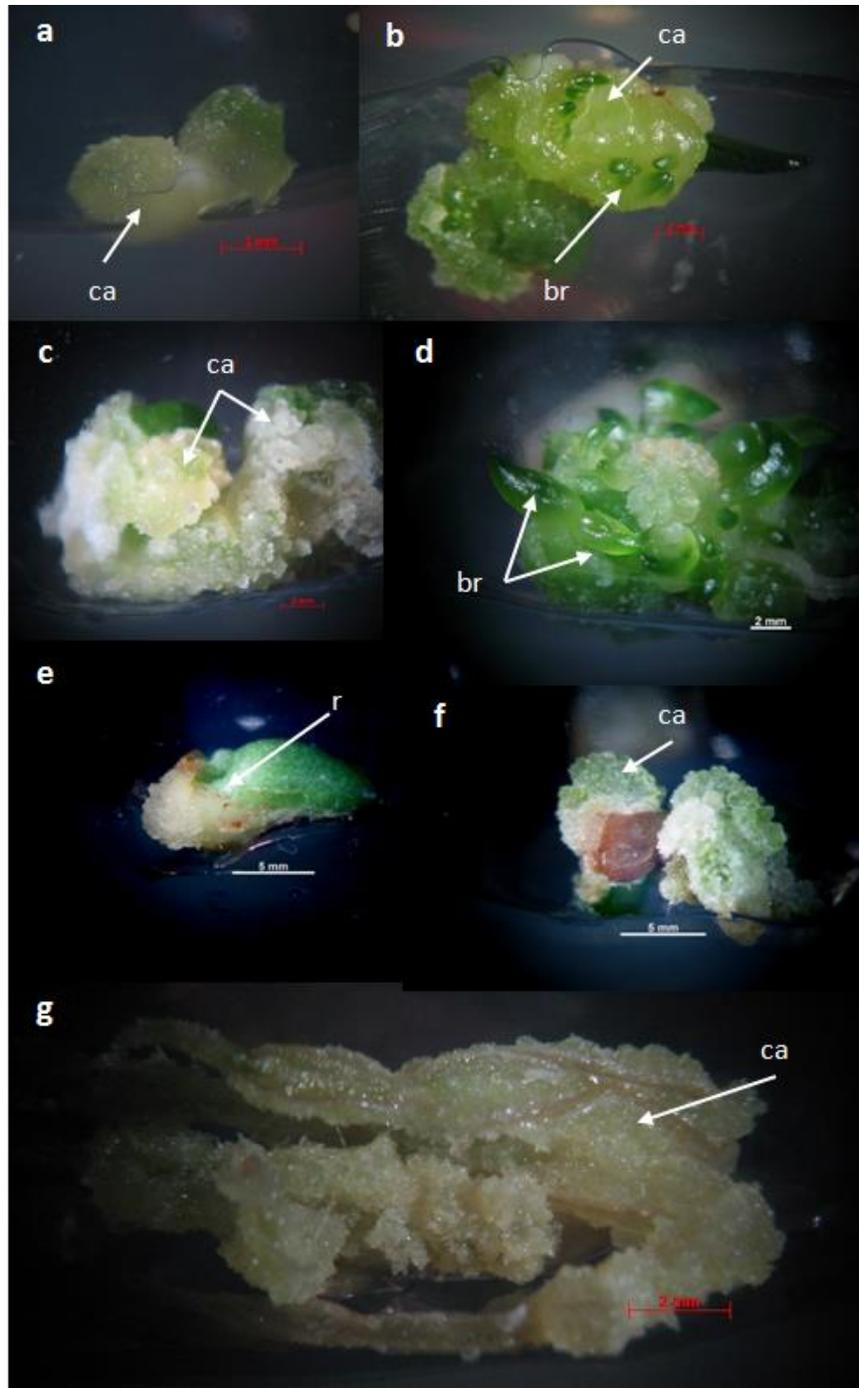


Figura 3.6. Respuestas obtenidas en el Tratamiento 2 (ANA/BAP-0.5/2 mg/L). (a) Formación de callo friable color verde en AT después de un mes de su siembra. (b) ensanchamiento y formación de callo color verde a partir de explante BT donde se observa el surgimiento de estructuras similares a brotes adventicios a partir del callo, 60 días después de que el explante fue sembrado. (c) Formación de callo friable a partir de HV. (d) Organogénesis indirecta a partir de HV, después de 90 días desde su siembra. (e-f) Formación de callo a partir de AC y BC respectivamente al transcurrir dos meses desde que fueron sembrados. (g) Formación de callo color café en explante DR después de 1 mes. br: brote, ca: callo, r: raíz.

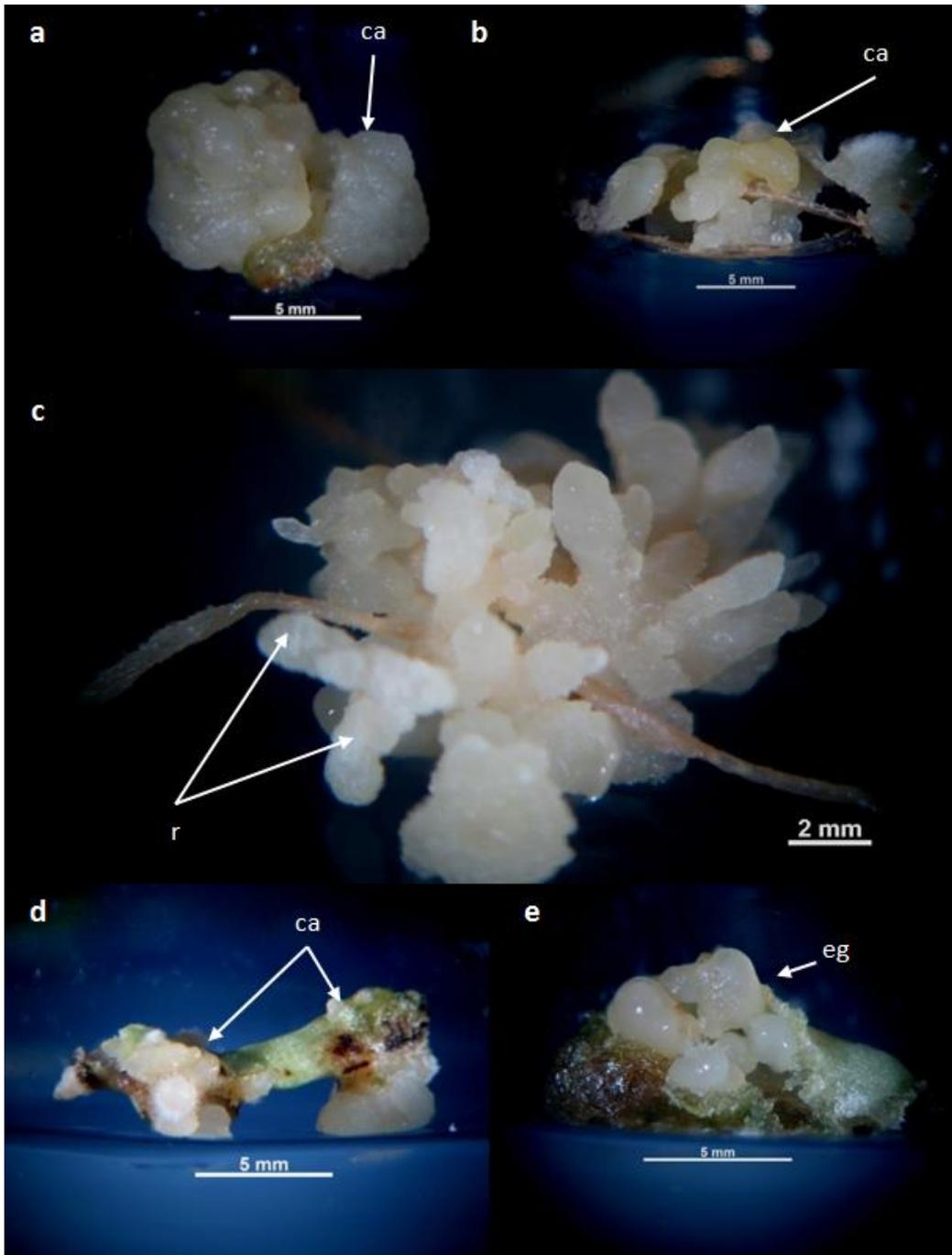


Figura 3.7. Respuestas obtenidas en el Tratamiento 3 (2,4-D/BAP-1.5/0.2 mg/L). (a-b) Formación de callo compacto color café-blanquizo que se formó después de un mes en presencia del tratamiento en explante BT y AT. (c) Explante de raíz (DR y PR) con rizogénesis directa. (d-e) Formación de callo compacto y estructuras globulares en AC y BC respectivamente (fotografías tomadas 30 días posteriores a su siembra). ca: callo, eg: estructura globular.

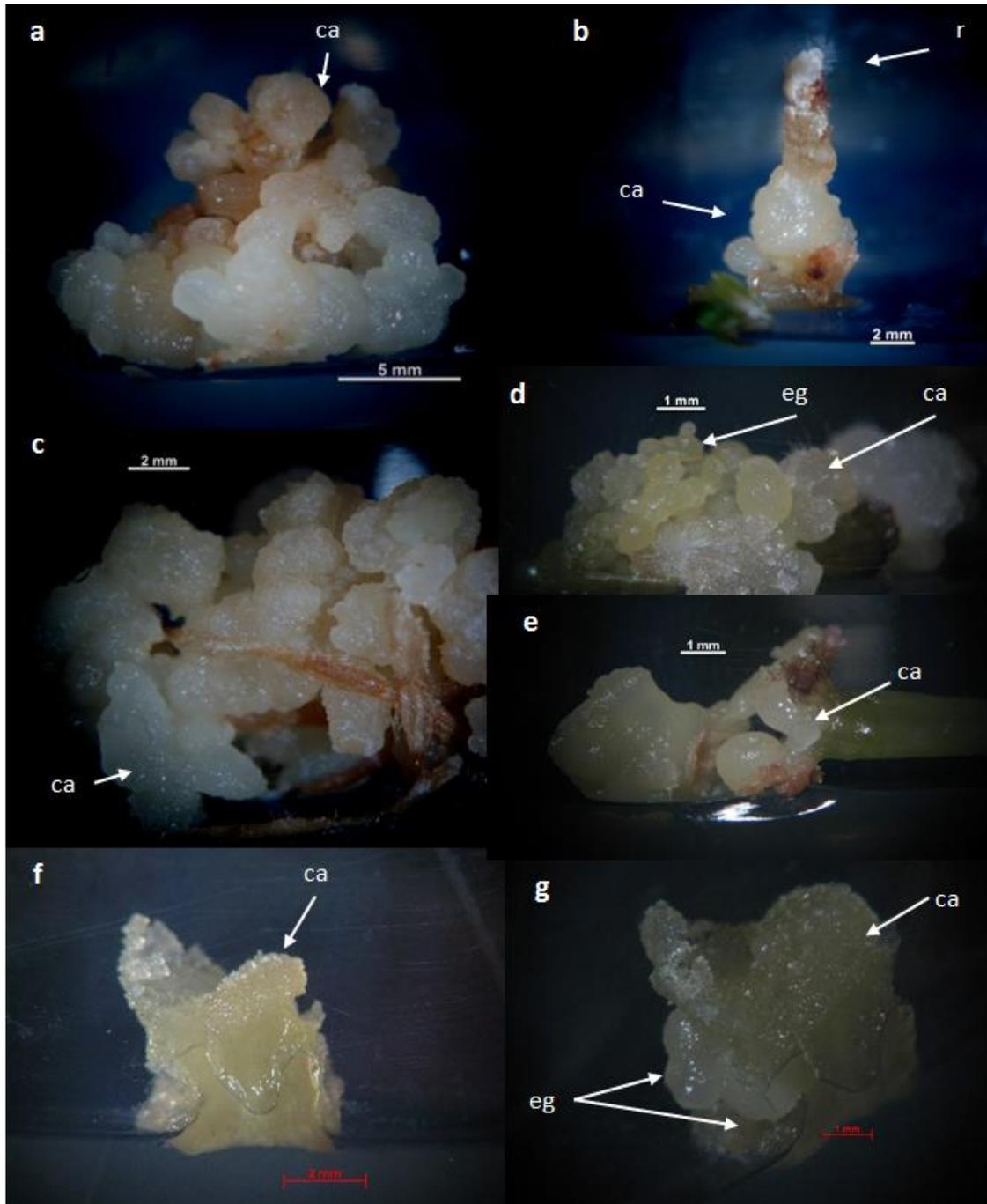


Figura 3.8. Respuestas obtenidas en el Tratamiento 4 (2,4-D/BAP-3/0.2 mg/L). (a. b y c) Formación de callo compacto color café-blanquizo en cúmulos o nódulos de aproximadamente 2mm de diámetro en explantes de AT, HV y PR, respectivamente. (d-e) Formación de estructuras globulares sobre explantes de AC. (f-g) Desarrollo de callo de apariencia friable a partir del cual se forman estructuras globulares en explante BT y BC. Resultados a 60 días después de que los explantes se sembraron en el tratamiento. ca: callo, eg: estructura globular, r: raíz.

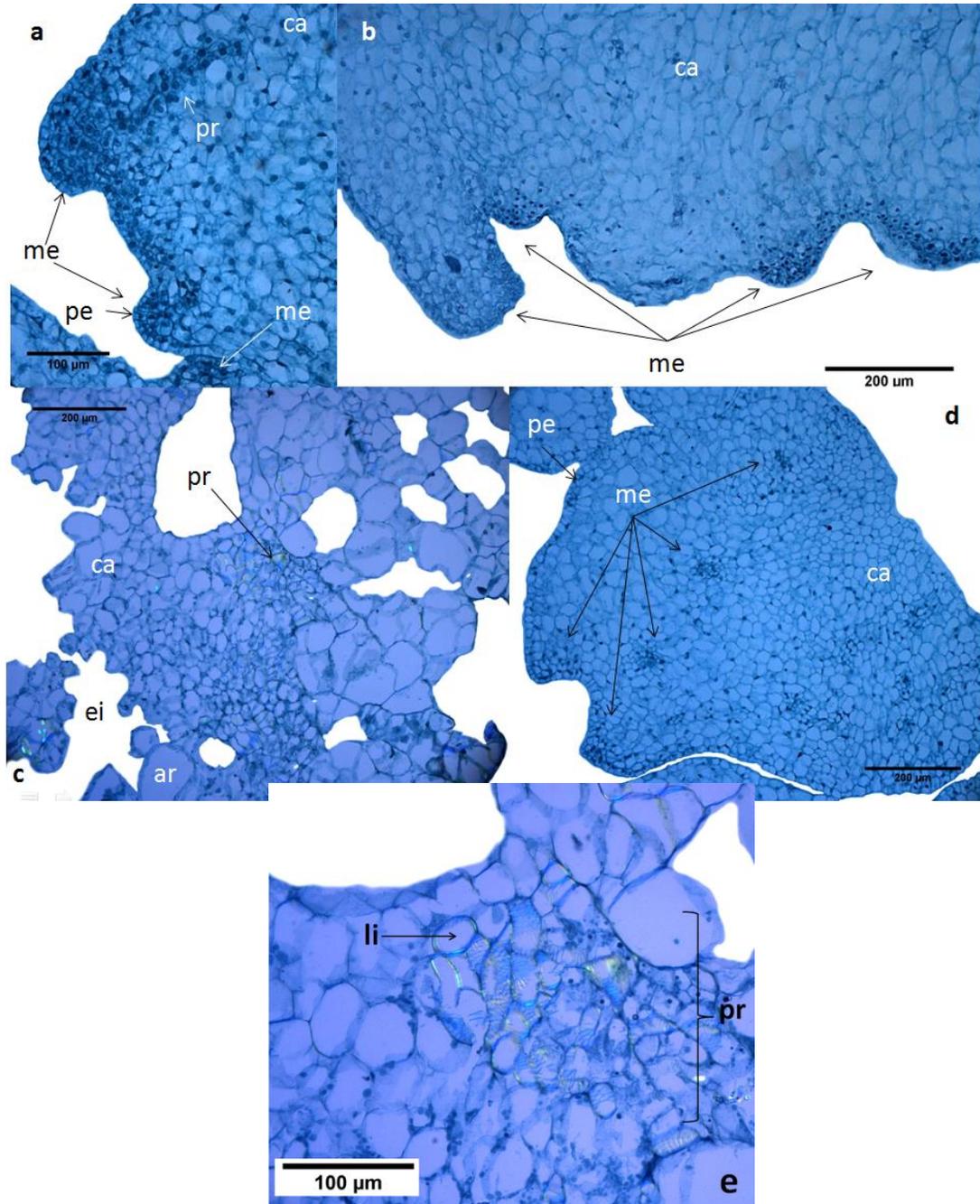


Figura 3.9. Análisis histológico de muestras de callo en tratamientos ANA/BAP después de 60 días desde la siembra de los explantes. (a) BT en ANA/BAP (0.5/1.5 mg) (40x), desarrollo de meristemos apicales y formación de procambium; (b) AT en ANA/BAP (0.5/1.5 mg) (20x), formación de meristemos en la periferia del callo. (c) HV en ANA/BAP (0.5/1.5 mg) (20x) (polarizada), callo diferenciado en dos partes: desarrollo de aerénquima con espacios intercelulares en una zona y en otra, proliferación de células indiferenciadas; (d) BT en ANA/BAP (0.5/2 mg) (20x), se observa la formación de regiones meristemáticas en toda la extensión del callo, y de peridermis en la periferia del callo. (e) HV en ANA/BAP (0.5/1.5 mg) (40x) (polarizada), se observa la diferenciación de algunas células en traqueidas jóvenes (formación de lignina) indicando la presencia de procambium. me: meristemo, pr: procambium, pe: peridermis, ca: callo, li: lignina, ar: aerénquima, ei: espacio intercelular.

Organogénesis y enraizamiento

Tabla 3.5. Respuesta organogénica. BT: base de tallo, AT: ápice de tallo, HV: hoja verdadera. Resultados obtenidos después de 12 meses de iniciados los cultivos.

a. Número de explantes con brotes.

| Tratamiento | Tipo de explante | | |
|----------------|------------------|----|----|
| | BT | AT | HV |
| ANA/BAP (mg/L) | | | |
| 0.5/1.5 | 17 | 10 | 13 |
| 0.5/2 | 13 | 13 | 15 |

b. Número de brotes totales.

| Tratamiento | Tipo de explante | | |
|----------------|------------------|-----|-----|
| | BT | AT | HV |
| ANA/BAP (mg/L) | | | |
| 0.5/1.5 | 1529 | 327 | 261 |
| 0.5/2 | 1406 | 462 | 842 |

c. Brotes por explante \pm desviación estándar. Letras distintas (^a) indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

| Tratamiento | Tipo de explante | | |
|----------------|-----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| | BT | AT | HV |
| ANA/BAP (mg/L) | | | |
| 0.5/1.5 | 89.941 \pm 40.425 ^a | 32.7 \pm 19.482 ^{bc} | 20.077 \pm 10.103 ^c |
| 0.5/2 | 108.153 \pm 47.277 ^a | 35.538 \pm 22.556 ^b | 56.133 \pm 52.008 ^b |

Los explantes que regeneraron brotes adventicios fueron únicamente BT, AT y HV en las combinaciones ANA/BAP 0.5/1.5 mg/L y ANA/BAP 0.5/2 mg/L.

Al término de 12 meses de iniciados los cultivos se obtuvieron un total de 4827 brotes. El tipo de explante BT en ANA/BAP 0.5/1.5 mg/L fue el tratamiento donde se presentó el mayor número de explantes con respuesta organogénica (17) y donde se obtuvo el mayor número de brotes adventicios (1529), mientras que BT en ANA/BAP 0.5/2 mg/L presentó el mayor promedio de brotes por explante inicial (108); ambos tratamientos fueron diferentes significativamente del resto de los tratamientos. En el caso del promedio de brotes por explante debe aclararse que no todos los brotes se desarrollaron directamente del tejido del explante ni del callo inmediato obtenido del explante, sino que al dividir los callos y sembrarlos en frascos separados los fragmentos proliferaron y posteriormente formaron brotes, también hubo la formación de brotes desde la base del tallo de plantas previamente

regeneradas (Figura 3.10). En la Tabla 3.5 (a, b y c) se muestran los datos de los resultados organogénicos obtenidos.

Después de 12 meses desde el desarrollo de los primeros brotes, las plantas regeneradas presentaron entre 2 y 5 hojas y con 1 a 4 raíces de 1 a 10 cm de largo (Figura 2.2 y Figura 3.10). Se tuvo un porcentaje del 79% de plantas con raíces en los tratamientos de BT.

Cuando los brotes aún se encontraban en medio nutritivo con RCV presentaron hiperhidratación en sus hojas y, en algunos casos, oxidación en sus tejidos, sin embargo, al ser subcultivados a medio con agar bacteriológico no volvieron a presentar estos problemas en las siguientes hojas de los mismos brotes ni en los nuevos brotes formados.



Figura 3.10. Proliferación de brotes adventicios a partir de plantas previamente regeneradas. 12 días después de iniciados los cultivos.

Aclimatización

Después de 6 meses de la transferencia a suelo (Figura 3.11), se obtuvo un 78.48% de supervivencia. Las plantas que sobrevivieron fueron aquellas con tamaños desde 0.6 cm hasta 3 cm, con 2 a 4 hojas y con raíces de entre 3 y 10 cm. Al término de 6 meses las plantas aclimatizadas tenían entre 5 y 6 hojas verdaderas de 5 cm de largo y entre 1 y 1.5 cm de ancho, y con 6 o 7 raíces de más de 10 cm. El color, forma y tamaño de las hojas era igual a aquellas plantas germinadas en condiciones *ex vitro* al inicio de esta investigación.



Figura 3.11. Plantas micropropagadas creciendo en invernadero, a seis meses de su transferencia a suelo.

4. Discusión

Desinfección

Martínez-Palacios y col. (2003) desinfectaron semillas de *A. victoriae-reginae* con una solución de agua y jabón, posteriormente etanol 70% v/v por 1 min y finalmente cloro comercial al 30% v/v con 2 gotas de tween 20 durante 20 min, obteniendo nula contaminación. Aplicando el mismo procedimiento (con pequeñas variantes indicadas entre paréntesis) se obtuvieron los mismos resultados con semillas de *A. angustifolia* (etanol 96% v/v por 1 min; Arzate-Fernández y Mejía Franco, 2011), *A. atrovirens* (cloro comercial 10% v/v por 20 min; Ayala, 2012) y *A. parrasana* (cloro comercial 50% v/v por 10 min; Santacruz-Ruvalcaba *et al*, 1999).

En la investigación de Rosales y col. (2008) con semillas de *A. cupreata*, *A. difformis*, *A. karwinskii*, *A. obscura*, *A. potatorum* (cloro comercial 25% v/v por 25 min) se reportó un porcentaje de contaminación inferior al 20% en todas las especies. Arce-Montoya y col. (2006) en su investigación con *Yucca valida* (cloro comercial 10% v/v por 10 min) reportaron contaminación del 21.8% en su total de semillas sembradas, especificando que un hongo fue el contaminante y que cuyo origen fue endógeno. Este es el único reporte de contaminación endógena y en ese caso el uso de antibióticos en el medio de cultivo o retirar la testa y desinfectar directamente al embrión (práctica conocida como 'rescate de embriones' y que no ha sido reportada para especies de *Agave*) es recomendable (George *et al.*, 2008).

Un proceso de desinfección distinto fue utilizado para semillas de *A. warelliana* por Santos (2009) quien usó agua con jabón, fungicida Agri-mycin^{M.R.} 3 g/L por 2 horas, cloro comercial al 25% v/v con 1 gota de tween 20 y una gota de Bacterín H24^{M.R.} durante 20 min obteniendo 0% de contaminación.

Comparando lo anterior con los resultados de desinfección obtenidos en la presente investigación (100 % de semillas establecidas asépticamente), es posible considerar que el empleo de una desinfección superficial (utilizando jabón antibacterial, etanol y cloro comercial) es suficiente para obtener altos porcentajes de semillas establecidas asépticamente en condiciones *in vitro*.

Germinación

En esta investigación la germinación se vio favorecida en condiciones *in vitro* (88.89 %) en comparación con las condiciones *ex vitro* (71.10 %), esto debido a distintos factores: humedad, temperatura, luz, la microatmósfera dentro de los frascos y los componentes del medio de cultivo.

Para evaluar el efecto de la humedad Ramírez-Tobías (2010) evaluó la imbibición y germinación de semillas de 7 especies de *Agave* (*A. americana*, *A. asperrima*, *A. cupreata*, *A. durangensis*, *A. lechuguilla*, *A. salmiana* y *A. striata*) colocándolas sobre vermiculita y con distinto potencial hídrico (el cual está dado principalmente por porcentaje de humedad del sustrato): -0.03 MPa, -1.0 MPa y -1.5 MPa. Como resultado obtuvo en todas las especies un alto porcentaje de imbibición (superior al 100%) en potencial hídrico de -0.03 MPa y -1.0 MPa, y alto porcentaje de germinación (superior al 80%) con un potencial hídrico de -0.03 MPa. Estudio similar fue hecho por Rangel-Landa (2009) con *A. potatorum* donde logró porcentajes de germinación mayores al 80% con potencial hídrico menor a -0.6 MPa.

Con base en lo anterior es posible deducir que el potencial hídrico óptimo para la germinación en el género *Agave* está en el intervalo entre 0.0 y -0.6 MPa (cuanto más cercano esté a 0 MPa, representa más porcentaje de humedad), intervalo en el que se encuentra el potencial hídrico de un medio de cultivo MS gelificado con 4 g/L de gellan gum (-0.576 ± 0.01 MPa; de acuerdo con Buah *et al*, 1999) como el utilizado en esta investigación para la germinación de *A. guiengola* en condiciones *in vitro*.

Otro factor estudiado en la literatura es la temperatura. Ramírez-Tobías (2010) evaluó la imbibición y germinación de semillas de 7 especies de *Agave* a distintas temperaturas (entre 10 y 40°C). A partir de 25°C la tasa de imbibición aumenta y ocurre en las primeras 36 h y es a los 25°C cuando los porcentajes de germinación fueron en promedio 91%. *A. lechuguilla* y *A. striata* alcanzaron su germinación máxima en 90 h, *A. americana* y *A. salmiana* en 120 h, y *A. asperrima*, *A. cupreata* y *A. durangensis* en 150 h en esa temperatura. Orea y col. (2006) trabajaron con semillas de *A. durangensis* y evaluaron su germinación a distintas temperaturas

dentro del intervalo de 15°C a 35°C. Cuando las semillas fueron incubadas a 20 y 25°C los primeros eventos de germinación se dieron antes de 8 d y la germinación máxima fue 97 y 94% respectivamente, después de 16 d. Vázquez-Díaz *et al.* (2011) evaluó la germinación de *A. salmiana* en condiciones de invernadero durante distintas épocas del año, siendo en el verano del 2008 con 22°C de temperatura media (en el Estado de México) donde se presentó el mayor porcentaje de germinación (71%). Estos resultados muestran que para estas especies la temperatura óptima para germinar está alrededor de los 25°C, temperatura en la que fueron incubadas las semillas de *A. guiengola* en condiciones *in vitro* en esta investigación.

Cabe destacar la investigación realizada por Pérez-Sánchez (2009) quien estudió el efecto del potencial hídrico y la temperatura, ambos factores de manera conjunta, sobre la germinación de varias especies de clima árido, entre ellas *A. lechuguilla* y *A. salmiana*. La mayor germinación (85%) ocurrió a 25°C con 0 y -0.2 MPa para *A. lechuguilla* y 25°C con -0.6 MPa para *A. salmiana*, después de 16 d.

En las investigaciones sobre germinación *in vitro* se tienen condiciones favorables de temperatura y humedad. Martínez-Palacios y col. (2003) trabajaron con semillas de *A. victoriae-reginae* y obtuvieron 90% de germinación después de 2 semanas y Ayala (2012) sembró semillas de *A. atrovirens* y obtuvo 50% de germinación. En ambos casos se sembraron en medio MS y fueron incubadas a 25°C, con fotoperiodo de 16 horas luz/oscuridad. Santos (2009) con *A. warelliana* obtuvo 88% de germinación después de 27 d igualmente a 25°C, pero en medio B5 y bajo oscuridad total. Rosales y col. (2008) quienes sembraron semillas de *A. cupreata*, *A. difformis*, *A. karwinskii*, *A. obscura* y *A. potatorum*, reportan porcentajes de germinación de 68, 66, 63, 100 y 60 % respectivamente, en medio MS, incubadas a 25°C y expuestas a la luz las 24 horas. Santos (2009) obtuvo 38% de germinación cuando las semillas de *A. warelliana* estuvieron expuestas 24 horas a la luz. A pesar de proporcionar las condiciones favorables, en algunos trabajos no se observan altos porcentajes de germinación. Santos (2009) comparó la germinación de *A. warelliana* en distintos fotoperiodos y la exposición permanente a la luz disminuyó

considerablemente el porcentaje de germinación y Rosales y col. (2008) expusieron las semillas a la luz de manera permanente lo que pudo haber afectado negativamente.

Otro factor a considerar es la microatmósfera dentro de los frascos de cultivo *in vitro*, donde se acumula el etileno. El etileno es una fitohormona que juega un papel importante en procesos fisiológicos y del desarrollo tales como la germinación, crecimiento, floración y senescencia de hojas y flores (Ramina *et al.*, 2007). Matilla (2000) menciona que algunos autores sostienen que la producción de etileno es un requisito para la germinación; en su revisión reporta especies que son extremadamente sensibles al gas, mientras que otras requieren niveles relativamente altos para provocar la germinación. Hasta ahora no se ha reportado el efecto que tiene esta fitohormona en semillas de agaves, pero este estudio con *A. guineola* puede señalar que la acumulación de etileno en el cultivo *in vitro* favorezca altos porcentajes de germinación y sea una ventaja sobre la siembra en condiciones *ex vitro*.

Por último, la composición del medio de cultivo, principalmente la fuente de carbono, también favorece a la germinación. Estudios de germinación en *Paphiopedilum ciliolare* (Pierik *et al.*, 1988) y *Elaeis guineensis* (Okafor y Okezie, 2016) se obtienen altos porcentajes de germinación y mejor desempeño en el desarrollo de las plántulas cuando la sacarosa está presente en el medio de cultivo y se reduce la germinación cuando la sacarosa no es adicionada.

Hasta la fecha no se ha hecho una comparación de la germinación en condiciones *in vitro* y condiciones *ex vitro* en el género *Agave*, sin embargo, se ha hecho esta comparación en otras especies de climas áridos como *Mammillaria bombycina* (Yáñez, 2011) con la que se obtuvo el 92.13% de germinación *in vitro* y 38% de germinación *ex vitro*, y con *Backebergia militaris* (Fernández-Tellez, 2014) no se presentaron eventos de germinación en condiciones *ex vitro* pero en condiciones *in vitro* germinaron el 75%.

Con toda la información expuesta sobre germinación en el género *Agave* es posible considerar que las condiciones óptimas para la germinación son de alta humedad y

en temperaturas cercanas a los 25°C y que estas condiciones se logran fácilmente en el cultivo *in vitro*. Por otro lado, otros factores como la composición del medio de cultivo y la microatmósfera dentro de los frascos, evaluados en otras especies, corroboran la ventaja de germinar semillas en condiciones *in vitro*.

Oxidación

En esta investigación se observaron porcentajes bajos de oxidación. El 25.5 % de los explantes de PR presentaron oxidación siendo el tipo de explante con el mayor porcentaje; el resto de los tipos de explantes no superaron el 12.7% (correspondiente a BC). Los bajos porcentajes de oxidación se pueden explicar por varias causas.

La oxidación se presenta por la producción de especies reactivas de oxígeno y compuestos fenólicos por parte del explante. Por otro lado, los eventos de oxidación son frecuentes en las siguientes situaciones: cuando los explantes son muy pequeños, cuando el tamaño del área del corte durante la disección es grande y cuando el explante proviene de órganos maduros (Preece y Compton, 1991; Yadav y Tyagi, 2006; George *et al.* 2008; Fernández-Tellez, 2014).

Para el experimento de inducción morfogénica se utilizaron plántulas de 50 d de edad cuando los tejidos eran jóvenes e inmaduros, por lo que posiblemente no presentan altas concentraciones de los compuestos responsables de la oxidación. En *A. angustifolia* y *A. victoriae-reginae* se han utilizado plantas juveniles como fuente de explantes y tanto la contaminación como la oxidación fueron una problemática complicada de superar (Ramírez-Villalobos, 2007; Rivera, 2015), en ese sentido el uso de plántulas como fuente de explantes resulta ventajoso.

Los siguientes aspectos son el tamaño del explante y el tamaño del área de corte. En este caso todos los tipos de explantes eran pequeños (menores a 1.5 cm de largo y 4 mm de ancho) lo que los hacía muy susceptibles a la oxidación, pero los cortes para obtener los explantes fueron transversales evitando que el tamaño del área de corte fuese muy grande, a excepción de los tipos de explantes provenientes del tallo los cuales tenían un tamaño menor a 5 mm de largo y de ancho y no se

podía minimizar el tamaño del área del corte. Por lo anterior, los explantes de tallo se visualizaban como los más vulnerables a la oxidación y era prudente evitarlo.

Para evitar la oxidación, principalmente en los explantes AT y BT, se adicionaron adsorbentes y antioxidantes en el medio de cultivo. Como adsorbente se utilizó PVP (2 g/L) el cual adsorbe compuestos fenólicos a través de puentes de hidrógeno. Ha sido utilizado ampliamente en el CTV, ya sea, aplicado como enjuague al explante o mediante su incorporación al medio de cultivo como en esta investigación. Como suplemento en el medio de cultivo se ha empleado en el cultivo *in vitro* de *Aconitum napellus* (0.5 g/L; Cervelli, 1987), *Pouteria lucuma* (1-3 g/L; Jordan y Oyanedal, 1992), *Malus sylvestris* (5 g/L; Walkey, 1972), *B. militaris* (1-4 g/L; Fernández-Téllez, 2014), y *A. victoriae-reginae* (2 g/L; Rivera, 2015) controlando la oxidación y evitando el oscurecimiento total de los explantes cultivados. Adicionalmente, Amin y Jaiswal (1988), Teixeira y col. (1993) y Gannoun y col. (1995) mencionan la conveniencia de combinar el uso del PVP con algún agente antioxidante u otro adsorbente para disminuir la oxidación en los tejidos.

También se agregaron al medio de cultivo 2 antioxidantes: ácido cítrico (ACi; 150 mg/L) y ácido ascórbico (AAs; 150 mg/L). Ambos compuestos tienen la capacidad de aceptar electrones y reaccionar directamente con especies reactivas de oxígeno y, al igual que el PVP, pueden emplearse como enjuague previo a la siembra aséptica o adicionarse al medio de cultivo (Preece y Compton, 1991; George *et al.*, 2008). Como complemento en el medio de cultivo se han utilizado en investigaciones con *A. angustifolia* (ACi 150 mg/L y AAs 100 mg/L; Ramírez-Villalobos, 2007), *Coffea canephora* var. Robusta (ACi 150 mg/L y AAs 150 mg/L; Fuentes-Molina, 2013), *Yucca elephantipes* (ACi 150 mg/L; Pierick y Steegmans, 1983) y *Spondias purpurea* (AAs 300 mg/L; Azofeifa, 2009), y en estos estudios la oxidación se redujo considerablemente.

El uso de plántulas como fuente de explantes y la adición de PVP y antioxidantes en el medio de cultivo en la propagación *in vitro* de *A. guiengola* contribuyó a evitar altos porcentajes de oxidación en los explantes.

Embriogénesis somática

En los tratamientos con 2,4-D y BAP en condiciones de oscuridad total, en todos los tipos de explantes, se obtuvieron callos color blanquecino de consistencia compacta el cual fue subcultivado a medio MS sin reguladores o a medio con 2,4-D en menor concentración (0.5 g/L), y en ningún caso se desarrollaron embriones somáticos, sólo en algunos casos se observó la regeneración de raíces. En el cultivo *in vitro* de embriones cigóticos de *A. angustifolia* se utilizó medio de cultivo MS con 2 o 3 mg/L de 2,4-D y 0.1 mg/L de BAP (en condiciones de oscuridad durante 70 d) y se obtuvo callo con características similares a las observadas en esta tesis; los callos fueron subcultivados a medio MS con menor concentración de sales inorgánicas (25%) y de 2,4-D (0.1 mg/L) en condiciones de luz/oscuridad (16/8 h), lo que permitió el desarrollo y maduración de embriones somáticos (Arzate-Fernández y Mejía-Franco, 2011). En el cultivo *in vitro* del tallo de plántulas (cortado en secciones transversales de aprox. 5mm de grosor) de *A. fourcroydes* en medio de cultivo MS con las auxinas Picloram (0.5 mg/L) o Dicamba (0.5 mg/L) durante un mes en condiciones de oscuridad se obtuvo embriogénesis somática por vía directa; los embriones somáticos se subcultivaron a medio de cultivo MS sin RCV, con sales inorgánicas concentradas al 50% y en condiciones de luz/oscuridad (16/8 h) donde maduraron y germinaron (Monja-Mio y Robert, 2013). Otra investigación sobre embriogénesis somática fue reportada por Ayala (2012) quien, trabajando con *A. atrovirens*, cultivó fragmentos de hojas de plántulas, la base de las hojas de plántulas y embriones cigóticos en medio de cultivo MS con 2.4 mg/L de 2,4-D en condiciones de oscuridad; obtuvo como respuesta la formación de callo de consistencia friable de color blanquecino; los callos se subcultivaron a medio de cultivo MS con 0.125, 0.25 y 0.5 g/L de 2,4-D en condiciones de luz/oscuridad (16/8 h) logrando que se desarrollaran embriones somáticos a partir de los callos obtenidos de los fragmentos de las hojas.

El proceso de embriogénesis somática se inicia comúnmente en medios de cultivo que contienen altos niveles de auxinas (especialmente 2,4-D), pero generalmente los embriones no se desarrollan completamente hasta que la concentración de

auxina se reduce o, en algunos pocos casos, se elimina (George *et al.*, 2008); en el caso de los agaves la respuesta embriogénica se ve favorecida por el uso de auxina en altas concentraciones (sola o en combinación con una citocinina en bajas concentraciones) en tejidos jóvenes, principalmente extraídos de plántulas, aunque también se ha obtenido esa respuesta en explantes provenientes de plantas juveniles como en *A. victoriae-reginae* (Rivera, 2015); la embriogénesis somática también se favorece en condiciones de oscuridad total y para la maduración completa de los embriones se recomienda la disminución de la concentración de auxina y la reducción de la concentración de sales inorgánicas.

Organogénesis

Ejemplos de investigaciones donde se obtuvo organogénesis directa en el género *Agave* son *A. parrasana* (Santacruz-Ruvalcaba *et al.*, 1999), *A. grijalvensis* (Sánchez-Urbina *et al.*, 2008), y *A. cupreata*, *A. difformis*, *A. karwinskii*, *A. obscura* y *A. potatorum* (Rosales *et al.*, 2008). En todos estos trabajos se utilizó el tallo completo como explante y se cultivó en medio MS con 1 a 10 mg/L de citocinina (principalmente BAP) lo que promovió la formación de brotes adventicios directamente desde el explante después de 90 d.

Otro ejemplo de organogénesis directa es reportado para *A. salmiana*. Silos-Espino y col. (2007) cultivaron secciones transversales (de 2 mm de grosor y 20 mm de diámetro) obtenidas de tallos de plantas con 3-4 años de edad, en medio de cultivo MS con 2 mg/L de BAP y 0.25 mg/L de AIA durante 45 d donde se regeneraron hasta 20 brotes por explante sin una fase previa de callo (20.5 brotes por explantes después de 45 d), como ocurrió en algunos explantes de hoja verdadera en esta tesis.

En cuanto a organogénesis indirecta, Groenewald y col. (1977) sembraron en medio de cultivo LS (Linsmaier y Skoog, 1965) con 5 mg/L de Kinetina y 1 mg/L de 2,4-D (durante 6 meses) embriones cigóticos (*Agave* sp.) los cuales formaron callo y posteriormente brotes adventicios cuando se eliminaron los RCV; Robert y col. (1987) utilizaron como explantes cubos de 1 cm³ obtenidos de tallos de *A.*

fourcroydes de 2 años de edad, y los sembraron en medio MS con 1 mg/L de BAP y 0.25 mg/L de 2,4-D durante 7 semanas donde se formaron y proliferaron callos, que posteriormente se subcultivaron a medio con la citocinina donde regeneraron brotes (6 brotes por explante después de 19 semanas); Hazra y col. (2002) utilizaron como explante hojas y tallos de plantas de *A. sisalana* propagadas *in vitro*, los cultivaron en medio MS con 1 mg/L de kinetina y 2 mg/L de 2,4-D durante 45 d lo que favoreció la formación de callo compacto color verde cuando provenía de los tallos y amarillo proveniente de las hojas, posteriormente los callos fueron subcultivados a medio con 5 mg/L de BAP durante 45 d lo que indujo la regeneración de hasta 25.3 brotes por gramo de callo; con *A. tequilana* Valenzuela-Sánchez *et al.* (2006) cultivaron fragmentos del tallo (cortes longitudinales y transversales) de plantas de un año de edad en medio MS con 2.5, 5 o 10 mg/L de BAP y 0.25 mg/L de 2,4-D durante 30 d y obtuvieron callos compactos, posteriormente los subcultivaron a medio MS con 1.2 mg/L de ANA lo que provocó el cambio de consistencia a friable y, después, la regeneración de brotes (14.5 brotes por explante).

En la mayoría de las investigaciones con agaves incluyendo esta tesis, es el tallo el tejido más regenerativo y donde se obtuvo mayor cantidad de brotes por explante, Además, George y col. (2008) mencionaron que la interacción de los RCV auxina-citocinina es muy eficaz para promover la iniciación de la organogénesis directa o indirecta, pudiendo ser brotes o raíces como ocurrió en esta investigación con *A. guiengola*.

Otro aspecto a considerar es el corte hecho a los explantes, en particular a las hojas (HV) y al tallo (AT y BT). La absorción de los RCV agregada exógenamente se da principalmente en la superficie donde se realiza el corte (Guan y De Klerk, 2000). En el caso de las auxinas, la mayor parte del regulador de crecimiento actúa en el sitio de la herida, induciendo la desdiferenciación celular y conduciendo a la formación de un nuevo meristemo (Da Costa *et al.*, 2013), como pudo haber ocurrido en los explantes de hoja utilizados con *A. guiengola* donde se regeneraron brotes por la vía directa en la superficie donde se realizó el corte. Por otro lado, para *A.*

tequilana se tiene reportado que los cortes transversales de tallo son más regenerativos que en los cortes longitudinales (Valenzuela-Sánchez *et al.*, 2006).

En la presente investigación se realizaron análisis histológicos de los callos que regeneraron brotes con el objetivo de averiguar si se trataba de respuestas organogénicas o embriogénicas y se observaron zonas donde las células presentaron organización y dichas células tenían características propias de un meristemo (Figura 3.9a-d) por lo que se consideró la respuesta obtenida como organogénesis. Hasta donde tenemos conocimiento no se tienen reportes de organogénesis comprobada por análisis histológicos en el género *Agave*, sin embargo, si se tienen pruebas sobre embriogénesis somática (Portillo *et al.*, 2007; Monja-Mio y Robert, 2013; Rivera, 2015) donde se observó polaridad en las divisiones celulares, la fase globular de los embriones, la fase torpedo o la fase cotiledonar, y en estas últimas dos fases se puede visualizar el procambium (Figura 1.6), mientras que con *Agave guiengola* se observó el procambium pero no asociado a estructuras similares a la fase torpedo o cotiledonar en agaves sino a grupos celulares con características de meristemo apical. El desarrollo de estos meristemas es muy similar a lo obtenido en otras especies como *Allium altissimum* (Poluboyarova *et al.*, 2014), *Citrus limon* (Navarro-García *et al.*, 2016) y *Phaseolus vulgaris* (Franklin *et al.*, 1991) (Figura 1.5).

De acuerdo la definición de micropropagación de George y col. (2008), en esta investigación se sembraron 85 semillas en condiciones *in vitro* de las cuales germinaron 76 y a partir de este material se obtuvieron 4827 plantas después de 12 meses, por lo que se considera que se logró la micropropagación de la especie.

Enraizamiento y aclimatización

En el proceso de enraizamiento *in vitro* de agaves, Robert y col. (2006) recomendaron el subjuntivo a medio de cultivo libre de RCV y en caso de no lograrlo podría reducirse la concentración de la fuente de carbono o agregar bajas concentraciones de auxina. En el cultivo *in vitro* de *A. fourcroydes* (Robert *et al.*, 1987), *A. angustifolia* (Enríquez-del Valle *et al.*, 2005) y *A. salmiana* (Silos-Espino

et al., 2007) se reportó el uso de una auxina para promover el enraizamiento: 0.025 mg/L de 2,4-D, 0.75 mg/L de AIB y 0.2 mg/L de AIA respectivamente. Sin embargo, en el cultivo *in vitro* de *A. arizonica* (Powers y Backhaus, 1989), *A. sisalana* (Das, 1992), *A. parrasana* (Santacruz-Ruvalcaba *et al.*, 1999), *A. victoriae-reginae* (Martínez-Palacios *et al.*, 2003), *A. cupreata*, *A. difformis*, *A. karwinskii*, *A. obscura*, *A. potatorum* (Rosales *et al.*, 2008), y *A. tequilana* (Valenzuela-Sánchez *et al.*, 2006) se utilizó medio de cultivo sin RCV y en todos los casos se obtuvieron porcentajes de enraizamiento mayores al 70%, tal y como ocurrió en esta investigación.

En *A. guiengola*, así como en otras especies del género, el enraizamiento de brotes adventicios se obtuvo con el uso de medio de cultivo sin RCV. Cabe mencionar que hay distintas variables que se pueden medir además del porcentaje de enraizamiento: el número de raíces, tamaño de las raíces (largo y ancho) y velocidad de crecimiento de las raíces. Todas estas variables se pueden favorecer o disminuir dependiendo de la concentración de la fuente de carbono y de auxinas adicionadas al medio de cultivo (Enríquez-del Valle *et al.*, 2012).

El último paso del CTV es la aclimatización, es decir, la transferencia de las plantas de condiciones *in vitro* a condiciones *ex vitro*. Debido a las características morfológicas y fisiológicas que tienen las plantas propagadas *in vitro* (Tabla 1.4) Robert *et al.* (2006) y George *et al.* (2008) sugirieron que el cambio de condiciones deba ser gradual, haciendo énfasis en mantener las plantas durante varios días en alta humedad y reducida intensidad lumínica, introduciendo las macetas en bolsas de polietileno o charolas de plástico transparente y colocándolas a la sombra.

Dichas recomendaciones se llevan a la práctica en gran cantidad de trabajos con agaves. Con *A. sisalana* Das (1992) colocó sus macetas dentro de bolsas de polietileno durante 15 d; con *A. angustifolia* Enríquez-del Valle *et al.* (2005) colocaron las plantas durante 30 d en un invernadero con alta humedad relativa producida por riego por nebulización aplicada 10 segundos cada 12 min durante las horas del día con mayor temperatura; Sánchez-Urbina *et al.* (2008) cubrieron sus plantas de *A. grijalvensis* con membranas de polietileno durante 2 semanas; con *A. cupreata*, *A. difformis*, *A. karwinskii*, *A. obscura* y *A. potatorum* Rosales *et al.* (2008) tomaron

recipientes con plantas enraizadas, se les eliminó el sello y se les aflojó la tapa durante 15 d para después sembrarlas en sustrato y colocarlas en condiciones de invernadero; Aureoles-Rodríguez *et al.* (2008), trabajando con *A. inaequidens*, introdujeron las macetas en bolsas de polietileno durante 3 semanas; con *A. warelliana* Santos (2009) mantuvo por una semana sus macetas en bolsas de polietileno, posteriormente perforó las bolsas y finalmente las retiró al término de 15 d; con *A. fourcroydes* Monja-Mio y Robert (2013), durante 30 d, mantuvieron a sus plantas en charolas de plástico y posteriormente las transfirieron a un invernadero. En todas estas investigaciones se obtuvieron porcentajes de supervivencia superiores al 75% al igual que en esta investigación (78.48%) lo que sugiere que mantener las plantas propagadas *in vitro* bajo condiciones de alta humedad y sin exponerlas directamente a la luz solar, durante los primeros días, facilita la supervivencia de las plantas durante el proceso de aclimatización.

Respecto al tipo de sustrato los componentes reportados en la literatura son los siguientes: con *A. grijalvensis* Sánchez-Urbina *et al.* (2008) utilizaron sustrato de musgo y agrolita en proporción 3:2; con *A. cupreata*, *A. difformis*, *A. karwinskii*, *A. obscura* y *A. potatorum* (Rosales *et al.*, 2008) usaron tierra negra y arena (1:1), mezcla igualmente utilizada por Das (1992) con *A. sisalana*; plantas de *A. inaequidens* fueron sembradas en sustrato con 60% de peat moss y 40% de perlita (Aureoles-Rodríguez *et al.*, 2008); con *A. warelliana* (Santos, 2009) se usó sustrato compuesto de 60% de lombricomposta y 40% de tepojal y para *A. fourcroydes* Monja-Mio y Robert (2013) utilizaron tierra negra y vermiculita en proporción 1:3. En la mayoría de los casos, como en esta investigación, se hace uso de componentes con partículas de tamaño relativamente grande (agrolita, perlita, tepojal o vermiculita) en combinación con materia orgánica (tierra negra o peat moss) constituyendo un sustrato bien drenado y poroso, para garantizar la ventilación de las raíces y que se seque en un tiempo relativamente corto (1-2 d entre riegos), adecuado para plantas suculentas y que crecen en hábitats con pocos centímetros de suelo como los agaves.

Además de la supervivencia, se pueden evaluar otras características que indiquen el desempeño de las plantas aclimatizadas, como el tamaño y número de hojas, tamaño y número de raíces y peso seco, y hacer uso de distintos sustratos o de fertilizantes (George *et al.*, 2008; Enríquez-del Valle *et al.*, 2012).

5. Conclusiones

- El método empleado para la desinfección de semillas de *A. guineensis* utilizando jabón antibacterial, etanol, SoluVet® y cloro comercial, permitió establecerlas asépticamente en medio de cultivo.
- La germinación se vio favorecida en condiciones *in vitro* (88.89%) en comparación con las condiciones *ex vitro* (71.10%), esto debido a los siguientes factores: humedad, temperatura, luz, la microatmósfera dentro de los frascos y los componentes del medio de cultivo.
- Se observaron porcentajes bajos de oxidación en los explantes cultivados *in vitro* gracias al uso de plántulas como fuente de explantes y la adición de adsorbentes y antioxidantes en el medio de cultivo.
- Los explantes sembrados en medio de cultivo con 2,4-D y BAP en condiciones de oscuridad indujeron la formación de callo con características de callo embriogénico, sin embargo, no se observó el desarrollo de embriones somáticos.
- Los explantes BT, AT, y HV sembrados en los tratamientos con ANA y BAP en fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad formaron callos partir de los cuales regeneraron brotes adventicios.
- Los análisis histológicos a los callos confirmaron el desarrollo de meristemas apicales y, por consiguiente, se fortaleció la aseveración de la regeneración de brotes.
- Los explantes de tallo en ambas combinaciones de ANA y BAP fueron los tratamientos significativamente más regenerativos. El tratamiento con mayor

promedio de brotes por explante (108.15 brotes por explante) fue la base del tallo (BT) en medio de cultivo MS con ANA (0.5 mg/L) y BAP (2 mg/L).

- El porcentaje de enraizamiento fue del 79 % con el uso de medio de cultivo sin reguladores de crecimiento vegetal y gelificado con agar bacteriológico.
- Colocar las plantas propagadas en condiciones de alta humedad y bajo sombra durante los primeros días de la aclimatización dio como resultado un porcentaje de supervivencia del 78.48 % al término de 6 meses.
- Al término de 12 meses de iniciados los cultivos, se obtuvieron 4827 plantas a partir de 76 plántulas, por lo que se considera que en esta investigación se consiguió la micropropagación de *A. guiengola*.
- Se conocieron datos y características de las semillas de *A. guiengola* y su viabilidad, datos de germinación, características de las plántulas y se generó conocimiento sobre las condiciones de incubación, los reguladores de crecimiento vegetal y su concentración, y los tipos de explante adecuados para su micropropagación. Toda esta información es de gran importancia para ampliar el conocimiento sobre la especie y para contribuir al establecimiento de protocolos de propagación *in vitro* de aquellas especies de *Agave* que se encuentran en alguna categoría de riesgo o que son aprovechadas económicamente y no son propagadas eficientemente.

6. Referencias

- Akhtar, N. 2013. Somatic embryogenesis for efficient micropropagation of guava (*Psidium guajava* L.). *Protocols for Micropropagation of Selected Economically-Important Horticultural Plants*, 161-177.
- Amin, M. y Jaiswal, V. 1988. Micropropagation as a naid to rapid cloning of a guava cultivar. *Scientia Horticulturae*, 36: 89-95.
- Arce-Montoya, M., Rodríguez-Álvarez, M., Hernández-González, J. A., y Robert, M. L. 2006. Micropropagation and field performance of *Yucca valida*. *Plant cell reports*, 25(8): 777-783.
- Arias, 2011. Ecología poblacional de *Agave angustifolia* en la región de Xochicalco, morelos: Evaluación de su potencial para la restauración ecológica.
- Arizaga, S. 1999. Biología reproductiva de *Agave macroacantha* Zucc. en Tehuacán, Puebla. Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias, UNAM. Ciudad de México, México.
- Arizaga, S., Ezcurra, E., Peters, E., de Arellano, F. R., y Vega, E. 2000. Pollination ecology of *Agave macroacantha* (Agavaceae) in a Mexican tropical desert. I. Floral biology and pollination mechanisms. *American Journal of Botany*, 87(7): 1004-1010.
- Arzate-Fernández, A. M., y Mejía-Franco, R. 2011. Capacidad embriogénica de callos inducidos en ejes embrionarios cigóticos de *Agave angustifolia* Haw. *Revista fitotecnia mexicana*, 34(2): 101-106.
- Aureoles-Rodríguez, F., Legaria-Solano, J. P., Sahagún-Castellanos, J., y Peña Ortega, M. G. 2008. Propagación *in vitro* del 'Maguey bruto' (*Agave inaequidens* Koch), una especie amenazada de interés económico. *Revista Chapingo. Serie Horticultura*, 14(3): 263-269.
- Ayala, G. L. M. 2012. Inducción de embriogénesis somática en cultivo *in vitro* de *Agave atrovirens* Karw. ex Salmdyck. Tesis de Maestría en Biotecnología Aplicada. Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada, IPN.
- Azofeifa, Á. 2009. Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. *Agronomía Mesoamericana*, 20(1): 153-175.
- Bacchetta, G., Fenu, G., Mattana, E., Bueno Sanchez, A., Jiménez-Alfaro, B., Piotto, B., y Virevaire, M. 2008. Conservación *ex situ* de plantas silvestres. Jardín Botánico Atlántico.
- Boxus, P., Quoirin, M. y Line, J. M. 1977. Large scale propagation of strawberry plants from tissue culture. En: Reinert, J. y Bajaj, Y. P. S. (eds.) *Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture*. Edit. Springer Berlin Heidelberg New York, p.p. 130-143.
- Buah, J. N., Kawamitsu, Y., Sato, S., y Murayama, S. 1999. Effects of different types and concentrations of gelling agents on the physical and chemical properties of media and the growth of banana (*Musa* spp.) *in vitro*. *Plant production science*, 2(2): 138-145.
- Byng, J. W., Chase, M. W., Christenhusz, M. J., Fay, M. F., Judd, W. S., Mabberley, D. J., ... y Briggs, B. 2016. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the

orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical Journal Of The Linnean Society*, 181(1): 1-20.

Cadaval, A. 1999. Estudio evolutivo de los azúcares del néctar de *Agave lechuguilla* en el desierto de Chihuahua. Tesis de Licenciatura en Biología. Facultad de Ciencias, UNAM, México D.F.

Carreón, J. T., Pérez, A. C., y Banuet, A. V. 2011. Descubriendo el valor de los magueyes tamaulipecos. *CienciaUAT*, 19(1): 34-40.

Cervelli, R. 1987. *In vitro* propagation of *Aconitum noveboracense* and *Aconitum napellus*. *HortScience*, 22: 304-305.

Challenger, A. y J. Soberón. 2008. Los ecosistemas terrestres. *In* Capital natural de México. Vol. I: Conocimiento actual de la bioiversidad. Conabio, México. p. 87-108.

Da Costa, C. T., De Almeida, M. R., Ruedell, C. M., Schwambach, J., Maraschin, F. D. S., y Fett-Neto, A. G. 2013. When stress and development go hand in hand: main hormonal controls of adventitious rooting in cuttings. *Frontiers in plant science*, 4: 133.

Dahlgren, R. M. T., H. T. Clifford y P. F. Yeo. 1985. The families of the Monocotyledons. Structure, evolution and taxonomy. Springer-Verlag, Berlin. 520 p.

Das, T. 1992. Micropropagation of *Agave sisalana*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 31(3): 253-255.

Debergh, P.C. y Maene, L. J., 1981. A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. *Scientia Hort.*, 14: 335--345.

Díaz, L. P., Namur, J. J., & Bollati, S. A. 2006. Efecto del ácido cítrico y del carbón activado en la regeneración de plantas de orquídeas (*Laelia lundii*) por cultivo *in vitro* de semillas. En *Congreso Argentino de Floricultura. 3. Jornadas Nacionales de Floricultura. 8. 2006 11 07-10, 7-10 de noviembre de 2006. La Plata, Buenos Aires. AR.*

Diaz-Sala, C., Hutchison, K. W., Goldfarb, B., y Greenwood, M. S. 1996. Maturation-related loss in rooting competence by loblolly pine stem cuttings: the role of auxin transport, metabolism and tissue sensitivity. *Physiol. Plant.* 97: 481-490.

Eggli, U. 2001. Illustrated Handbook of Succulent Plants: Monocotyledons. Edit. Springer, Zürich, Switzerland, pág. 37.

Enríquez-del Valle, J. R., Carrillo-Castañeda, G. y Rodríguez de la O, J. L. 2005. Sales inorgánicas y ácido indolbutírico en el enraizado *in vitro* de brotes de *Agave angustifolia*. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 28(2): 175-178.

Enríquez-del Valle, J. R., Cruz-Valdez, I., y Carrillo-Castañeda, G. 2012. Acclimatization of *Agave angustifolia* Haw. Vitroplants in inert substrates and fertigated with different nutrimental dose. *Acta Horticulturae*, 947: 101-104.

Franklin, C. I., Trieu, T. N., Gonzales, R. A., y Dixon, R. A. 1991. Plant regeneration from seedling explants of green bean (*Phaseolus vulgaris* L) via organogenesis. *Plant cell, tissue and organ culture*, 24(3), 199-206.

Fernández-Tellez, M. A. 2014, Regeneración in vitro de *Backebergia militaris*. Tesis de Licenciatura en Biología, UNAM, México.

Fuentes-Molina, A. F. 2013. Embriogénesis somática en 12 clones comerciales de *Coffea canephora* var. Robusta (Rubiaceae). Tesis de Licenciatura en Biología. Facultad de Ciencias, UNAM. Ciudad de México, México.

Gannoun, S., Lionakis, S., Gerasopoulos, D., Kaska, N., Kuden, A., Ferguson, L. y Michailides, T. 1995. Aspects of in vitro culture of *Pistacia terebinthus* and *P. vera*. *Acta Horticulturae*. 419: 201-206.

García-Herrera, E. J., Méndez-Gallegos, S. J., y Talavera-Magaña, D. 2010. El género *Agave* spp. en México: principales usos de importancia socioeconómica y agroecológica. *Revista Salud Pública y Nutrición, Special Ed*, 5, 109-129.

García-Mendoza, A. J. 2011. Agavaceae. Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D. F. 88:1-95.

García-Mendoza, A. J. 2003. *Agave guiengola*. Revisión de las Agavaceae (sensu stricto), Crassulaceae y Liliaceae incluidas en el PROY-NOM-059-ECOL-2000. Jardín Botánico, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. Bases de datos SNIB-CONABIO. Proyecto W020. México. D.F.

García-Mendoza, A. J., y Chávez-Rendón, C. 2013. *Agave kavandivi* (Agavaceae: grupo *Striatae*), una especie nueva de Oaxaca, México. *Revista mexicana de biodiversidad*, 84(4), 1070-1076.

García-Mendoza, A. J. 1995. "Riqueza y endemismos de la familia Agavaceae en México", en E. Linares, P. Dávila, F. Chang, R. Bye y T. Elias (Eds.), Conservación de plantas en peligro de extinción: Diferentes enfoques, 51-71. México: Instituto de Biología, UNAM.

García-Mendoza, A. J. y Galván, R. 1995. Riqueza de la familia Agavaceae y Nolinaceae en México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. 56: 7-24.

Gentry, H. S. 1960. A new *Agave* from Oaxaca, Mexico. *Brittonia*, 12(2): 98-100.

Gentry, H. S. 1982. *Agaves of continental North America*. Edit. University of Arizona Press, p.p. 675.

George, E. F., Hall, M. A. y De Klerk, G. J. 2008. *Plant Propagation by Tissue Culture*. 3ª edición. Edit. Springer, p.p. 501.

Gómez-Pérez, R. M. 2001. Inducción morfogénica de las palmas (*Chamaedorea elegans* Mart. y *Chamaedorea sartorii* Liebm.) y el *Agave* (*Agave salmiana* Otto.) mediante cultivo *in vitro*. Tesis de Licenciatura en Biología, UNAM, México.

González-Caballero, O. 2008. Regeneración *in vitro* de *Turbinicarpus pseudopectinatus* (Backeb.) Glass y R. A. Foster y análisis de los regenerantes por RAPDs. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. IBUNAM, México.

González-Caballero, O., Juárez-Pérez W., Ronquillo-Vázquez, N., Estrada-Galván, B., Heredia-Guzmán, P., Flores Morales A., Jiménez-Rodríguez, A., Mata-Rosas, M. y Chávez-Avila, V.M. 2012. El Cultivo de Tejidos Vegetales; alternativa de oportunidades para el desarrollo de México. *Revista La Vida en La Sierra*, Universidad de la Sierra, Sonora. 5-9.

Groenewald, E. G., Wessels, D. C. J., & Koeleman, A. 1977. Callus formation and subsequent plant regeneration from seed tissue of an Agave species (Agavaceae). *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 81(4), 369-373.

Guan, H., y De Klerk, G. J. 2000. Stem segments of apple microcuttings take up auxin predominantly via the cut surface and not via the epidermal surface. *Scientia horticulturae*, 86(1): 23-32.

Harris, R. E., y Stevenson, J. H. (2016). In vitro propagation of *Vitis*. *VITIS-Journal of Grapevine Research*, 21(1): 22.

Hazra, S. K., Das, S., & Das, A. K. 2002. Sisal plant regeneration via organogenesis. *Plant cell, tissue and organ culture*, 70(3): 235-240.

Holling, C. S. 1973. Resilience and stability of ecological systems. *Annual Review of Ecological Systems* 4:1-23.

Hussey, G., y Stacey, N. J. 1981. *In vitro* propagation of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Annals of Botany*, 48(6): 787-796.

Instituto de Biología. "Agave guiengola Gentry - IBUNAM:MEXU:PVsn30792". UNIBIO: Colecciones Biológicas. 2010-05-27. Universidad Nacional Autónoma de México. Consultada en: 2015-3-15. Disponible en: <http://unibio.unam.mx/collections/specimens/urn/IBUNAM:MEXU:PVsn30792>

Jordan, M y Oyanedal, E. 1992. Regeneration of *Pouteria lucuma* (Sapotaceae) plants *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 31: 249-252.

Krishnamurthy, K. V. 2003. Textbook of biodiversity. Science Publishers, Inc., Enfield, New Hampshire, pp 242.

Lascuráin, M., List, R., Barraza, L., Díaz, E. P., Gual, F. S., Maunder, M., Dorantes, J. y Luna, V. E. 2009. Conservación de especies *ex situ*. En *Diversidad y conservación de recursos genéticos en plantas cultivadas, en capital natural de México, vol. II: Estado de conservación y tendencias de cambio* (Bellon, et al.), Conabio, México, págs. 517-544.

Linsmaier, E. M. y Skoog, F. 1965. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 18: 100-1 27.

Lock, G. W. 1985. On the scientific and practical aspects of sisal (*Agave sisalana*) cultivation. En *Biología y Aprovechamiento Integral del Henequen y Otros Agaves* (Cruz, C., Del Castillo,

L., Robert, M. L., and Ordanza, R. N., eds.), Centro de Investigación Científica de Yucatán A. C., México, pp 99–119.

Margara, J. 1988. Multiplicación vegetativa y cultivo *in vitro*. Los meristemos y la Organogénesis. Edit. Mundi-Prensa. España. p.p. 230.

Martínez, A. P. 1998. *Evaluación genética y demográfica de Agave victoriae-reginae T. Moore y aplicación del cultivo de tejidos para su conservación*. Tesis de Doctorado en Ciencias. Facultad de Ciencias, UNAM, México.

Martínez-Meyer, E., Sosa-Escalante, J. E., & Noguera, F. Á. (2014). El estudio de la biodiversidad en México: ¿una ruta con dirección? *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85: S1-S9.

Martínez-Palacios, A., Ortega-Larrocea, M. P., Chávez, V. M., y Bye, R. 2003. Somatic embryogenesis and organogenesis of *Agave victoriae-reginae*: Considerations for its conservation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 74(2): 135-142.

Matilla, A. J. 2000. Ethylene in seed formation and germination. *Seed science research*, 10(2): 111-126.

Miranda, F. y F. Hernández. 1963. Los tipos de vegetación de México y su clasificación. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 28:29-179.

Mittermeier, R. A., Goettsch-Mittermeier, C. y Robles-Gil, P. 1997. Megadiversidad: los países biológicamente más ricos del mundo. Cemex-Agrupación Sierra Madre, México, D. F.

Monja-Mio, K. M., y Robert, M. L. 2013. Direct somatic embryogenesis of *Agave fourcroydes* Lem. through thin cell layer culture. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 49(5): 541-549.

Murashige, T. 1974. Plant propagation through tissue cultures. *Annual review of plant physiology*, 25(1), 135-166.

Murashige, T. y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473–497.

Navarro-García, N., Morte, A., y Pérez-Tornero, O. 2016. *In vitro* adventitious organogenesis and histological characterization from mature nodal explants of *Citrus limon*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 52(2): 161-173.

Neyra, L. y L. Durand. 1998. Capítulo 3: Biodiversidad; Capítulo 4: Usos; Capítulo 5: Amenazas. En: CONABIO. La diversidad biológica de México: Estudio de País, 1998. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México.

Nobel, P. S. 1994. Remarkable Agaves and Cacti. Edit. Oxford University Press, 166 pp.

Okafor, U. C., y Okezie, C. E. A. 2016. Effect of carbohydrate source on the in vitro germination of *Elaeis guineensis* Jacq. zygotic embryos on two basal media. *African Journal of Biotechnology*, 15(29): 1531-1540.

Orea, L. G., Cifuentes, D. L. A., Gómez, O. S., y Hernández, V. V. 2006. Germinación de semillas (*Agave durangensis*) a diferentes temperaturas y efecto de la fertilización en el desarrollo de las plántulas. *Vidsupra*, 1(2):51-56.

Palma, F. 1991. El género *Agave* L. y su distribución en el estado de Oaxaca. Tesis de licenciatura. Depto. de Biología Experimental, Escuela Nacional de Estudios Profesionales, Unidad Iztacala, UNAM. México, D.F.

Pérez-Sánchez, R. M. 2009. Germinación de semillas de especies útiles y/o en categoría de riesgo del sur del desierto chihuahuense: efecto de la temperatura y del potencial hídrico. Tesis de Maestría en Ciencias Aplicadas. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica.

Pierik, R. L. M. 1990. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Edit. Mundi-Prensa. España, p.p. 326.

Pierik, R. L. M., Sprenkels, P. A., Van der Harst, B., y Van der Meys, Q. G. 1988. Seed germination and further development of plantlets of *Paphiopedilum ciliolare* Pfitz. *in vitro*. *Scientia Horticulturae*, 34(1-2): 139-153.

Pierik, R. L. M., y Steegmans, H. H. M. 1983. Vegetative propagation of a chimerical *Yucca elephantipes* Regel *in vitro*. *Scientia Horticulturae*, 21(3): 267-272.

Phillips, C. 2012. Guiengola: Softly in the Footsteps of Thomas MacDougall. *Cactus and Succulent Journal*, 84(4): 195-204.

Poluboyarova, T. V., Novikova, T. I., Vinogradova, G. Y., y Andronova, E. V. 2014. Morpho-Histological Analysis of Direct Shoot Organogenesis Induced in Flower Buds Cultures of *Allium altissimum*. *American Journal of Plant Sciences*, 5(13): 2015-2022.

Portillo, L., Santacruz-Ruvalcaba, F., Gutiérrez-Mora, A., y Rodríguez-Garay, B. 2007. Somatic embryogenesis in *Agave tequilana* Weber cultivar azul. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 43(6), 569-575.

Powers, D. E., y Backhaus, R. A. 1989. *In vitro* propagation of *Agave arizonica* Gentry & Weber. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 16(1): 57-60.

Preece, J. E., y Compton, M. E. 1991. Problems with explant exudation in micropropagation. En *High-Tech and Micropropagation I*. pp. 168-189.

Primack, R., Rozzi, R., y Feinsinger, P. 2001. Establecimiento de áreas protegidas. En: Primack *et al.* (ed.) *Fundamentos de Conservación Biológica*. Edit. Fondo de Cultura Económica, México. págs. 449-476.

Primack, R. 2002. *Ex situ* conservation strategies. En: Primack, R. (Ed.). *Essentials of conservation biology*. 3ª edición, edit. Sinauer Associates, Inc Publishers, USA, págs. 377-412.

Ramina, A., Chang, C., Giovannoni, J., Klee, H., Perata, P., y Woltering, E. 2007. Advances in plant ethylene research. In Proceedings of the 7th International Symposium on the Plant Hormone Ethylene, págs. 105-107.

Ramírez-Tobías, H.M. 2010. Características Bioquímico-fiológicas de la germinación y desarrollo de plantas jóvenes de maguey (*Agave*) y su relación con la especie, temperatura y potencial de agua del sustrato. Doctorado en Ciencias. Colegio de Postgraduados.

Ramírez-Villalobos, M. X. 2007. Establecimiento *in vitro* de explantes de maguey mezcalero (*Agave angustifolia* Haw). Tesis de Licenciatura en Ingeniería en Biotecnología. Departamento de Biotecnología y Ciencias Alimentarias, Instituto Tecnológico de Sonora. Cd. Obregón, Sonora.

Rangel-Landa, S. 2009. Germinación y establecimiento de *Agave potatorum* Zucc. en el Valle de Tehuacán: Bases ecológicas para la restauración. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas, Centro de Investigaciones en Ecosistemas, UNAM.

Rivera, B. R. F. 2015. Cultivo *in vitro* con fines de conservación de *Agave victoriae-reginae* T. Moore (Agavaceae), Tesis de Licenciatura en Biología, UNAM, México.

Robert, M. L., Herrera, J. L., Contreras, F., y Scorer, K. N. 1987. *In vitro* propagation of *Agave fourcroydes* Lem.(Henequen). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 8(1): 37-48.

Robert, M. L., Herrera, J. L., Castillo, E., Ojeda, G., & Herrera-Alamillo, M. A. 2006. An efficient method for the micropropagation of agave species. En *Plant Cell Culture Protocols*, pp. 165-178. Humana Press.

Rosales, M. S. D., Solís, Á. G. A., Méndez, N. L. V., y Balch, E. P. M. 2008. Efecto de citocininas en la propagación *in vitro* de agaves mexicanos. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 31(4): 317-322.

Rzedowski, J. 1978. La vegetación de México. Limusa, México. 432 p.

Selvaraj, N., Vasudevan, A., Manickavasagam, M., Kasthuriengan, S., y Ganapathi, A. 2007. High frequency shoot regeneration from cotyledon explants of cucumber via organogenesis. *Scientia Horticulturae*, 112(1): 2-8.

Sánchez-Urbina, A., Ventura-Canseco, L. M. C., Ayora-Talavera, T., Abud-Archila, M., Pérez-Farrera, M. A., Dendooven, L., y Miceli, F. G. 2008. Seed Germination and *in vitro* Propagation of *Agave grijalvensis* an Endemic Endangered Mexican Species. *Asian Journal of Plant Sciences*, 7(8): 752-756.

Sandoval, E., Rojas, A., Guzmán, C., Carmona, L., Ponce, R., León, C., Loyola, C., Vallejo, M. y Medina, A. 2005. Técnicas aplicadas al estudio de la anatomía vegetal (Vol. 38). 1° edición, Cuadernos del Instituto de Biología, IB, UNAM.

Santacruz-Ruvalcaba, F., Gutiérrez-Pulido, H., y Rodríguez-Garay, B. 1999. Efficient *in vitro* propagation of *Agave parrasana* Berger. *Plant cell, tissue and organ culture*, 56(3): 163-167.

Santos, V. J. C. 2009. Micropropagación de *Agave warelliana* (Baker, 1877). Tesis de Posgrado, Facultad de Biología, Universidad Veracruzana.

Sarukhán, J., P. Koleff, J. Carabias, J. Soberón, R. Dirzo, J. Llorente-Bousquets, G. Halffter, R. González, I. March, A. Mohar, S. Anta y J. de la Masa. 2009. Capital natural de México. Síntesis: conocimiento actual, evaluación y perspectivas de sustentabilidad. Conabio, México, D. F. 100 p.

Sato, M., Imanishi, S. y Hiura, I. 1979. *In vitro* plantlet formation from hypocotyl and hypocotyl callus of *Cucumis sativus* L. cv. "Shinko Fushinari No. 10". *Jpn J Breed* 29 (1):33-38.

Semarnat. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. 2010. Norma Oficial Mexicana NOM-059- SEMARNAT-2010. Diario Oficial de la Federación (DOF), jueves 30 de diciembre de 2010.

Silos-Espino, G., González-Cortés, N., Carrillo-López, A., Guevara-Lara, F., Valverde-González, M. E., y Paredes-López, O. 2007. Chemical composition and *in vitro* propagation of *Agave salmiana* 'Gentry'. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 82(3): 355-359.

Tambutti, A. 2002. Diversidad del género *Agave* en México: una síntesis para su conservación. Tesis de Licenciatura en Biología. Facultad de Ciencias, UNAM, México, D.F.

Teixeira, J., Sondahl, N. y Kirby, E. 1993. Somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of oil palm. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 34: 227-233.

Toledo, V. M., y Ordoñez, M. D. J. 1998. El panorama de la biodiversidad de México: una revisión de los hábitats terrestres. *TP Ramamoorthy, R. Bye, A. Lot y J. Fa. (eds.). Diversidad biológica de México: orígenes y distribución. Instituto de Biología, UNAM. México, DF, México, 739-755.*

Torres-Colín, M. L. 1989. Estudio florístico y descripción de la vegetación del Cerro Guiengola, en el Istmo de Tehuantepec, Oaxaca. Tesis de Licenciatura en Biología. Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala, UNAM, México.

Torres-Colín, R. 2004. Tipos de vegetación, pp. 105-117. *En: A. J. García-Mendoza, M. J. Ordóñez y M. Briones-Salas (Eds.). Biodiversidad de Oaxaca. Instituto de Biología, UNAM-Fondo Oaxaqueño para la Conservación de la Naturaleza-World Wildlife Fund, México.*

Valenzuela-Sánchez, K. K., Juárez-Hernández, R. E., Cruz-Hernández, A., Olalde-Portugal, V., Valverde, M. E., y Paredes-López, O. 2006. Plant regeneration of *Agave tequilana* by indirect organogenesis. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 42(4): 336-340.

Vázquez-Díaz, E., García Nava, J. R., Peña Valdivia, C. B., Tobías, R., Hugo, M., y Morales Ramos, V. 2011. Tamaño de la semilla, emergencia y desarrollo de la plántula de maguey (*Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck). *Revista fitotecnia mexicana*, 34(3): 167-173.

Villalobos, V. M. y Thorpe, T. A. 1991. Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. *Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones prácticas. CIAT*, 127-142.

Villaseñor, J. L., & Ortiz, E. 2014. Biodiversidad de las plantas con flores (División Magnoliophyta) en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85: S134-S142.

Walkey, D. 1972. Production of apple plantlets from axillary bud meristems. *Canadian Journal of Plant Science*, 52: 1085-1087.

Wilson, E. O. 1988. Biodiversity. National Academy Press, Washington, D. C. 521 p.

Yadav, P. R. y Tyagi, R. 2006. Biotechnology of Plant Tissues. Discovery Publishing House.

Yáñez, M. M. 2011. Regeneración *in vitro* de *Mammillaria bombycina* Quehl (Cactaceae). Tesis de Licenciatura en Biología. Facultad de Ciencias, UNAM.

Young, T. P., y Augspurger, C. K. 1991. Ecology and evolution of long-lived semelparous plants. *Trends in Ecology & Evolution*, 6(9): 285-289.

Anexos

Anexo 1. Composición del medio de cultivo Murashige y Skoog, 1962. El medio debe ajustarse a pH= 5.7

| Componente | | g/L |
|---------------------------|---|----------|
| Macronutrientes | (NH ₄)NO ₃ | 1.65 |
| | KNO ₃ | 1.9 |
| | MgSO ₄ * 7 H ₂ O | 0.37 |
| | KH ₂ PO ₄ | 0.17 |
| | CaCl ₂ * 2 H ₂ O | 0.44 |
| Micronutrientes | MnSO ₄ * H ₂ O | 0.01689 |
| | ZnSO ₄ * 7 H ₂ O | 0.0086 |
| | H ₃ BO ₃ | 0.0062 |
| | KI | 0.00083 |
| | Na ₂ MoO ₄ * 2 H ₂ O | 0.00025 |
| | CuSO ₄ * 5 H ₂ O | 0.000025 |
| | CoCl ₂ * 6 H ₂ O | 0.000025 |
| FeEDTA | FeSO ₄ * 7 H ₂ O | 0.0278 |
| | Na ₂ EDTA | 0.0373 |
| Vitaminas | Tiamina | 0.0001 |
| | Ac. nicotínico | 0.0005 |
| | Piridoxina * HCl | 0.0005 |
| Inositol | | 0.10 |
| Glicina | | 0.002 |
| Fuente de carbono | Sacarosa | 30 |
| Agente gelificante | Gellan gum | 3.8 |
| | Agar bacteriológico | 8.5 |

Anexo 2. Preparación del fijador Navashin (Sandoval *et al.*, 2005).

| Solución A | |
|---------------------------|------|
| Trióxido de cromo | 1g |
| Ácido acético glacial | 7ml |
| Agua destilada | 92ml |
| Solución B | |
| Formaldehído (37-40% v/v) | 30ml |
| Agua destilada | 70ml |

Anexo 3. Series de deshidratación con TBA (Sandoval *et al.*, 2005).

| TBA 100% v/v (ml) | EtOH 100% v/v (ml) | EtOH 95% v/v (ml) | H ₂ O (ml) | Concentración final (%) | Tiempo (h) |
|----------------------|-----------------------|----------------------|--------------------------|----------------------------|------------|
| 5 | 0 | 30 | 65 | 35 | 24 |
| 10 | 0 | 40 | 50 | 50 | 24 |
| 15 | 0 | 45 | 40 | 60 | 24 |
| 20 | 0 | 50 | 30 | 70 | 24 |
| 35 | 0 | 50 | 15 | 85 | 24 |
| 55 | 0 | 45 | 0 | 95 | 24 |
| 75 | 25 | 0 | 0 | 100 | 24 |
| 100 | 0 | 0 | 0 | 100 | 24 |
| 100 | 0 | 0 | 0 | 100 | 24 |