



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Cultivo *in vitro* con fines de conservación
en *Agave victoriae-reginae* T. Moore
(Agavaceae)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

BETZY ROSAURA RIVERA FUENTES

DIRECTOR DE TESIS:

M. en C. GUILTELE DALIA GOLDHABER
PASILLAS

MÉXICO, D.F.

2015





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Hoja de Datos del Jurado

1. Datos de la alumna
Rivera
Fuentes
Betzy
Rosaura
5677- 5115
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
301128946
2. Datos de la tutora
M. en C.
Guitele Dalia
Goldhaber
Pasillas
3. Datos del sinodal 1
Dr.
Víctor Manuel
Chávez
Avila
4. Datos del sinodal 2
Dra.
Guadalupe
Judith
Márquez
Guzmán
5. Datos del sinodal 3
M. en C.
Mónica Karina
Pérez
Pacheco
6. Datos del sinodal 4
Dr.
Abisaí Josué
García
Mendoza
7. Datos del trabajo escrito
Cultivo *in vitro* con fines de conservación en *Agave victoriae-reginae* T.
Moore (Agavaceae)
152 pp.
2015

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Jardín Botánico del Instituto de Biología en colaboración con el Laboratorio de Desarrollo en Plantas de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México

Agradecimientos

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México el brindarme la oportunidad de ser parte de ella, darme una educación privilegiada y permitirme desarrollarme en mi vida académica y personal a través de sus hermosas instalaciones, laicas y gratuitas. Gracias U.N.A.M.

A la gloriosa Facultad de Ciencias por ser mi hogar y refugio, por darme conocimiento, sabiduría y por incrementar la pasión que siento hacia la biología.

A mi tutora M. en C. Dalia Goldhaber, gracias por guiarme y apoyarme en todo momento, por creer en mi y en mi proyecto, por toda tu paciencia, apoyo y tiempo dedicados en mi trabajo, pero sobre todo gracias por tu hermosa amistad.

Al Dr. Víctor Manuel Chávez por brindarme la oportunidad de pertenecer a su equipo de trabajo, por todo lo que aprendí y por motivarnos con su dedicación hacia la enseñanza, el conocimiento y la conservación de la biodiversidad.

Al Dr. Abisaí García por su amabilidad y accesibilidad para enseñarme y compartir sus conocimientos, por su enorme y magnífica dedicación que tiene hacia los agaves ¡Infinitas gracias!

A la Dra. Judith Márquez le agradezco haberme dejado ser parte de su laboratorio por el tiempo que duró mi trabajo, pero principalmente por ser tan amable, cariñosa y atenta con sus estudiantes. También agradezco a su equipo de trabajo por todo el apoyo y atenciones que recibí.

A la M. en C. Mónica Pérez, gracias por brindarme todas las atenciones necesarias para concluir mi proyecto, por tu cordial sonrisa y tu bella amistad.

A la Biól. Bárbara Estrada gracias por tu disponibilidad otorgada para la realización de este estudio, por ser amable y gentil.

A la Biól. Linda Balcázar por tu generosidad, amabilidad pero sobre todo por tu bella amistad.

A los ilustradores Chantal Ávila, Aldo Meza y al diseñador Bogard Verdiguél, con su talento le dieron color y armonía a mi tesis. Mil gracias equipo ABC. También quiero agradecer a la Psic. Educ. Elizabeth Enríquez por tu tiempo, apoyo y dedicación al leer mi trabajo.

A todos mis compañeros de CTV y del Lab. Desarrollo en Plantas deseo que cumplan sus sueños y sean muy felices.

Finalmente agradezco al hermoso *Agave victoriae-reginae*, juntos hicimos esto, no cabe duda que en verdad eres noble y admirable.

Dedicatoria

¡¡Gracias Mamá!! Te admiro muchísimo, eres una mujer valiente, atenta, inteligente, generosa, cariñosa, luchona y nunca te das por vencida. Siendo viuda lograste salir adelante con tres hijos, gracias por dejarme ser parte de tu familia, de tu hogar y por permitirme ser tú hija. Te amo mamá!! Gracias por creer en mí, por tenerme fe, darme paciencia y llenarme de amor. Carlota Rivera Ramos, eres la mejor madre del Universo.

A mi hermana Alejandra Guasco Rivera por cuidarme desde que era una bebé, por brindarme cariño, hacerme reír, dejarme acariciar a cuánto animal veíamos en las calles y por ser una excelente bióloga. Gracias por abrazarme mucho, mucho, mucho y llenarme de cariño. Al revés te quiero mucho!!

A mi hermano Edgar Guasco Rivera por ser un ejemplo de valentía, entusiasmo, generosidad, astucia e inteligencia. Por defender mis noches de desvelo y por llevarme a los rocosos caminos en el Leoncito, gracias hermano por todas tus atenciones, te quiero mucho!

A mi Tía Sandra Rivera Ramos, Cocada eres una segunda madre para mí, te quiero mucho, gracias por haberme apoyado en todo momento, por consentirme y hacerme reír con tu peculiar y carismático sentido del humor. Te quiero mucho Cocadita.

A mi prima Sandra Ceballos Rivera, “Amo” eres una hermana para mí, te quiero muchísimo, gracias por brindarme tanto cariño, por escucharme, abrazarme, reír y llorar conmigo. Por motivarme, apoyarme y creer en mí. Por introducirme a tus peculiares gustos musicales desde los inicios de Robert Smith hasta los extravagantes Indochine.

A mi primo Luis Arturo González Rivera, “Mikey” eres mi hermano menor, te quiero desde que estabas en el vientre de tu madre Cocadesco je je! Has sido mi compañero de aventuras, desde buscar grillos entre las plantas, hasta acompañarme a las fiestas de Nelly. Te quiero con todo mi corazón, gracias por dejarme sentir como una hermana mayor.

La vida no sería igual sin los amigos, a lo largo de mi vida he encontrado una segunda familia, estrellas hermosas brillantes con colores particulares que iluminan mi vida y la hacen más armoniosa, divertida y espectacular. Gracias amigos por estar conmigo son mi columna vertebral.

- 🌿 Nelly Herrera
- 🌿 Maryfer Ortega
- 🌿 Samuel Rosales
- 🌿 Ángeles Martínez
- 🌿 Ángel Velasco
- 🌿 Ariana Valdés
- 🌿 Mari Huerta
- 🌿 Sergio Vázquez
- 🌿 Danii Balcázar
- 🌿 Elizabeth Enríquez
- 🌿 Ulises Jiménez
- 🌿 Dayzú Quinto
- 🌿 Charlie Nicholson

A mis niñas Gipsy y Negrobi, por hacer del mundo un lugar mejor, lleno de pelos, mimos, amor y puro amor. A Lázaro, te quiero con todo mi corazón y siempre pienso que te voy a volver a ver. A mi hermoso Ruffito que me espera en el puente arcoíris, nos volveremos a ver. Gracias hermosos peludos por darme tanto pero tanto amor, consolarme en los días malos y hacerme sentir más feliz en los días buenos. Los amo!

Finalmente quiero agradecer il mio amore Dr. Alexander Ochoa Hein, gracias por los momentos vividos, por tu sentido del humor ja ja ja!! Pero sobre todo por estar conmigo, por creer en mí, por iluminar mi existencia con tus sonrisas, por hacerme sentir segura entre tus brazos y por amarme de la forma incondicional que lo haces. Por vibrar mi mundo y hacerme volar, contigo no sólo siento mariposas en el estómago, siento pterodáctilos. Te amo mi vida!!

Esta tesis está dedicada a ti Papá **Humberto Marte Rivera Ramos**, sigues y seguirás conmigo siempre ¡Gracias por todo!
Nos volveremos a ver

“Conservamos lo que amamos, amamos lo que
conocemos, conocemos lo que se nos ha enseñado”

Baba Dioum



TABLA DE CONTENIDOS

	Pág.
TABLA DE CONTENIDOS	I
ÍNDICE DE TABLAS.....	V
ÍNDICE DE FIGURAS	VI
RESUMEN	VIII
ABSTRACT	IX
I. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES.....	6
2.1 El género <i>Agave</i> (<i>sensu lato</i>).....	6
2.1.1 Usos más comunes de plantas del género <i>Agave</i>	7
2.1.2 Clasificación taxonómica y descripción del género	9
2.1.3 Subgénero <i>Littaea</i>	10
2.2 <i>Agave victoriae-reginae</i> T. Moore	11
2.2.1 Clasificación taxonómica de <i>A. victoriae-reginae</i> T. Moore	12
2.2.2 Descripción botánica de <i>A. victoriae-reginae</i>	13
2.2.3 Distribución geográfica e importancia ecológica	15
2.2.4 Usos del <i>A. victoriae-reginae</i>	16
2.2.5 Problemática y estado de conservación	16
2.3 Conservación <i>ex situ</i>	18
2.3.1 Jardines Botánicos	18
2.4 Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV)	20
2.4.1 Etapas de la Micropropagación	20
Etapa 0- Selección y preparación de la planta madre	21
Etapa I- Establecimiento de cultivos asépticos	21
Etapa II- Multiplicación.....	22
Etapa III- Enraizamiento	22
Etapa IV- Transferencia a condiciones <i>ex vitro</i> (aclimatización).....	22
2.4.2 Cultivo de Tejidos Vegetales en Agaváceas	25
2.5 Reguladores de crecimiento Vegetal	27

2.5.1 Auxinas.....	28
2.5.2 Citocininas	29
2.5.3 Interacción auxinas-citocininas	30
2.6 Vías de regeneración en CTV	31
a) Embriogénesis somática.	31
b) Organogénesis	32
c) Formación de plantas a partir de yemas axilares.	33
2.7 Oxidación	34
2.8 Hiperhidratación	36
2.9 Fungicidas	37
3. JUSTIFICACIÓN	38
4. OBJETIVOS	39
4.1 General	39
4.2 Particulares	39
5. HIPÓTESIS	40
6. DIAGRAMA CON LA METODOLOGÍA GENERAL	41
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	43
7.1. Material biológico	43
7.1.1 Obtención de explantes.....	43
7.1.2 Desinfección de explantes	43
7.1.3 Disección de explantes.....	45
7. 2 Siembra <i>in vitro</i>	47
7.2.1 Tratamientos para inducir respuestas morfogénéticas.....	47
7.3 Análisis estadístico.....	48
7.4 Exploración morfogénica a partir de callo	48
7.5 Elongación e individualización de los brotes regenerados	48
7.6 Exploración histológica de las etapas tempranas	49
7.6.1 Fijación	50
7.6.2 Deshidratación	50
7.6.3 Inclusión en LR- White	50

7.6.4 Montaje.....	50
7.6.5 Obtención de cortes y tinción	50
7.7 Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)	51
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	52
8.1 Material biológico	52
8.2 Desinfección de los explantes	52
8.3 Siembra <i>in vitro</i>	54
8.4 Contaminación de explantes	55
8.5 Control de oxidación para los cultivos de hoja.....	59
8.5.1 Ápices foliares.....	60
8.5.2 Bases foliares	64
8.6 Inducción a callo	69
8.7 Cultivo de segmentos de Hoja	74
8.7.1 Descripción del callo	75
8.7.2 Organogénesis	82
8.7.3 Embriogénesis somática	85
8.8 Cultivo de segmentos de Tallo.....	90
8.8.1 Organogénesis	91
8.8.2 Embriogénesis somática	93
8.8.3 Proliferación.....	94
8.9 Cultivo de ápice de Raíz	98
8.9.1 Embriogénesis somática	98
8.10 Individualización y enraizamiento de los brotes regenerados	101
8.11 Aclimatización	108
8.12 Histología y morfología de callo embriogénico.....	115
9. CONCLUSIONES.....	122
9.1 Contaminación.....	122
9.2 Oxidación (carbón activado v/s PVP).....	122
9.3 Cultivo a partir de ápices foliares	123
9.4 Cultivos a partir de bases foliares.....	123

9.5 Cultivos a partir de segmentos de tallo.....	124
9.6 Cultivos a partir de segmentos de raíces.....	124
9.7 Individualización y enraizamiento de los brotes regenerados	125
9.8 Aclimatización	125
9.9 Histología y morfología	126
10. PERSPECTIVAS.....	127
11. APÉNDICES.....	128
Apéndice 1.....	128
Apéndice 2.....	129
Apéndice 3.....	130
12. BIBLIOGRAFÍA.....	138

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Posición de México con respecto a otros países megadiversos.....	2
Tabla 2. Número de especies de la familia Agavaceae.	4
Tabla 3. Usos que se les dan a las plantas del género <i>Agave</i>	8
Tabla 4. Micropropagación <i>in vitro</i> del Laboratorio CTV.	24
Tabla 5. CTV en Agaves.	25
Tabla 6. Procedimiento de desinfección para los explantes.	45
Tabla 7. Tratamientos para el cultivo de explantes de hoja, tallo y raíces.	47
Tabla 8. Elongación en los brotes regenerados.	49
Tabla 9. Inclusión de las muestras con LR-White.....	50
Tabla 10. Resultados significativos de contaminación.	56
Tabla 11. Resultados significativos de contaminación de explantes con (BA).	57
Tabla 12. Resultados significativos de contaminación de explantes con (2,4-D)..	58
Tabla 13. Contaminación de explantes (ápice y base foliar, tallo y raíz).	58
Tabla 14. Pruebas estadísticas entre los grupos de antioxidantes	63
Tabla 15. Pruebas estadísticas de antioxidantes hoja región basal.	67
Tabla 16. Efecto de los RCV en la inducción de explantes de bases foliares.....	69
Tabla 17. Efecto de los RCV en la inducción de explantes de ápices foliares.....	71
Tabla 18. Efecto de los RCV en la inducción de explantes de tallo.	72
Tabla 19. Efecto de los RCV en la inducción de explantes de raíz	73
Tabla 20. Medio de cultivo de Murashige y Skoog	128
Tabla 21. Preparación del Fijador Navashin	129
Tabla 22. Prueba estadística Tukey para ápices foliares con BA/2,4-D.	130
Tabla 23. Prueba estadística Tukey para ápices foliares con citocininas (BA). ...	131
Tabla 24. Prueba estadística Tukey para ápices foliares con auxinas (2,4-D)....	131
Tabla 25. Prueba estadística Tukey para bases foliares con BA/2,4-D.	132
Tabla 26. Prueba estadística Tukey para bases foliares con citocininas (BA).	132
Tabla 27. Prueba estadística Tukey para bases foliares con auxinas (2,4-D)....	133
Tabla 28. Prueba estadística Tukey para organogénesis indirecta.....	133
Tabla 29. Prueba estadística Tukey para callo con citocininas (BA).	134
Tabla 30. Prueba estadística Tukey para brotes vía organogénesis indirecta.....	135
Tabla 31. Prueba estadística Tukey para tallo con citocininas (BA).....	136
Tabla 32. Prueba estadística Tukey para tallo con auxinas (2,4-D).....	136
Tabla 33. Prueba estadística Tukey para raíz con auxinas (2,4-D).....	137

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Países megadiversos.	1
Figura 2. Regiones biogeográficas de México.....	3
Figura 3. Estructuras florales subgéneros: <i>Agave</i> y <i>Littaea</i>	9
Figura 4. Algunas especies pertenecientes al subgénero <i>Littaea</i>	10
Figura 5. <i>A. victoriae-reginae</i> creciendo sobre paredes de CaCO_3	11
Figura 6. Ejemplares de <i>A. victoriae-reginae</i>	12
Figura 7. Morfología de <i>A. victoriae-reginae</i> T. Moore.....	14
Figura 8. Distribución geográfica en México de <i>A. victoriae-reginae</i>	15
Figura 9. Fotografías de <i>A. victoriae-reginae</i>	16
Figura 10. Página electrónica que muestra la venta de ejemplares.....	17
Figura 11. Colección de Agaves Jardín Botánico del Instituto de Biología.....	19
Figura 12. Totipotencialidad celular y proceso general del CTV.....	20
Figura 13. Etapas de la micropropagación de CTV.....	23
Figura 14. Estructuras químicas a auxinas naturales y sintéticas.....	29
Figura 15. Concentraciones relativas de auxinas y citocininas.....	31
Figura 16. Vías de regeneración a través del CTV.....	34
Figura 17. Diagrama de flujo del CTV <i>in vitro</i> de <i>A. victoriae-reginae</i>	41
Figura 18. Diagrama de flujo de cortes histológicos.....	42
Figura 19. Selección de explantes provenientes de <i>A. victoriae-reginae</i>	43
Figura 20. Hojas de la parte externa e interna de la roseta <i>A. victoriae-reginae</i> ...	46
Figura 21. Hoja de <i>A. victoriae-reginae</i>	46
Figura 22. Planta completa <i>A. victoriae-reginae</i>	52
Figura 23. Contaminación de explantes sembrados en MS 50%. Ápice foliar.....	55
Figura 24. Contaminación después de 60 días de plantas <i>in vitro</i>	57
Figura 25. Oxidación después de 15 días de explantes <i>in vitro</i>	61
Figura 26. Porcentaje de explantes oxidados de ápices foliares con PVP.....	61
Figura 27. Porcentaje de explantes oxidados de ápices foliares con CA.....	62
Figura 28. Oxidación después de 15 días de explantes <i>in vitro</i> de ápices.....	62
Figura 29. Oxidación después de 15 días de explantes <i>in vitro</i> de bases.....	64
Figura 30. Porcentaje de explantes oxidados de bases foliares.....	65
Figura 31. Oxidación después de 15 días de explantes <i>in vitro</i>	66
Figura 32. Porcentaje de explantes oxidados de bases foliares.....	66
Figura 33. Respuestas de explantes de base foliar.....	70
Figura 34. Respuesta de explantes de ápices foliares.....	71
Figura 35. Respuestas de explantes de tallo.....	72
Figura 36. Resultados de explantes de raíz.....	73
Figura 37. Bases foliares de <i>A. victoriae-reginae</i>	74
Figura 38. Abundancia de callo de explantes de ápices foliares.....	75
Figura 39. Ápices foliares sembrados en MS 50% con PVP (2 g/L).....	76
Figura 40. Explantes de hoja región apical sembrados con CA (1 g/L).....	77
Figura 41. Abundancia de callo de explantes de ápices foliares.....	78

Figura 42. Abundancia de callo de explantes de bases foliares.....	80
Figura 43. Explantes de bases foliares sembradas en MS 50% con PVP.....	80
Figura 44. Explantes de bases foliares sembradas en MS 50% con CA	81
Figura 45. Abundancia de callo de explantes de bases foliares.....	82
Figura 46. Desarrollo de plántulas de <i>A. victoriae-reginae</i>	83
Figura 47. Brotes y plántulas de <i>A. victoriae-reginae</i>	84
Figura 48. Brotes y plántulas de <i>A. victoriae-reginae</i> después de 55 días	84
Figura 49. Embriones somáticos a partir de bases foliares	86
Figura 50. Detalle de los embriones somáticos obtenidos en MS 50%.....	86
Figura 51. Etapas de embriogénesis somática en <i>A. victoriae-reginae</i>	87
Figura 52. Proceso de embriogénesis somática en <i>A. victoriae-reginae</i>	88
Figura 53. Etapa de proliferación	89
Figura 54. Multiplicación y proliferación de plántulas de <i>A. victoriae-reginae</i>	89
Figura 55. Explantes de tallo en MS 50% con carbón activado (1 g/L).	90
Figura 56. Explantes de tallo sembrado en MS 50%.....	91
Figura 57. Explantes de tallo sembrado en MS 50% en inducción.....	92
Figura 58. Embriones somáticos a partir de explantes de tallo	94
Figura 59. Embriones somáticos y plántulas asincrónicas.....	95
Figura 60. Brotes de <i>A. victoriae-reginae</i> vía organogénesis directa	96
Figura 61. Individuos de <i>A. victoriae-reginae</i> vía organogénesis directa.	96
Figura 62. Plántulas de <i>A. victoriae-reginae</i> subcultivados.	97
Figura 63. Brotes y plántulas de <i>A. victoriae-reginae</i> vía organogénesis	97
Figura 64. Cultivos <i>in vitro</i> a partir de raíces de <i>A. victoriae-reginae</i>	98
Figura 65. Callos formados a partir de explantes de raíz.....	99
Figura 66. Embriones somáticos obtenidos a partir de explantes de raíz	100
Figura 67. Efecto de la sacarosa a distintas concentraciones	102
Figura 68. Explantes subcultivados con 15 g/L de sacarosa.	104
Figura 69. Explantes subcultivados con 7.5 g/L de sacarosa	105
Figura 70. Explantes de <i>A. victoriae-reginae</i> subcultivados en MS 50%.	106
Figura 71. Explantes subcultivados con 30 g/L de sacarosa	107
Figura 72. Plántulas de <i>A. victoriae-reginae</i> en MS 50%.	109
Figura 73. Cultivos asincrónicos de <i>A. victoriae-reginae</i> en MS 50% sin RCV.....	109
Figura 74. Proceso de aclimatización: <i>A. victoriae-reginae</i> y <i>A. comiteco</i>	110
Figura 75. Planta aclimatizada de <i>A. victoriae-reginae</i>	111
Figura 76. Planta aclimatizada de <i>A. comiteco</i>	112
Figura 77. Sustrato empleado para la aclimatización de los Agaves.....	113
Figura 78. Callo embriogénico para análisis histológico.	115
Figura 79. Corte longitudinal de callo embriogénico de <i>A. victoriae-reginae</i>	116
Figura 80. Proembrión somático en proceso de división celular.....	117
Figura 81. Corte longitudinal de un embrión somático en etapa globular.....	119
Figura 82. Corte transversal de raíz.	120
Figura 83. Micromorfología de estructuras de callo embriogénico.....	121

RESUMEN

Agave victoriae-reginae es una especie endémica de México de gran importancia ecológica, económica y cultural, pues constituye un grupo de plantas clave por los recursos que otorgan al ecosistema y al ser humano. Los tamaños poblacionales de esta especie han disminuido a causa de la colecta de plantas y semillas para su comercialización ornamental, y a la destrucción de su hábitat natural, del cual se extraen minerales para compañías cementeras. Por esta situación tan crítica, esta especie está catalogada en peligro de extinción por la NOM-059-SEMARNAT-2010 y bajo el estatus de amenazada de acuerdo con CITES, Apéndice II. El objetivo de este trabajo de investigación es explorar las respuestas morfogénicas de diversas estructuras somáticas que controlan el desarrollo de células y tejidos para la regeneración de plantas completas. Se utilizaron explantes de hoja, tallo y raíz, los cuales fueron cultivados en medio Murashige y Skoog (MS) al 50% con 30 g/L de sacarosa, adicionado con polivinilpirrolidona (PVP), carbón activado y diferentes concentraciones de auxina (2,4-D 0, 0.1, 0.5, 1, 2, 3, 4 mg/L) en combinación con diferentes concentraciones de citocinina (BA 0, 0.5, 1, 2, 3 mg/L). Se produjo organogénesis indirecta a partir de explantes de hoja y organogénesis directa a partir de explantes de tallo, así como embriogénesis somática a partir de explantes de hoja. Adicionalmente, se describió el desarrollo ontogénico, morfológico y anatómico *in vitro* de callo embriogénico, primordios foliares y hojas a partir de cortes histológicos y observaciones al microscopio óptico. Con esta investigación se demostró que el Cultivo de Tejidos Vegetales es una herramienta eficaz y viable para la propagación *in vitro* de especies en peligro de extinción. Asimismo, se generó conocimiento para la conservación *ex situ* y aprovechamiento sostenible de *A. victoriae-reginae*.

ABSTRACT

Agave victoriae-reginae is an endemic species to Mexico and it has great ecological, economic and cultural importance because of its key role in contributing with resources to the ecosystem and to humans. Population sizes of this species have declined due to overcollection and marketing of plants and seeds for ornamental purposes and to the destruction of its natural habitat to extract minerals for cement production. As a result of this critical situation, this *Agave* species is listed as an endangered by the Mexican government (NOM-059-SEMARNAT-2010) and as threatened according to CITES Appendix II. The goal of this research is to explore the morphogenetic responses of different somatic structures that control the development of cells and tissues in order to regenerate complete plants. Leaf explants, stems and roots were selected and cultured in 50% Murashige and Skoog (MS) growth medium supplemented with 30 g of sucrose, polyvinylpyrrolidone (PVP), activated charcoal and different concentrations of auxin (2,4-D 0, 0.1, 0.5, 1, 2, 3, 4 mg/L) in combination with different concentrations of cytokinin (BA 0, 0.5, 1, 2, 3 mg/L). Indirect organogenesis, as well as somatic embryogenesis, was produced from leaf explants and direct organogenesis from stem explants. Additionally, the ontogenetic, morphological and anatomical development of *in vitro* embryogenic callus, leaf primordia and leaves through histological sections and light microscopic observations was described. This research demonstrated that Plant Tissue Culture is an effective and viable tool for *in vitro* propagation of endangered species. Also, it generated knowledge for *ex situ* conservation and the sustainable use of *A. victoriae-reginae*.

I. INTRODUCCIÓN

La diversidad biológica es la variabilidad que presentan todos los organismos; es la base hereditaria en todos los niveles de organización, desde los genes en una población local hasta las especies que componen una comunidad (Eguiarte, 2007). La biodiversidad es el resultado de la evolución biológica que ha ocurrido en el tiempo y se manifiesta en la existencia de diferentes formas de vida (Halffter y Ezcurra, 1992). Es posible definir tres niveles de biodiversidad: biogeográfico, ecológico y genético (Mittermeier y Goettsch, 1992).

México es considerado un país “megadiverso”, forma parte del selecto y exclusivo grupo de naciones ricas en biodiversidad. Para algunos autores el grupo lo integran 12 países: Australia, Indonesia, Malasia, India, China, Madagascar, Congo, Brasil, Perú, Ecuador, Colombia y México. Otros, elevan la lista a más de 17, añadiendo a Papúa Nueva Guinea, Sudáfrica, Estados Unidos, Filipinas y Venezuela (CONABIO, 2013) (Figura 1). Estos países en conjunto albergan entre 60 y 70% de la diversidad biológica total del planeta (Mittermeier y Goettsch, 1992).



Figura 1. Países megadiversos tomado de (Mittermeier y Goettsch, 1992; CONABIO, 2013).

México ocupa el quinto lugar en biodiversidad a nivel mundial en términos de riqueza, centros de origen y distribución de una gran variedad de especies (Soberón y Llorente, 1993; Llorente-Bousquets y Ocegueda, 2008; Tabla 1). Esto se atribuye a la combinación de diversos factores, entre ellos, su accidentada orografía compuesta de montañas y valles, su cercanía con los océanos Pacífico y Atlántico, y su historia geológica y evolutiva. Estas características le confieren una gran diversidad de climas, suelos, ecosistemas y especies (Llorente-Bousquets y Ocegueda, 2008).

Tabla 1. Posición de México con respecto a otros países megadiversos (Llorente-Bousquets et al. 2008). *Datos actualizados, Revista Mexicana de Biodiversidad 2013

País	Plantas vasculares	Mamíferos	Aves	Reptiles	Anfibios
Lugar de México	5	3	11*	2	5
Brasil	56,215	648*	1,712	630	779
Colombia	48,000	456	1,815	520	634
China	32,200	502	1,221	387	334
Indonesia	29,375	670*	1,604	511	300
México	23,424	564*	1,150*	864*	376
Venezuela	21,073	353	1,392	293	315
Ecuador	21,000	271	1,559	374	462
Perú	17,144	441	1,781	298	420
Australia	15,638	376	851	880	224
Madagascar	9,505	165	262	300	234
Congo	6,000	166	597	268	216

Aunado a estos factores, México se localiza en la intersección de dos regiones biogeográficas: la Neártica y la Neotropical, creando una zona de transición para una gran variedad de seres vivos con distintas adaptaciones (Figura 2). De tal manera, la riqueza biológica de México está dada por un conjunto de especies de origen boreal, que se distribuyen en las regiones montañosas, con climas templados o fríos, y otra región con especies de afinidad tropical que habitan las partes bajas o medias, con climas cálidos secos o húmedos (Toledo, 1988; Flores et al. 1994; CONABIO, 2013).

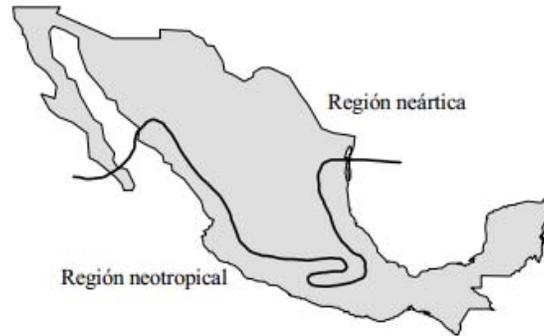


Figura 2. Regiones biogeográficas de México (Flores et al. 1994).

Además, la gran diversidad cultural y etnobiológica que existe en México ha contribuido a incrementar su riqueza natural. México es considerado un importante centro de origen de especies cultivadas y silvestres. Al menos 118 especies de importancia económica, alimenticia, cultural o medicinal fueron domesticadas en nuestro país, principalmente de las familias Cactaceae (16 especies de 4 géneros), Fabaceae (14 especies de 9 géneros), Asteraceae (9 especies de 5 géneros) y Agavaceae (7 especies de 2 géneros) (SEMARNAT, 2012).

Entre las familias de plantas más representativas de México se encuentra las Agavaceae, conformada por nueve géneros que se distribuyen en el continente americano. Nuestro país alberga al 75% (150 especies) de todas las especies de *Agave*, de las cuales el 69% son endémicas (Tabla 2). Este número es notable, tomando en cuenta la gran similitud morfológica y ecológica que tienen la mayoría de las especies del género (Eguiarte et al. 2000).

Tabla 2. Número de especies de la familia Agavaceae (*sensu* Dahlgreen et al. 1983) y su endemismo en México (modificado de García- Mendoza, 2004)

Género	Total de especies	Especies en México	Especies endémicas de México
<i>Agave</i>	200	150 (75%)	104 (69%)
<i>Beschorneria</i>	7	7 (100%)	6 (86%)
<i>Furcraea</i>	25	13 (52%)	8 (61%)
<i>Manfreda</i>	29	28 (96%)	22 (78%)
<i>Polianthes</i>	15	15 (100%)	15 (100%)
<i>Prochyranthes</i>	2	2 (100%)	2 (100%)
<i>Hesperoaloe</i>	5	5 (100%)	4 (80%)
<i>Hesperoyucca</i>	1	1 (100%)	0
<i>Yucca</i>	46	30 (65%)	16 (53%)
Total	330	251 (76%)	177 (70%)

A pesar de los indudables avances de los últimos años tanto en la ciencia como en la tecnología a nivel mundial, nada se ha podido hacer para detener el número creciente de amenazas como incendios forestales, colecta ilegal de plantas, caza indiscriminada de fauna silvestre, construcción de carreteras, desmonte de bosques, por mencionar algunos, los cuales actúan directamente en la naturaleza, dañando considerablemente a un sin fin de especies silvestres. Este hecho indica claramente que no podemos actuar tibiamente; debemos enfrentar con energía e inteligencia los enormes retos que se presentan, dando continuidad y aumento a los esfuerzos de conservación *in situ* y *ex situ*. Empleando una amplia gama de instrumentos y herramientas que nos permitan proteger y aprovechar todos los recursos naturales que existen en nuestro país, lograremos conservar en el largo plazo la megadiversidad de México (Capital Natural de México, 2009).

Desafortunadamente, muchas especies de plantas endémicas están sufriendo los estragos de las distintas actividades antropogénicas que se reflejan en la destrucción del hábitat por el cambio de uso de suelo (tala indiscriminada, ganadería, agricultura, incendios forestales) en respuesta a las necesidades del crecimiento poblacional. Asimismo, la demanda ilegal de ejemplares vegetales (colectas masivas e ilegales de semillas, plántulas y plantas) está poniendo en grave peligro a las poblaciones silvestres. Este es el caso para una gran variedad de especies de Agaváceas endémicas. Por tal razón es necesaria la intervención humana para conservarlas y minimizar los impactos asociados con nuestras actividades (SEMARNAT, 2012; Capital Natural de México, 2009).

El Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV) es una rama multidisciplinaria de ciencias biológicas que genera el conocimiento necesario para promover el crecimiento de la planta, a través del empleo de células, tejidos u órganos aislados de la planta madre y sembrados asépticamente *in vitro* en medios de cultivo (George, 2008). El CTV es ampliamente utilizado para la propagación de diversas especies, como orquídeas, cactáceas, helechos, asteráceas y agaves, cuyos miembros han sido sobreexplotados o bien sus ecosistemas fueron alterados o incluso destruidos, por lo que sus poblaciones se encuentran erradicadas o son vulnerables. De tal forma que la aplicación del cultivo *in vitro* podría prevenir y/o contrarrestar la sobreexplotación de las poblaciones silvestres, permitiendo aprovechar el potencial regenerativo de distintos tejidos, obteniendo así una gran cantidad de individuos a corto y largo plazo (Roca y Mroginski, 1991; Valdés, 2010).

A. victoriae-reginae es una especie endémica de México y es además el emblema del Jardín Botánico del Instituto de Biología de la U.N.A.M. Por desgracia, su hábitat está en constante presión antropogénica. La sobreexplotación del suelo de donde extraen la materia prima para la fabricación de yeso y cemento, así como el saqueo y colecta masiva e ilegal, para apropiarse y lucrar con ella debido a su valor ornamental ha provocado que la especie se encuentre listada en la categoría de peligro de extinción

(NOM-059-SEMARNAT-2010) y también en CITES Apéndice II (CITES, 1995, 2003).

Una de las prioridades para la recuperación y conservación de *A. victoriae-reginae* consiste en implementar técnicas eficientes para su conservación *ex situ*, que servirán de modelo para aplicarla a otras especies de la familia Agavaceae. El CTV es una opción para el uso sostenible y conservación de dichas especies, ya que mantiene una fuente continua de ejemplares aminorando la demanda que sufren las poblaciones silvestres. En la presente investigación se exploró el potencial regenerativo de las hojas, tallos y raíces de plantas silvestres de *A. victoriae-reginae* para poder establecer un protocolo de regeneración, propagación y banco de embriones somáticos. Con esta estrategia se pretende ayudar a mantener una base de plantas para su estudio, conservación y aprovechamiento sostenible; así como un intercambio con otros Jardines Botánicos y Universidades, fomentando un vínculo de investigación dirigido a la educación ambiental y conservación de diversas especies de plantas.

2. ANTECEDENTES

2.1 El género *Agave* (*sensu lato*)

La diversidad de la familia Agavaceae se refleja en el género *Agave*, taxón del que autores como Berger (1915), Trelease (1920) y Gentry (1972; 1978; 1982) han señalado la importancia biológica, ecológica, económica y cultural que tiene en nuestro país. Flores-Abreu (2007) utilizó marcadores de cloroplastos para calcular el origen del género *Agave sensu lato* (*Agave*, *Manfreda*, *Polianthes* y *Prochnyanthes*) y se estima que se originó hace apenas 11.8 millones de años, lo que corresponde al Mioceno tardío y medio, coincidiendo con la orogenia de la Faja Volcánica Transmexicana (Marshall y Liebherr, 2000).

Su nombre fue utilizado por primera vez en 1753 por el botánico sueco Carlos Linneo en su obra "*Species Plantarum*" en la cual el género estaba integrado únicamente por cuatro especies. La palabra *Agave* proviene del griego *αγανή*, que significa "distinguido, noble o admirable" (Gentry, 1982). Una leyenda indica que el nombre *Agave* proviene de la palabra griega *Ague*, que de acuerdo a la mitología griega, era la hija de Cadmus, fundador y rey de la ciudad de Tebas y su esposa Harmonia (Starr, 2012).

Ramírez (1936) consideró al Altiplano Mexicano como el centro de distribución de *Agave*, reconociendo que las llanuras centrales y la subregión caliente del sur de la Mesa Central (Puebla y Morelos) es donde se encuentra la mayor riqueza de especies, la cual disminuye considerablemente al sur del Istmo de Tehuantepec, así como hacia Sonora y Baja California. También indica que probablemente el género migró en diversos períodos geológicos hacia las islas del Caribe, las Antillas y las Bahamas. México es considerado el centro de origen, distribución y especiación del género *Agave* (Álvarez, 1987; García-Mendoza, 1998). El área de mayor diversidad se encuentra en el valle de Tehuacán-Cuicatlán ubicado entre los estados de Puebla y Oaxaca con 15 especies seguido por la Barranca de Meztitlán en el estado de Hidalgo con 11 especies (García-Mendoza 1998; 2002; 2007; Rocha-Munive et al. 2005; 2006; Álvarez-Zayas, 1995).

2.1.1 Usos más comunes de plantas del género *Agave*

En la actualidad, el aprovechamiento de las especies abarca toda una gama de categorías, pero sobresale su empleo como fuente de fibras duras, alimento, medicina, ornato, construcción, forraje, cercas vivas, jabón, actividades religiosas, extracción de bebidas fermentadas como el pulque y destiladas como el mezcal. Palma (1991; 1998) menciona los principales usos de los magueyes de Oaxaca e indica los numerosos nombres comunes que reciben. En la Tabla 3 se enlistan algunos de los usos más comunes del género, así como las estructuras de las plantas que son aprovechadas. La obtención de mezcal es la actividad agroindustrial más importante e involucra a ocho especies de *Agave* cultivados o silvestres (García-Mendoza, 2004).

Tabla 3. Usos que se les dan a las plantas del género *Agave* (García-Mendoza, 1993; 1995; 2004; Gentry, 1972; 1978; 1982)

Categoría	Estructura de la planta utilizada	Especies
Alimento	Tallos, base de las hojas, pedúnculo floral, flores	<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> y <i>A. seemanniana</i> .
Bebidas fermentadas (aguamiel y pulque)	Jugos de tallos y hojas	<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> y <i>A. salmiana</i> var. <i>salmiana</i> .
Bebidas destiladas (mezcal)	Jugos de tallos y base de hojas cocidos	<i>A. americana</i> var. <i>americana</i> , <i>A. americana</i> var. <i>oaxacensis</i> , <i>A. angustifolia</i> var. <i>angustifolia</i> , <i>A. convallis</i> , <i>A. karwinskii</i> , <i>A. marmorata</i> , <i>A. potatorum</i> , <i>A. rodhacantha</i> y <i>A. seemanniana</i> .
Medicina	Hojas: cutículas, jugos	<i>A. americana</i> , <i>A. angustiarum</i> , <i>A. marmorata</i> y <i>A. potatorum</i> .
Fibras	Hojas	<i>A. americana</i> var. <i>americana</i> , <i>A. americana</i> var. <i>oaxacensis</i> , <i>A. angustiarum</i> , <i>A. angustifolia</i> var. <i>angustifolia</i> , <i>A. angustifolia</i> var. <i>rubescens</i> , <i>A. convallis</i> y <i>A. horrida</i> .
Construcción	Pedúnculo floral, hojas	<i>A. americana</i> , <i>A. angustifolia</i> , <i>A. atrovirens</i> , <i>A. marmorata</i> y <i>A. salmiana</i> .
Forraje	Inflorescencias, hojas	<i>A. americana</i> , <i>A. angustifolia</i> , <i>A. atrovirens</i> , <i>A. ghiesbrechtii</i> , <i>A. karwinskii</i> , <i>A. macroacantha</i> , <i>A. rhodacantha</i> , <i>A. salmiana</i> , <i>A. scaposa</i> y <i>A. stricta</i> .
Ornato	Planta completa, inflorescencias	<i>A. americana</i> "Marginata", <i>A. victoriae-reginae</i> , <i>A. angustifolia</i> , <i>A. applanata</i> , <i>A. dasyliroides</i> , <i>A. guiengola</i> , <i>A. isthmensis</i> , <i>A. macroacantha</i> , <i>A. salmiana</i> y <i>A. stricta</i> .
Cercas vivas	Planta completa	<i>A. americana</i> , <i>A. angustiarum</i> , <i>A. angustifolia</i> , <i>A. ghiesbrechtii</i> , <i>A. karwinkiii</i> , <i>A. macroacantha</i> y <i>A. stricta</i> .
Combustible	Planta completa seca	<i>A. americana</i> , <i>A. angustifolia</i> , <i>A. karwinsii</i> , <i>A. salmiana</i> y <i>A. stricta</i> .

2.1.2 Clasificación taxonómica y descripción del género

En función de su estructura floral, Gentry (1982) dividió al género *Agave* en dos subgéneros: *Littaea*, caracterizado por su inflorescencia espigada o racemosa y *Agave* con inflorescencias paniculadas (ramificadas) (Figura 3) (Good-Avila et al. 2006; Flores-Abreu, 2007; Irwin-Smith et al. 2008).



Figura 3. Estructuras florales: **a)** Subgénero *Agave* inflorescencia ramificada y **b)** Subgénero *Littaea* inflorescencia espigada (CONABIO, cartel México Tierra de Magueyes).

2.1.3 Subgénero *Littaea*

Se distribuye desde los estados de Utah, Nevada y Arizona en Estados Unidos hasta Guatemala y tiene alrededor de 53 especies. En México la mayoría de los agaves de este subgénero crecen en altitudes superiores a los 1,000 m aunque también se desarrollan al nivel del mar y hasta los 2,500 m tanto en bosques de *Pinus-Quercus* como en selvas bajas caducifolias y matorrales xerófilos. Algunas especies como *A. attenuata* y *A. warelliana* colonizan bosques mesófilos de montaña, mientras que otras, como *A. lechuguilla*, se encuentran muy bien adaptadas a las partes más secas del altiplano en el norte del país (Gentry, 1982).

El subgénero está prácticamente restringido a México, por lo que probablemente se puede considerar como su centro de origen. La gran abundancia de especies del subgénero en las cadenas montañosas puede indicar que este sistema montañoso desempeñó un papel fundamental en su especiación, evolución y diversificación (García-Mendoza, 1993). En la Figura 4 se aprecian algunos representantes del subgénero.



Figura 4. Algunas especies pertenecientes al subgénero *Littaea*: **a)** *A. albopilosa* (Agave de pelo blanco), **b)** *A. stricta* (Agave erizo o rabo de león) y **c)** *A. titanota* (Maguey cachitún).

2.2 *Agave victoriae-reginae* T. Moore

Esta especie fue descrita en 1753 por el botánico inglés Thomas Moore, quien en este mismo año publicó un artículo en la célebre revista científica británica *The Gardeners Chronicle* (Vol. 4: 485-1875). Su epíteto científico fue en honor a la reina Victoria de Inglaterra (Starr, 2012).

A. victoriae-reginae es una especie endémica de México, pertenece al subgénero *Littaea* pues tiene una inflorescencia sin ramificaciones aparentes (Figura 5a). Pertenece al grupo Marginatae por el margen córneo que presentan las hojas, característica que le brinda una singular belleza y por la cual es altamente apreciada como planta ornamental. Esta planta crece en sustratos de carbonato de calcio (CaCO_3), usualmente en paredes verticales (Figura 5b) (Gentry, 1982), entre los 1,200 y 1,500 m de altura (Starr, 2012).

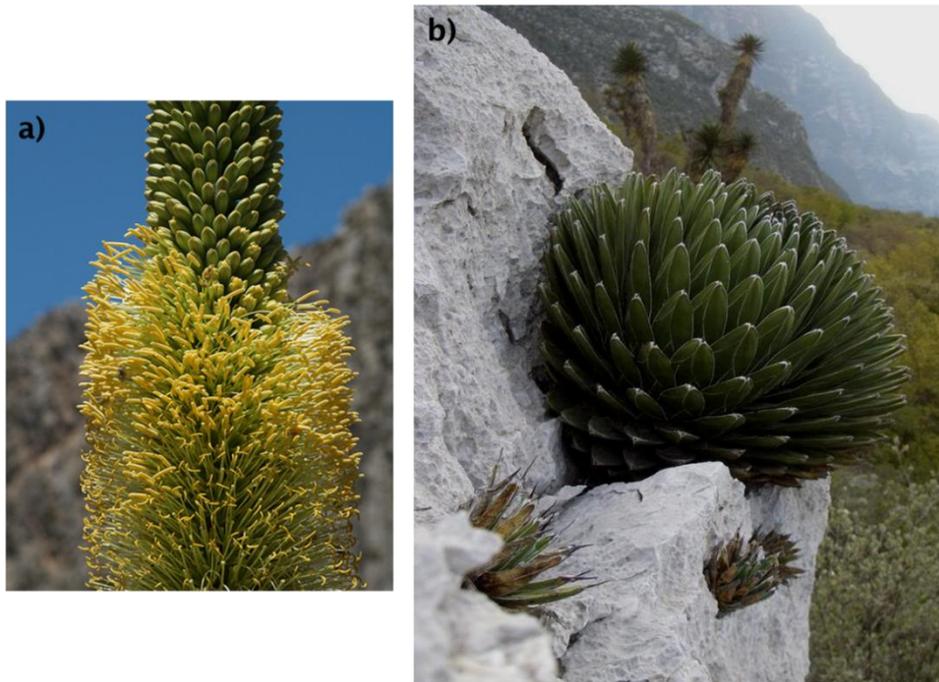


Figura 5. a) *A. victoriae-reginae* creciendo sobre paredes de CaCO_3 y **b)** Pedúnculo floral espigado con brotes de inflorescencias amarillas.

2.2.1 Clasificación taxonómica de *A. victoriae-reginae* T. Moore

Reino Viridiplantae

División Magnoliophyta

Clase Liliopsidae

Subclase Liliidae

Orden Asparagales

Familia Agavaceae

Subfamilia Agavoideae

Género *Agave* L.

Subgénero *Littaea*

Grupo Marginatae

Especie *Agave victoriae-reginae* T. Moore (1875)

Sinonimias:

Agave consideranti Carr. (1875).

Agave fernandi-regis A. Berger (1915).

Agave nickelsii Gosselin (1895).

Nombre común: Noa



Figura 6. Ejemplares de *A. victoriae-reginae*.

2.2.2 Descripción botánica de *A. victoriae-reginae*

La siguiente descripción está basada en la versión original de *Agaves of Continental North America*: plantas pequeñas, compactas, solas a cespitosa (Gentry, 1982). “Tallo corto sin ramificaciones, variable entre la edad de la planta. Hojas pequeñas y verdes, con líneas blancas, conspicuas, por lo general son estrechamente imbricadas, de 15 a 20 cm de largo (menos de 25 cm) por 4.6 cm de ancho, línea ovalada y redondeada en el ápice, rígidas, gruesas, de planas a cóncavas en la parte superior y redondeadas a afiladas en la parte inferior de la quilla. El margen de las hojas es blanco, endurecido, sin dientes, 2-5 mm de ancho, continuo hasta la base. Espinas terminales de 1-3, 1.5-3 cm de longitud, triangular-cónicas, subuladas, anchas en la base; las espinas suelen presentar una coloración negra. Pedúnculo floral de 3-5 m de alto. Inflorescencia en racimos cortos, erectos y densamente cubierto de flores. Brácteas en la mitad apical del pedúnculo y atenuadas en forma delta. Flores presentes de manera densa de la mitad hacia el ápice, el pedúnculo con brácteas cartáceas, las cuales se encuentran en pares o triadas sobre pedicelos cortos de 40-46 mm de longitud; presentan una variedad de colores, los tépalos y estambres frecuentemente teñidos de rojo o púrpura. Tépalos de 18-20 por 5-6 mm, lineares, en el ápice son redondos y extendidos, los filamentos cerrados al término de la antesis y erectos, el interior fuertemente aquillado. Estambres con filamentos de 45-50 mm de longitud, insertados sobre un tubo circular. Ovario fusiforme y grueso con cuello corto, puede medir de 18 a 24 mm de longitud. Anteras erectas con filamentos que llegan a medir entre 18-21 mm de largo, en color amarillo o bronce, excéntricas. Frutos miden 17-20 por 10-13 mm, redondas en la base y apiculadas. Semillas miden 3-5 por 2.5-3.5 mm, hemisféricas o lacrimiformes, venoso sobre las caras con el margen alado”. Esta especie es diploide $2n = 60$ con bajos niveles de clonalidad (Bhattacharyya, 1968). La Figura 7 se muestra algunas características taxonómicas previamente mencionadas.

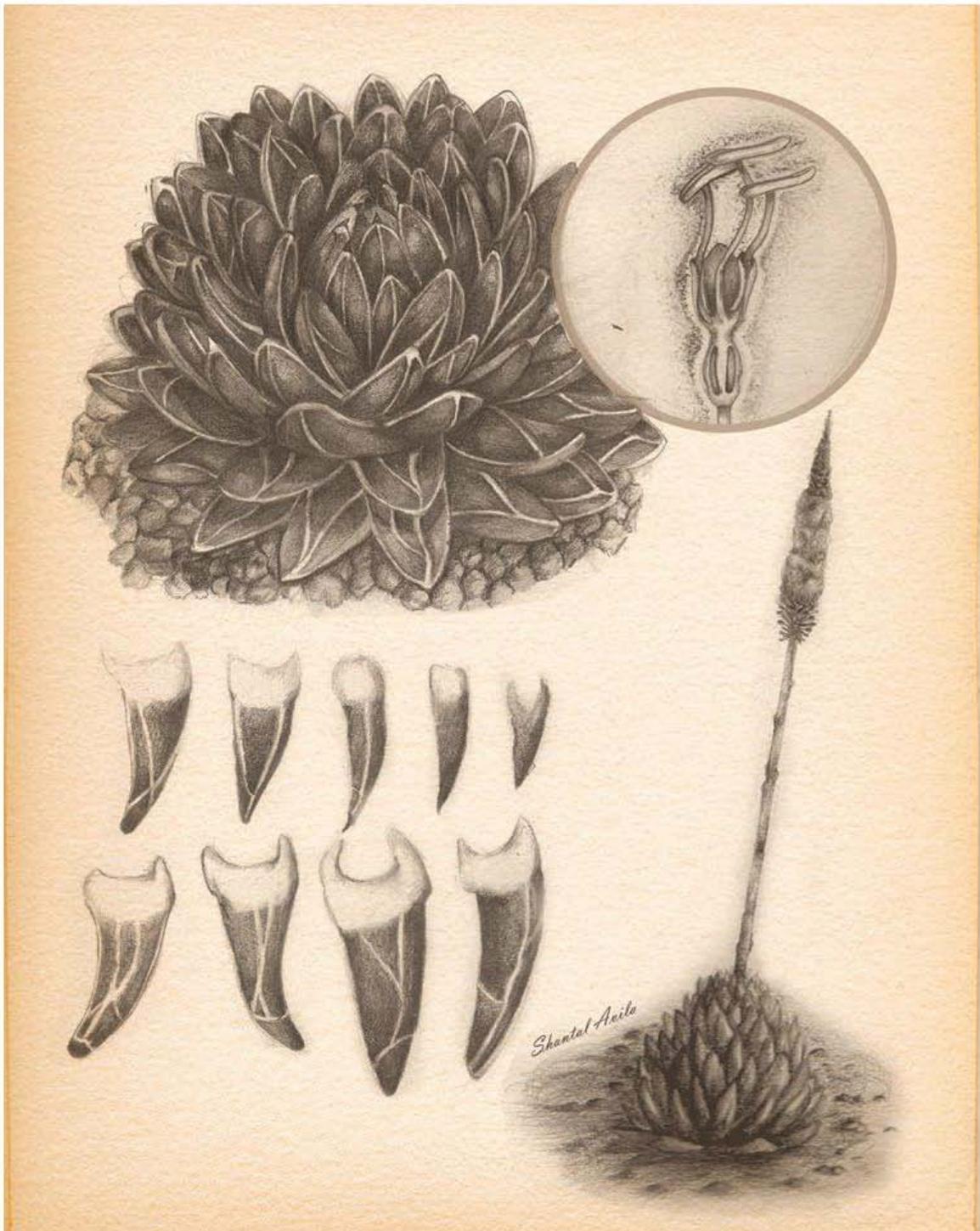


Figura 7. Morfología de *A. victoriae-reginae* T. Moore (Ávila, 2015).

2.2.3 Distribución geográfica e importancia ecológica

A. victoriae-reginae es endémica del desierto Chihuahuense con una distribución discontinua. Se localiza en contadas poblaciones de los Estados de Coahuila, Durango y Nuevo León (Gentry, 1982; Figura 8).

Una de las más famosas localidades de esta especie se encuentra en el Cañón de la Huasteca, cerca de Monterrey. Otra área donde se pueden apreciar los ejemplares creciendo en las laderas del Cañón Ventanillas, Coahuila (Starr, 2012).

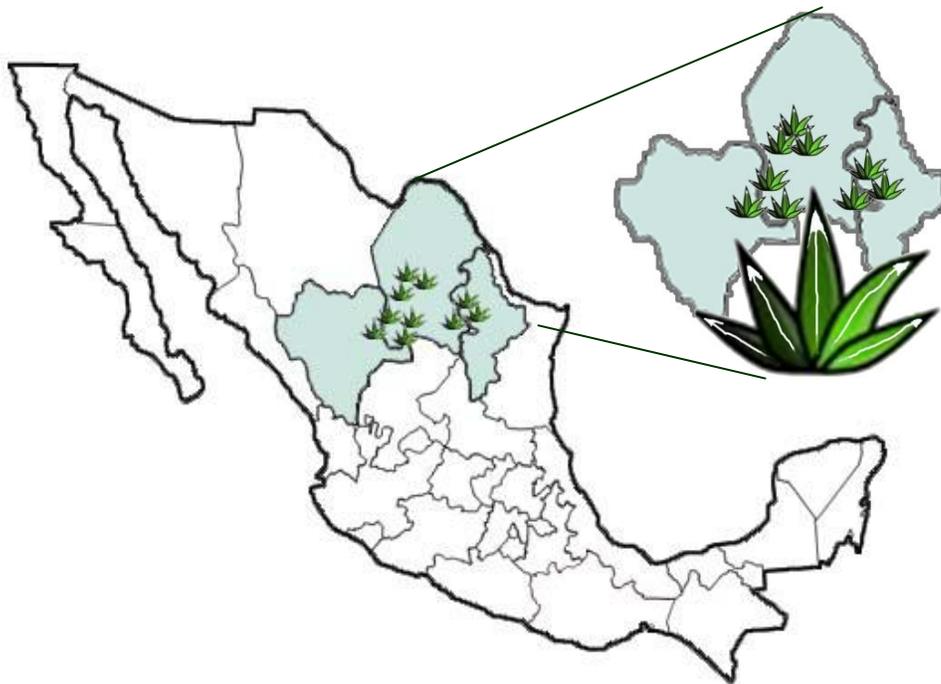


Figura 8. Distribución geográfica en México de *A. victoriae-reginae*, las zonas con agaves muestran localidades de los estados de Durango, Coahuila y Nuevo León que pertenecen al desierto Chihuahuense (Martínez-Palacios et al. 1999; 2003).

2.2.4 Usos del *A victoriae-reginae*

Martínez-Palacios (1998) obtuvo información muy valiosa de los habitantes de las diferentes regiones donde se distribuye esta especie. Los pastores ocasionalmente consumen el quiote, masticándolo y extrayéndole los azúcares. Hace más de 50 años utilizaban al Noa para la fabricación de productos textiles como cuerdas y lazos para los jinetes.

A nivel mundial es considerada una de las plantas ornamentales más bellas (Figura 9).



Figura 9. Fotografías reflejando sus atributos ornamentales de distintitos individuos de *A. victoriae-reginae*.

2.2.5 Problemática y estado de conservación

A. victoriae-reginae es una de las especies del género *Agave* ornamentalmente más populares. Las plantas adultas se comercializan en altos precios en muchos países (Martínez-Palacios, 1998). En algunos sitios de internet es posible adquirir semillas y plantas, cuyo precio varía dependiendo del tamaño, color y buen estado de las plantas. En Estados Unidos de América, algunos ejemplares de talla pequeña llegan a costar desde USD 7.95 hasta 59.95 (Figura 10; <http://www.ebay.com/itm/Agave-victoria-reginae-/251499786040>), mientras que los ejemplares adultos se comercializan hasta en 500 USD. Debido a esto, la tasa comercial de colección ilegal ha sido muy alta, provocando que sea una de las pocas especies de *Agave* que se encuentre

listada bajo el estatus de amenazada (Anonymous, 1994), en la categoría de peligro de extinción (P*) por la NOM-059-SEMARNAT-2010 y listada en CITES Apéndice II (CITES, 1995), el cual indica que esta especie no necesariamente se encuentra en peligro de extinción, pero si no se controla su comercio podría llegar a estarlo (CITES, 2003). Por esta razón es importante aplicar técnicas eficientes para su conservación y una de ellas es la herramienta de Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV). Las propuestas de conservación en nuestro país y a nivel mundial han surgido como respuesta a la crisis ambiental y a la desaparición masiva de especies y ecosistemas en general. Por lo tanto, las estrategias para la conservación de las especies deben basarse en al menos dos perspectivas: 1) el conocimiento demográfico del crecimiento y disminución de las poblaciones y 2) el mantenimiento de su diversidad genética (Ackerman, 1998). De esta manera, la conservación de las especies ha de seguir dos estrategias fundamentales: la conservación *in situ* y *ex situ* et al. Falk (1991).

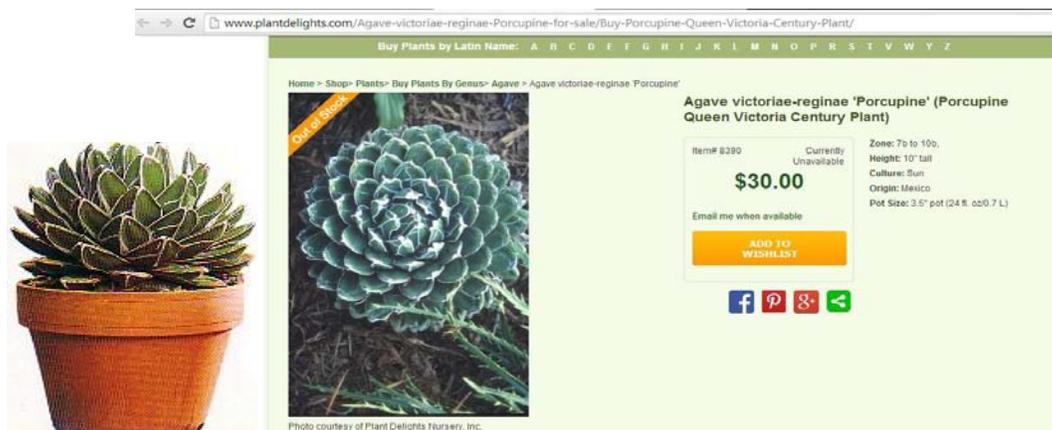


Figura 10. Página electrónica que muestra la venta de ejemplares de *A. victoriae-reginae* con 10 cm de alto a 30 dólares. Es importante mencionar que se encuentran agotados.

2.3 Conservación *ex situ*

Incluye diversas estrategias implementadas fuera del hábitat y áreas de distribución natural de las especies, permiten la conservación de muestras altamente representativas de la biodiversidad vegetal en espacios o volúmenes reducidos (Hernández, 1994). En México destacan los bancos de germoplasma y jardines botánicos.

2.3.1 Jardines Botánicos

A nivel mundial los jardines botánicos juegan un papel muy importante en el desarrollo de las políticas y las acciones encaminadas a la conservación de la diversidad vegetal y propagación de plantas con fines científicos, en donde sus objetivos se ven complementados con la investigación, la educación y la difusión (Franco, 1995). Actualmente existe el *Botanic Gardens Conservation International* (BGCI), que se ha convertido en una organización independiente de gran importancia internacional, ya que trabaja para salvar y conservar a la flora más vulnerable así como para mantener la biodiversidad vegetal a nivel mundial. El BGCI vincula a más de 800 jardines botánicos e instituciones relacionadas con la botánica, provenientes de más de 120 países. En México existen actualmente alrededor de 40 jardines botánicos, 22 de los cuales tienen dentro de sus colecciones al menos un género de la familia Agavaceae y en especial 115 especies pertenecientes a el género *Agave* (Franco, 1995).

En conjunto, los jardines botánicos mantienen en sus colecciones vivas ejemplares representantes de más de 5,000 especies de flora de México, muchas de ellas endémicas y amenazadas o en alguna categoría de riesgo (CONABIO, 2008). Este es el caso del Jardín Botánico del IB-UNAM (Figura 11), el cual tiene la colección de plantas vivas más grande e importante de México, con más de 1,200 especies de plantas mexicanas y tres colecciones nacionales: Agaváceas, Crasuláceas y nopales silvestres. En la colección de Agavaceas, se encuentran 400 especies aproximadamente el 80% de la diversidad total en México (Caballero, 2012).



Figura 11. Colección de Agaves Jardín Botánico del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México (IBUNAM, México, Distrito Federal).

Existe un progreso considerable en el área de investigación para fomentar y establecer protocolos para la conservación *ex situ* de agaves, particularmente en lo que se refiere a bancos de semillas y técnicas de micropropagación. Por desgracia, no siempre pueden conservarse especies por medio de las semillas, por eso es vital utilizar el Cultivo de Tejidos Vegetales como una estrategia en su conservación.

2.4 Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV)

El CTV genera conocimiento a través del uso multidisciplinario de diferentes técnicas de biología celular y molecular, fisiología, bioquímica e histología vegetal y taxonomía, permitiendo el cultivo de células, tejidos u órganos vegetales aislados de la planta madre (George et al. 2008), sembrados bajo condiciones asépticas en un medio de composición químicamente definido e incubados en condiciones ambientales controladas (Roca y Mroginski, 1993). La base teórica del cultivo de tejidos, está ligado al descubrimiento de la célula y de la teoría celular; mediante estos postulados se estableció que cada célula es autónoma. El botánico austriaco Gottlieb Haberlandt (1902) definió el concepto de totipotencialidad, señalando el punto fundamental del cultivo *in vitro* (Thorpe, 2007; Loyola-Vargas et al. 2006, Valdés 2010; Figura 12).

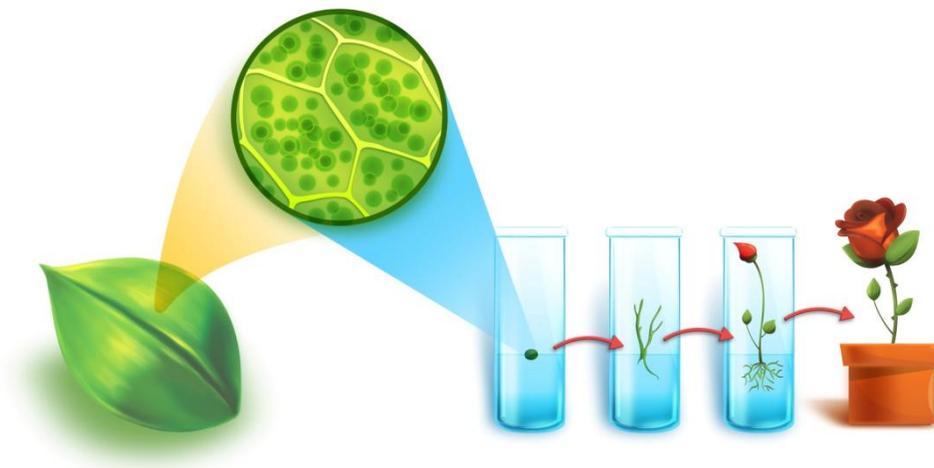


Figura 12. Totipotencialidad celular y proceso general del CTV (Meza, 2014).

2.4.1 Etapas de la Micropropagación

El proceso se divide en cinco etapas, cada una con puntos esenciales de los que dependerá un proceso eficiente de regeneración *in vitro* (George et al. 2008; Figura 13).

Etapa 0- Selección y preparación de la planta madre

La elección de un explante apropiado constituye el primer paso para el establecimiento de los cultivos. En primera instancia, dicha elección está determinada por el objetivo perseguido y la especie vegetal en estudio (Roca y Mroginski, 1993); la planta madre seleccionada debe ser un individuo que represente las características de la especie a cultivar y, además, no poseer síntomas de enfermedad o senescencia en aquellas que son iteróparas. Previo a la micropropagación pueden aplicarse tratamientos en contra de plagas y microorganismos nocivos (George et al. 2008). En relación con la especie vegetal utilizada, es importante tener en cuenta la variabilidad asociada con el genotipo de las plantas (Roca y Mroginski, 1993).

Etapa I- Establecimiento de cultivos asépticos

Los explantes deben someterse a un proceso de desinfección tanto superficial como sistémico que elimine los contaminantes que poseen pero que no reduzca la viabilidad del tejido. Esto es necesario porque en el medio de cultivo pueden crecer microorganismos, principalmente bacterias y hongos, los cuales competirán ventajosamente con el explante (Roca y Mroginski, 1993). La selección, concentración y tiempo de desinfección se determinan, en gran medida, por las características del explante. En la práctica se establecen experimentalmente por ensayo y error (Roca y Mroginski, 1993). Es importante considerar el hecho de que el aislamiento de un tejido u órgano del resto de la planta provoca un estado de estrés que altera su metabolismo celular y, en forma importante, su balance hormonal. Por lo tanto, un buen explante es aquel cuyas células sobreviven en una alta proporción a la descomposición antes señalada y que luego responde eficientemente a las condiciones *in vitro* (Roca y Mroginski, 1993).

Etapa II- Multiplicación

La finalidad de esta etapa es generar las estructuras o propágulos adecuados que al ser individualizados, sean capaces de formar plantas completas o bien, mantener un nuevo ciclo de multiplicación (George et al. 2008).

Etapa III- Enraizamiento

El proceso de enraizamiento en los brotes propagados *in vitro* requiere generalmente el trasplante a un medio de cultivo con menor concentración de sales (Roca y Mroginski, 1993). Debido a que las plantas provenientes de la etapa II no son capaces de sobrevivir por sí mismas, en caso de ser transferidas a tierra u otro sustrato, la etapa III permite hacerlas independientes de una fuente de carbohidratos, por lo que aquí se incluye una fase de enraizamiento (George et al. 2008).

Etapa IV- Transferencia a condiciones *ex vitro* (aclimatización)

Debido a que los tallos son producidos en condiciones de alta humedad y baja intensidad lumínica a menudo la cutícula de las hojas es más delgada y los estomas son poco funcionales o están atrofiados, por lo cual las plantas cultivadas *in vitro* se deshidratan rápidamente cuando son transferidas a condiciones *ex vitro*. Lo anterior enfatiza la necesidad de hacer un cambio paulatino de las condiciones *in vitro* a *ex vitro*, tanto nutricionales, de humedad y luz que permita a las plantas sobrevivir en condiciones naturales, proceso denominado como aclimatización (George et al. 2008; Valdés, 2010).

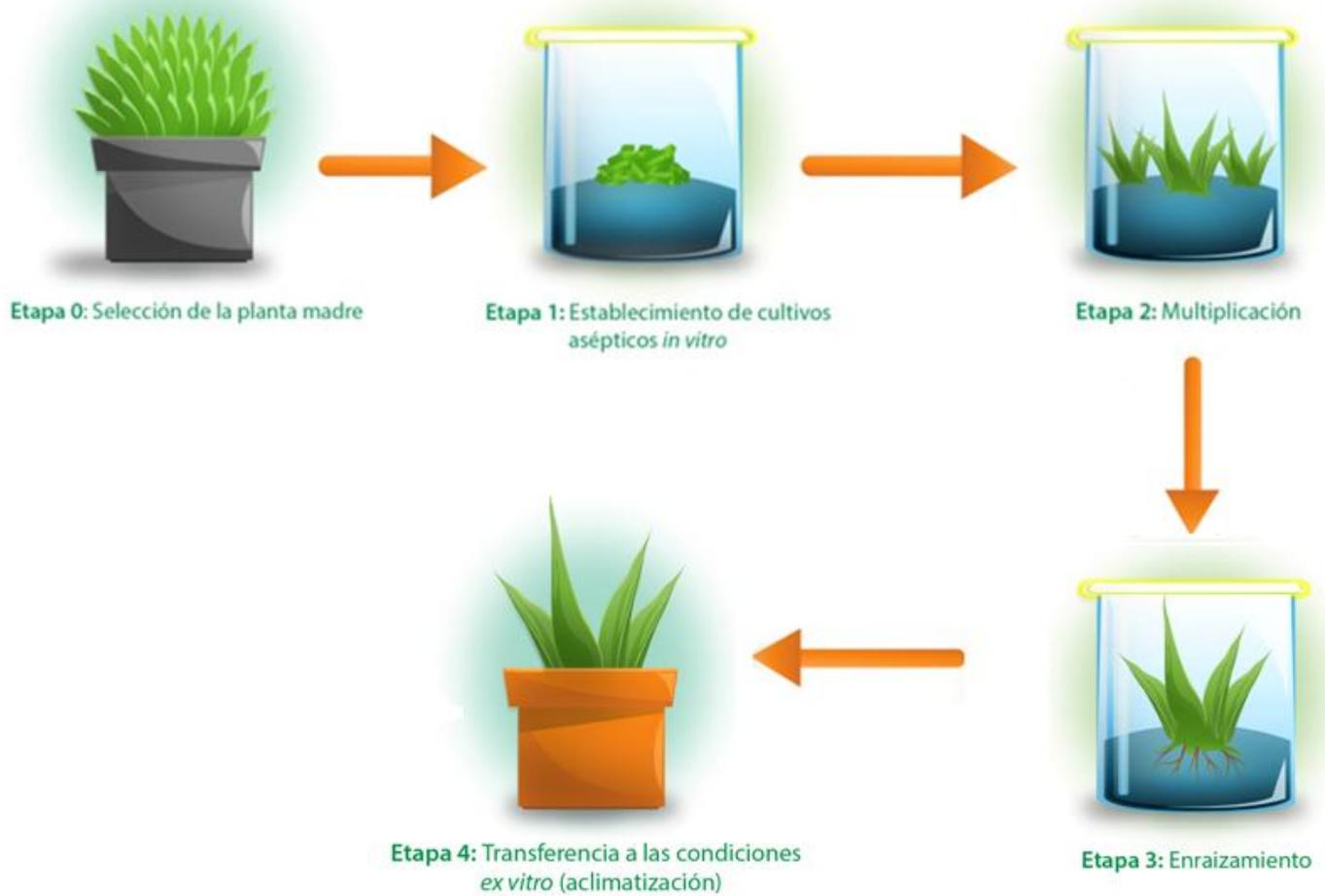


Figura 13. Etapas de la micropropagación de CTV (Meza, 2015).

En el laboratorio de CTV del Jardín Botánico del Instituto de Biología, U.N.A.M. se han llevado a cabo distintos proyectos con una gran variedad de plantas en el que se han abordado las distintas etapas de micropropagación *in vitro* (Tabla 4).

Tabla 4. Proyectos de micropropagación *in vitro* realizados en el Laboratorio CTV del Jardín Botánico IBUNAM

Especie	Explante	Medio de Cultivo	Combinación de RCV	Respuesta morfogénica	Referencia
<i>Aporocactus Flagelliformis</i>	Tallos jóvenes	MS 50%	ANA/BA	C B	Lara, 2010
<i>Cephalocereus apicicephalium</i>	Semillas	MS 50%	ANA/BAP/	C B	Saucedo, 2006
<i>Ceratozamia mexicana</i>	Megagametofitos, embriones cigóticos y hojas inmaduras	Litz	Kin/2,4-D	ES	Chávez, 1993
<i>Dahlia brevis</i> y <i>D. tenuicaulis</i>	Yemas apicales, nudos, hojas inmaduras y secciones de entrenudos	MS 50%	Kin/BA/ 2,4-D	C B	Valdés, 2010
<i>Euchile mariae</i>	Semillas	MS 50%	ANA/BA	PLB'S B	Suárez, 2006
<i>Laelia gouldiana</i>	Semillas	MS 50%	ANA/BA	PLB'S B	Gómez, 2009
<i>Ligusticum porteri</i>	Semillas	MS 50%	ANA/BA/2,4-D	C B	Goldhaber, 2008.
<i>Mammillaria hernandezii</i>	Semillas	MS 50%	ANA/BA	B	Pérez, 2015
<i>M. theresae</i>	Semillas	MS 50%	ANA/BA	C B	Ronquillo, 2009
<i>Picea chihuahuana</i>	Semillas	Litz	BA/K/ANA/2,4-D	C B	Mata, 2000
<i>Prosthechea chacaoensis</i>	Semillas	MS 50%	ANA/BA	B	Alvarado, 2011
<i>Taxus globosa</i>	Acículas y tallos jóvenes	Tax-2	ANA/BAP/2,4-D	C	Martínez, 2011
<i>Vanilla planifolia</i>	Tallos	MS 50%	ANA/BAP	B	Rojas, 2007

Abreviaturas: MS: Murashige y Skoog, C: Callo, B: Brotes, ES: Embriones somáticos y PLB'S: Protocorm-like bodies (Cuerpos parecidos a protocormos).

2.4.2 Cultivo de Tejidos Vegetales en Agaváceas

El CTV es una opción viable ante la problemática que enfrentan los agaves mexicanos y para eso basta observar la Tabla 5, que muestra el cultivo y estudio de numerosos trabajos con agaves mexicanos.

Tabla 5. Protocolos de CTV en varias especies de *Agave*

Especie	Explante	Medio de cultivo	RCV	Respuesta morfológica	Referencia
<i>Agave</i> sp.	Semillas	LS	2,4-D/ Kin	C OI	Groenewald 1977
<i>Agave</i> sp.	Semillas	MS	IAA/Kin	OI	Madrigal et al. 1989
<i>A. amaniensis</i>	Hoja	MS	2,4-D/ Kin	C	Sri Andrijany, 1999
<i>A. angustifolia</i>	Tallo	MS	BA	OD	Enríquez del Valle et al. 2005
<i>A. arizonica</i>	Base foliar	MS	NAA/BA	OI	Powers et al. 1989
<i>A. atrovirens</i>	Yemas laterales	MS	IAA/Kin/ BA	OD	Villalobos et al. 1991
	Cámbium vascular	MS	IAA/Kin	OI	
<i>A. coniala</i>	Estolones	MS	NAA/IBA/ Kin	OD	Binh et al. 1990
<i>A. fourcroydes</i>	Rizoma	SH	2,4-D/BA	OI	Robert et al. 1987

Especie	Explante	Medio de cultivo	RCV	Respuesta morfogénica	Referencia
<i>A. fourcroydes</i>	Semillas	MS	IAA/Kin	OI	Madrigal et al. 1981
<i>A. parrasana</i>	Base foliar	MS	BA/2,4-D	OI	Santacruz et al. 1999
<i>A. sisalana</i>	Rizoma	SH	BA	ED	Das, 1992
	Hojas jóvenes	MS	BA	Sin respuesta	
<i>A. sisalana</i>	Base foliar	MS SH	BA/Kin/ NAA/2,4-D	OI	Nikam, 1997
<i>A. tequilana</i>	Semillas	MS	IAA/Kin	OI	Madrigal et al. 1990
<i>A. tequilana</i>	Tallo	MS	2,4-D/ BA/Kin	EI	Portillo, 2007
<i>A. vera-cruz</i>	Tallo	MS	2,4-D/NAA	EI	Tejavathi et al. 2007
<i>A. victoriae-reginae</i>	Lamina foliar	MS	2,4-D	ED	Rodríguez-Garay et al. 1996
<i>A. victoriae-reginae</i>	Semillas	MS	2,4-D/BA	C EI	Martínez- Palacios et al. 1998

Abreviaturas: LS: Lismaier y Skoog, SH: Schenk y Hildebrandt, MS: Murashige y Skoog. OD: Organogénesis directa, OI: Organogénesis indirecta, EI: Embriogénesis indirecta, ED: embriogénesis directa, C: callo, * no especificado el medio de cultivo ni los RCV empleados.

2.5 Reguladores de crecimiento Vegetal

Entre los factores internos que controlan el desarrollo de los diferentes tejidos de una planta destacan las hormonas vegetales, también conocidas como reguladores de crecimiento vegetal (RCV). Los RCV son compuestos orgánicos sintetizados por la propia planta, que en muy pequeñas cantidades modifican, estimulan o inhiben el crecimiento o los patrones de desarrollo de los tejidos vegetales (Pérez et al. 1999). Se reconocen diferentes grupos de RCV, dependiendo de su estructura química y su efecto fisiológico:

- Auxinas
- Citocininas
- Giberelinas
- Etileno
- Ácido abscísico
- Ácido jasmónico
- Ácido salicílico
- Poliaminas
- Brasinoesteroides

De todos éstos, los dos primeros son los más importantes para regular el crecimiento y morfogénesis en el cultivo de órganos y tejidos (George y Sherrington, 1984). Estas sustancias eran desconocidas hasta 1928, cuando Went y Thimann descubrieron el ácido indolacético (AIA) y Skoog en 1944, descubrió la kinetina (Kin). En 1957, Skoog y Miller fueron los primeros que consiguieron manipular la formación de brotes, raíces y callo, mediante el uso de diferentes combinaciones de auxinas como el AIA y citocininas como la kinetina (Pérez et al. 1999).

2.5.1 Auxinas

El término auxina proviene del griego “*auxen*” que significa incrementar o aumentar. Estas sustancias producen diversos efectos en el desarrollo y morfogénesis, promueven la elongación de la radícula y la división celular, y juegan un papel importante para promover el crecimiento unidireccional ocasionado por un estímulo llamado “tropismo” (Taiz y Zeiger, 2006; Figura 14). También intervienen en los procesos de maduración de los frutos, la elongación de brotes, la embriogénesis y la diferenciación del xilema y floema. Las auxinas presentes en plantas son el AIA, el ácido 4-cloroindolacético (4-Cl-AIA), que se encuentra en semillas jóvenes de varias leguminosas; el ácido fenilacético (APA), que con frecuencia es más abundante que el AIA, aunque mucho menos activo (Wightman y Thimann, 1980); y el ácido indol-3-butírico (AIB) presente en hojas de maíz y en varias dicotiledóneas (Schneider y Wightman, 1974; Epstein y Ludwig-Müller, 1993).

Existen también algunos compuestos sintéticos que estimulan respuestas fisiológicas similares al AIA, como el ácido α -naftalenacético (ANA), el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), el ácido 2-metil-4-clorofenoxiacético (AMCP) y el ácido 4-amino-3,5,6-tricloropiridin-2-carboxílico (Picloram) (George y Sherrington, 1984; Salisbury y Ross, 1994; Pérez et al. 1999). Entre los trabajos más recientes sobre auxinas, se involucran los genes relacionados con la respuesta auxínica (Casson y Lindsey, 2003), los mecanismos transcripcionales (Quint y Gray, 2006) y los aspectos cinéticos de las enzimas que participan en la síntesis y degradación de las auxinas (Syros et al. 2004).

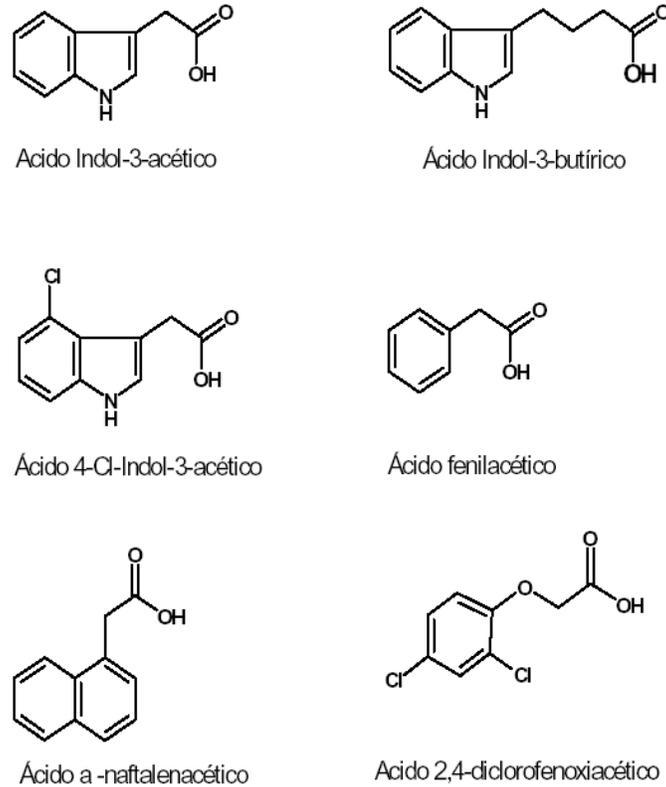


Figura 14. Estructuras químicas correspondientes a algunas auxinas naturales y sintéticas (Acosta et al. 2000).

2.5.2 Citocininas

El nombre citocinina proviene de la palabra griega *cito-* κίνησις, que significa “citocinesis”, haciendo referencia al proceso de división celular (Taiz y Zeiger, 2006). Miller y Skoog en 1955 descubrieron la cinetina (kin) (Figura 20) en donde a partir de dicho compuesto se agruparon a las sustancias que tenían reacciones similares (Davies, 2007). Desde su descubrimiento, se han caracterizado por ser útiles para el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, ya que regulan la división celular, promueven la formación y la actividad de los meristemos apicales, retardan la senescencia foliar, promueven la diferenciación de los cloroplastos e interrumpen la dormancia de meristemos axilares, originan el desarrollo del metabolismo autotrófico, aceleran la movilización de nutrientes y la iniciación de brotes (Mok, 1994). Las citocininas

son derivados estructurales de la adenina con cadenas laterales de isoprenoides. La citocinina más abundante en las plantas es la *trans*-zeatina y en menor cantidad la *cis*-zeatina (Taiz y Zeiger, 2006).

2.5.3 Interacción auxinas-citocininas

Junto con las auxinas, las citocininas regulan la división celular, cada una de las cuales influye en diferentes fases del ciclo celular. Las auxinas afectan la replicación del ADN, mientras que las citocininas parecen ejercer algún control sobre los eventos encaminados a la mitosis y la citocinesis (Gaspar et al. 1996). El balance entre auxinas y citocininas en un cultivo *in vitro* suele ser determinante para el patrón de desarrollo que siga el tejido (Pérez et al. 1999) ya que al lograr un balance adecuado, es posible alcanzar elevadas tasas de proliferación aumentando la efectividad del método de micropropagación (Pérez, 1998). Skoog y Miller (1976) encontraron que la formación de brotes se podía inducir en cultivos de callo de tabaco utilizando concentraciones relativamente bajas de auxinas y altas de citocininas al adicionarlas al medio de cultivo (George y Sherrington, 1984).

A partir de este descubrimiento, varios aspectos de la diferenciación celular y de la organogénesis durante el CTV demuestran estar regulados por la interacción entre las auxinas y citocininas (aunque pueden presentarse variaciones notables entre especies y tejidos). Además, las citocininas en altas concentraciones promueven la producción de auxinas, permitiendo la proliferación celular regulada por ambas hormonas, evidenciando la relación proporcional que existe entre ellas para controlar el ciclo y el la diferenciación celular (George et al. 2008). La Figura 15 muestra las respuestas que pueden esperarse del tejido ante el balance de auxinas y citocininas (George, 2008).

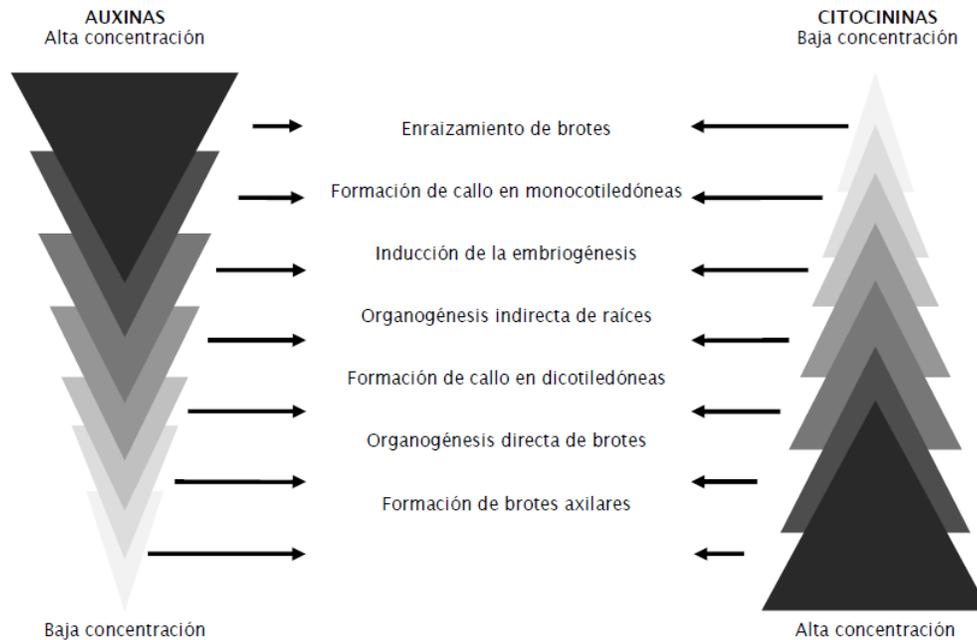


Figura 15. Concentraciones relativas de auxinas y citocininas que generalmente son requeridas durante la morfogénesis *in vitro*. Las posibles respuestas se muestran en la columna central (George et al. 2008 modificado por Valdés, 2010).

2.6 Vías de regeneración en CTV

En el CTV se presentan tres vías (Figura 16) de acuerdo al proceso de regeneración de las plantas (Tisserat, 1999):

a) Embriogénesis somática.

Es la formación de un embrión a partir de una célula, sin la necesidad de la fusión de gametos (Gómez, 1998). Los embriones somáticos son estructuras bipolares que tienen un eje apical-radical, aislados por un tejido epidérmico y que no poseen conexión vascular con el tejido materno (Jiménez, 1998). Los cambios que ocurren durante el desarrollo del embrión establecen la organización del cuerpo de la planta y lo preparan para la latencia y germinación posteriores (West y Harada, 1993).

La embriogénesis en plantas superiores se divide en tres fases: 1) morfogénesis, 2) maduración del embrión (acumulación de sustancias de reserva) y 3) desecación (West y Harada, 1993). La formación de embriones somáticos a partir de células, tejidos y órganos puede llegar a ocurrir de manera directa e indirecta, en gran parte por la acción inductora de auxinas como el 2,4-D y eventualmente citocininas (Tisserat, 1999; George, 2008). La forma directa implica el desarrollo a partir de una célula o un grupo de células directamente del tejido somático sin pasar por la fase de callo.

Entre los tejidos de más rápida respuesta se pueden citar las células epidérmicas de tallo y explantes de embriones inmaduros, aunque hay reportes de anteras y protoplastos (Tisserat, 1999). La embriogénesis indirecta consiste del establecimiento en cultivo *in vitro* de cualquier explante, la proliferación de callo y la subsecuente iniciación de estructuras proembrionarias donde participan una célula o un grupo de éstas. Prácticamente cualquier parte de la planta, como raíz, hojas, peciolo, tallo, embrión cigótico, estructuras florales (anteras y estigma), pueden ser utilizadas para producir callos embriogénicos (George y Sherrington, 1984; Tisserat, 1999; George, 2008). La embriogénesis somática posiblemente es el mejor ejemplo de expresión totipotencial en un gran número de plantas (Thorpe, 2000).

b) Organogénesis

Es un evento morfogénético que se caracteriza por el desarrollo de un primordio unipolar a partir de una yema, con el subsecuente desarrollo de éste en un brote vegetativo. Posteriormente es necesario un enraizamiento de los brotes formados (Jiménez, 1998). Los brotes pueden formarse directamente del explante (**organogénesis directa**) cuando se emplean embriones, hojas, cormos, bulbos, rizomas y tubérculos; o pasar por una fase de callo (**organogénesis indirecta**). Los tejidos más convenientes para ser utilizados por esta vía son las puntas de tallos, hojas y pétalos (Starling y Dodds, 1983; Tisserat, 1999). Por lo tanto, para lograr la producción de una planta completa

es necesaria una secuencia de medios que favorece la formación de brotes e inhibe el desarrollo de raíces, y viceversa (Gaspar et al. 1996). La forma indirecta requiere de una desdiferenciación del tejido acompañada de una actividad mitótica para la formación de callo y, posteriormente ocurre una redeterminación de las células para adquirir la capacidad morfogénica (Sharp et al. 1979). Al igual que en la embriogénesis somática directa, los promotores de la callogénesis son altas concentraciones de auxina y bajas o nulas de citocininas (Tisserat, 1999; George, 2008).

c) Formación de plantas a partir de yemas axilares y meristemos apicales.

Se puede dar como un proceso vía organogénesis directa ya que ocurre a partir de yemas axilares o de la proliferación de yemas adventicias. Se basa en la teoría la formación *de novo* de yemas a partir de meristemos preexistentes o tejido no meristemático, aunque será necesario emplear altas concentraciones de citocininas (Tisserat, 1999; Margara, 1988). El desarrollo de yemas axilares permite mantener intacto el genotipo de las plantas de meristemos y las plantas producidas se encuentran libres de microorganismos. La reactivación de las yemas axilares se basa en el rompimiento de la dominancia apical (control del crecimiento ejercido sobre las yemas laterales por la yema apical). La dominancia apical está dada por un incremento en la concentración de auxinas, provocando la supresión de las yemas laterales. Para la proliferación de yemas axilares se utilizan las citocininas, que rompen la dominancia apical del brote (Gaspar et al. 1996). La bencilaminopurina (BA) es en general la citocinina más efectiva y la más empleada en la activación de yemas axilares, aunque también se han utilizado kinetina (Kin), Zeatina (Zea) y dimetilalilamino purina (2iP) (George, 2008).

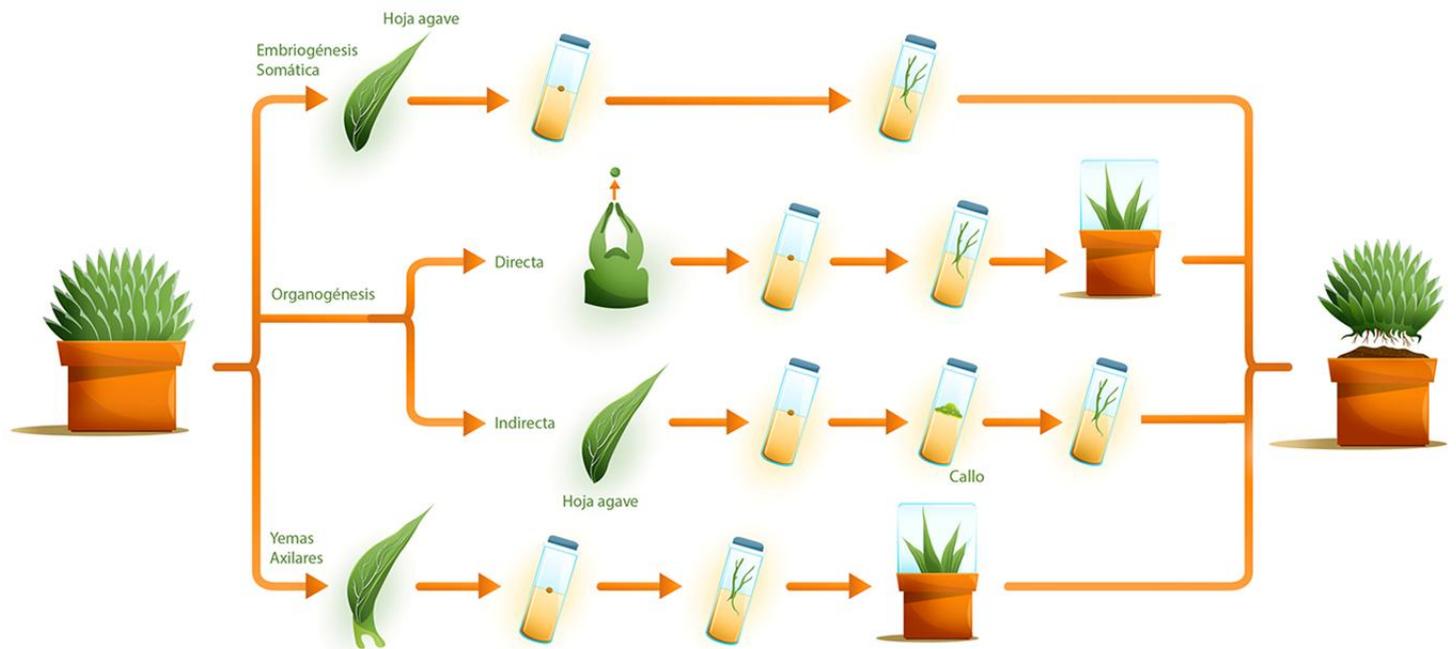


Figura 16. Vías de regeneración a través del CTV (Meza, 2015).

2.7 Oxidación

Se manifiesta como un oscurecimiento del explante en la zona expuesta al medio de cultivo que puede extenderse en todo el tejido e incluso en el medio, afectando el crecimiento y en algunas ocasiones provocando la muerte del explante. Por lo tanto, la oxidación fenólica puede ser un serio problema para el establecimiento y supervivencia de los cultivos *in vitro* (Jiménez, 1998). Generalmente se presenta cuando se dañan los tejidos durante la preparación del explante, ya sea al seccionarlo o durante la desinfección superficial. En ese momento los compuestos fenólicos que están acumulados en grandes cantidades en las vacuolas se mezclan con el contenido de los plástidos y otros organelos que contienen polifenoloxidasas, enzimas de naturaleza oxidoreductasa, las cuales provocan la aparición de la coloración negra o marrón como consecuencia del proceso de oxidación y son estos compuestos

oxidados los que inhiben la actividad enzimática que puede desencadenar el oscurecimiento y muerte de los explantes (Hu y Wang, 1983).

La oxidación del tejido afecta su metabolismo de diversas maneras. Se le ha asociado con el incremento en la síntesis de proteínas y almidón y una disminución en la producción de etileno. Cuando la oxidación llega a ser muy intensa, la síntesis de proteínas disminuye y comienza el deterioro del tejido. La oxidación del tejido es autocatalítica. Los exudados fenólicos tóxicos producen daños, creando más exudados y por lo tanto mayor oxidación. Se puede añadir carbón activado al medio de cultivo para atrapar los exudados, pero esto puede interferir con la efectividad de las hormonas adicionadas al medio ya que también las adsorbe (Von Aderkas et al. 1992). La necrosis del tejido ocurre por la acción de las enzimas oxidasas que contienen cobre, tales como las polifeniloxidasas y la tirosinasa (George y Sherrington, 1984), las cuales son liberadas o sintetizadas en el momento que los tejidos son dañados. Los sustratos de estas enzimas varían en cada tejido, siendo los más comunes la tirosina y *o*-hidroxifenoles como el ácido clorogénico. Las enzimas y sustratos son normalmente retenidos dentro de diferentes compartimientos de las células y se liberan cuando éstas son dañadas o están moribundas. Los fenoles tienen una función natural importante en la oxidación regulada del AIA. La toxicidad de los fenoles se debe probablemente a la unión reversible del hidrógeno a las proteínas. La inhibición irreparable del crecimiento se presenta cuando los fenoles son oxidados a compuestos quinona altamente activos y polimerizan u oxidan proteínas para formar de manera creciente compuestos melánicos (George y Sherrington, 1984).

La oxidación del tejido, especialmente del explante aislado se puede prevenir de varias maneras, con mejores resultados en unas que otras. En algunos casos se necesita la conjunción de dos o más y en los casos más severos es muy difícil prevenirla. La primera acción es remover las sustancias fenólicas de los explantes, las cuales son frecuentemente exudados del tejido. Para ello se realizan lavados de agua corriente. Antes de que los explantes sean esterilizados, también es usual dejarlos algunos minutos en agua estéril antes de la disección del material. Ésta es una de las acciones más comunes para

contrarrestar la oxidación son los subcultivos frecuentes. En las transferencias de cultivo es posible remover las partes necrosadas antes de que afecten al tejido sano (Von Aderkas et al. 1992).

Otra de las acciones para combatir la oxidación es la adición de carbón activado, que tiene una gran capacidad para absorber compuestos tóxicos e inhibitorios; generalmente se emplea en concentraciones de 0.5 a 3 g/L. Otros compuestos como la cafeína, el polivinilpirrolidona (PVP) y el β -mercaptoetanol han mostrado ser benéficos para la absorción de polifenoles o taninos. El PVP absorbe fenoles a través de la unión con el hidrógeno, previniendo su oxidación (George y Sherrington, 1984). La tendencia de los compuestos a oxidarse o reducirse depende del potencial de oxidación-reducción (redox) de la solución. Cuando los tejidos son susceptibles a la oxidación, éstos frecuentemente se sumergen en una solución de un agente reductor (antioxidante) inmediatamente después de su disección. La lista de compuestos útiles que se han usado para este propósito incluye el ácido ascórbico, ácido cítrico, L-cisteína HCl, ditioneitol (DTT) y mercaptoetanol. También se han incorporado agentes reductores dentro del medio de cultivo (George y Sherrington, 1984). La exposición de los cultivos a la luz incrementa la actividad de las enzimas tanto en la biosíntesis como en la oxidación de los fenoles. Para reducir o prevenir la oxidación, los cultivos se mantienen en oscuridad por más de 14 días antes de ser transferidos a bajas intensidades lumínicas (George y Sherrington, 1984).

2.8 Hiperhidratación

El exceso de agua en las células vegetales y en las plantas *in vitro* provoca irregularidades morfológicas, anatómicas y fisiológicas. Algunas de las anomalías observadas son la presencia de espacios intercelulares muy grandes en el mesófilo y el parénquima, la presencia de cloroplastos con organización anormal en grana y estroma, un bajo contenido de clorofila, cutícula delgada además de que el peso seco del tejido es muy bajo y el contenido de agua es

alto (Debergh et al. 1992). Su aspecto es traslúcido debido a la gran acumulación de agua en sus tejidos (Debergh et al. 1992). Son varios los factores que pueden inducir la hiperhidratación, tales como un porcentaje de humedad muy alto, el exceso de carbohidratos y minerales en el medio de cultivo o la baja intensidad luminosa, así como la cantidad y el tipo de citosina empleada. La susceptibilidad a la hiperhidratación varía dependiendo de la especie (Debergh et al. 1992).

2.9 Fungicidas

Uno de los principales problemas de la micropropogación *in vitro* es la contaminación provocada por diferentes microorganismos, que van desde hongos filamentosos, levaduras y bacterias, los cuales habitan comúnmente en las plantas, pero tienen efectos devastadores *in vitro* (George, 2008, Leifert et al. 1994; Leifert y Cassells, 2001). Los microorganismos pueden provenir de la superficie o del interior de los tejidos del explante. Uno de los procedimientos para disminuir los riesgos de la contaminación en el establecimiento de los explantes es la aplicación de fungicidas, combinados o por separado (Jiménez, 1998). Es considerado un fungicida de amplio espectro y se utiliza en muchas especies para eliminar hongos tanto en plantas como en animales (vertebrados e invertebrados) (Campbell, 1990).

3. JUSTIFICACIÓN

México es el centro de origen de las Agaváceas, una de las familias vegetales más representativas y atractivas de nuestro país. Debido a la estética de sus rosetas, la rareza de sus hojas e inflorescencias impresionantes, los agaves son altamente apreciados como plantas de ornato, así como por los recursos ecológicos (regeneradores de suelo, fuente de alimento para animales como polillas, mariposas, abejas, colibríes y murciélagos), económicos (producción de bebidas alcohólicas y textiles), culturales (símbolo y emblema en zonas arqueológicas y grupos étnicos) y medicinales (jarabes y pastillas para la tos, emulsiones para personas anémicas, etcétera). Las poblaciones silvestres de agaves se han fragmentado debido a la destrucción de su hábitat como consecuencia de las diferentes actividades antropogénicas: expansión agrícola, forestal, ganadera y la apertura de vías de comunicación. Asimismo, la colecta masiva e ilegal, ha causado en los últimos años que un gran número de especies se encuentren amenazadas o en peligro de extinción. Por lo anterior resulta indispensable establecer estrategias eficientes para la conservación tanto *in situ* como *ex situ* de estas especies. *Agave victoriae-reginae* es una especie endémica de México cuyo ciclo de vida es largo y con alto riesgo de que sus poblaciones silvestres sean constantemente alteradas debido a la explotación excesiva del CaCO_3 , componente principal del sustrato en el que crecen, el cual se utiliza como materia prima para la fabricación de yeso y cemento. Aunado a ello, la demanda de coleccionistas a nivel mundial genera un tráfico ilegal de semillas y plantas, provocando un deterioro en la dinámica poblacional de la especie. En este contexto, el CTV es una herramienta que permite el estudio a corto y largo plazo de la capacidad morfogénica, propagación y conservación de especies en riesgo, aprovechando su capacidad regenerativa. Esta investigación sugiere el planteamiento de una estrategia para la propagación y el establecimiento de cultivos *in vitro* con la finalidad de promover la conservación y aprovechamiento sostenible de *A. victoriae-reginae*, y que a su vez fomente el estudio anatómico, histológico y embriológico, así como la propagación *in vitro* de especies de Agaváceas, en las cuales la obtención de semillas se dificulta y donde la mayoría de éstas se encuentran en una clasificación de riesgo.

4. OBJETIVOS

4.1 General:

Llevar a cabo un estudio que permita explorar respuestas regenerativas (morfogenéticas) de estructuras somáticas que llevan a lograr el control del desarrollo de células y tejidos y con ello la regeneración de plantas completas de *A. victoriae-reginae* para contribuir a su conservación y a las bases de su aprovechamiento sostenible.

4.2 Particulares:

- ✿ Establecer el cultivo aséptico de explantes de hojas, tallos y raíces de plantas jóvenes.
- ✿ Registrar y describir las respuestas morfogenéticas de los explantes en estudio.
- ✿ Determinar el efecto de PVP y carbón activado en el control de la oxidación de los cultivos *in vitro*.
- ✿ Describir el efecto de auxinas y citocininas para la inducción a respuestas morfogénicas
- ✿ Emplear diferentes concentraciones de sacarosa para promover un incremento en la elongación de hojas.
- ✿ Elaborar un análisis estructural (histológico) en las etapas tempranas del cultivo *in vitro* de explantes de hoja y tallo.
- ✿ Comprobar la obtención de embriones somáticos a partir de estructuras de hojas y tallos.
- ✿ Demostrar la morfología del callo obtenido a partir de explantes de hoja y tallo utilizando microscopía electrónica de barrido.

5. HIPÓTESIS

- Si las células de los explantes son totipotentes y esta capacidad puede expresarse al ser cultivados *in vitro* bajo el estímulo de los tratamientos, entonces podrán desarrollarse estructuras organizadas como órganos y/o embriones somáticos.

6. DIAGRAMA CON LA METODOLOGÍA GENERAL

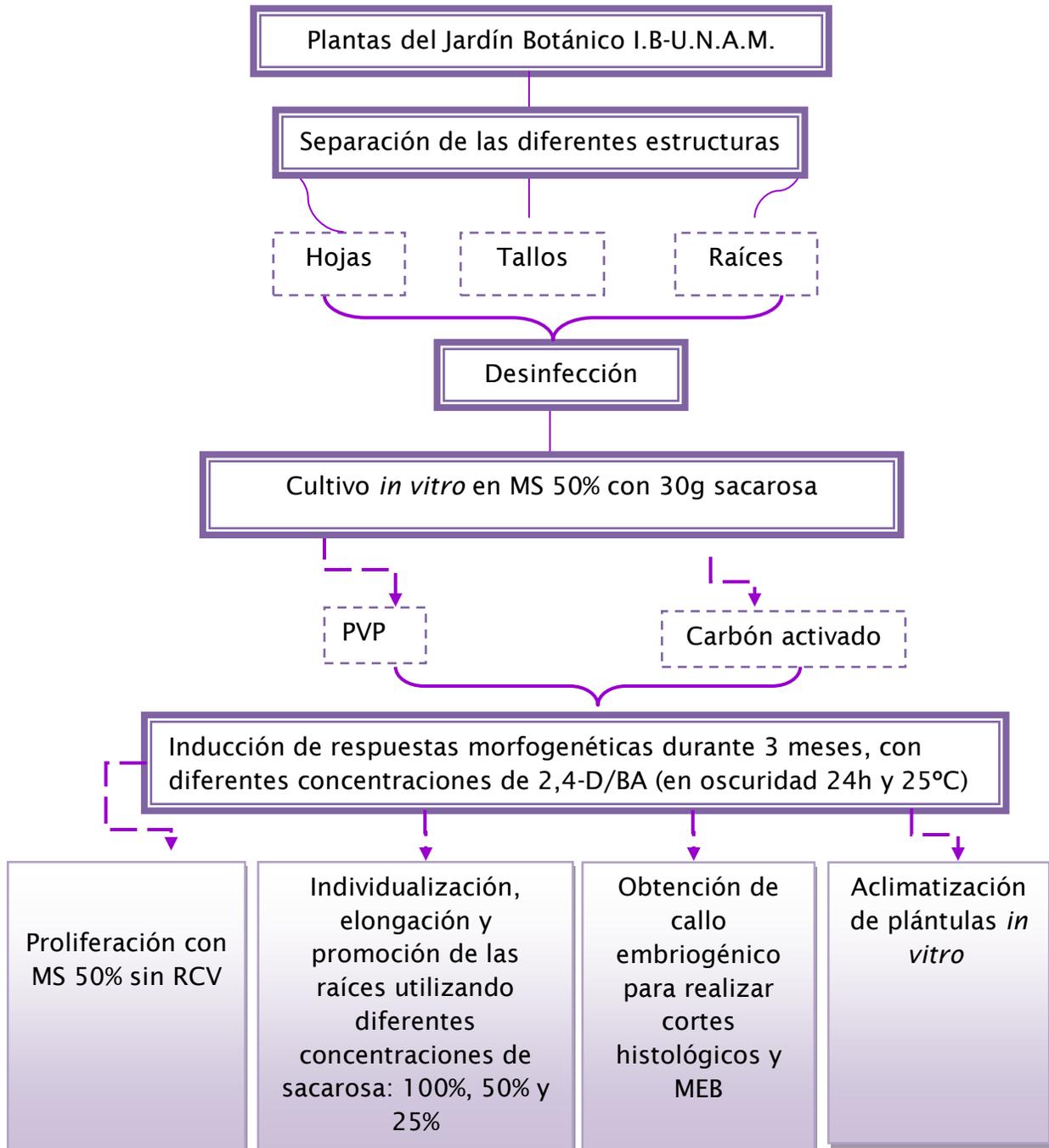


Figura 17. Diagrama de flujo del método para el cultivo de tejidos *in vitro* de *A. victoriae-reginae*.

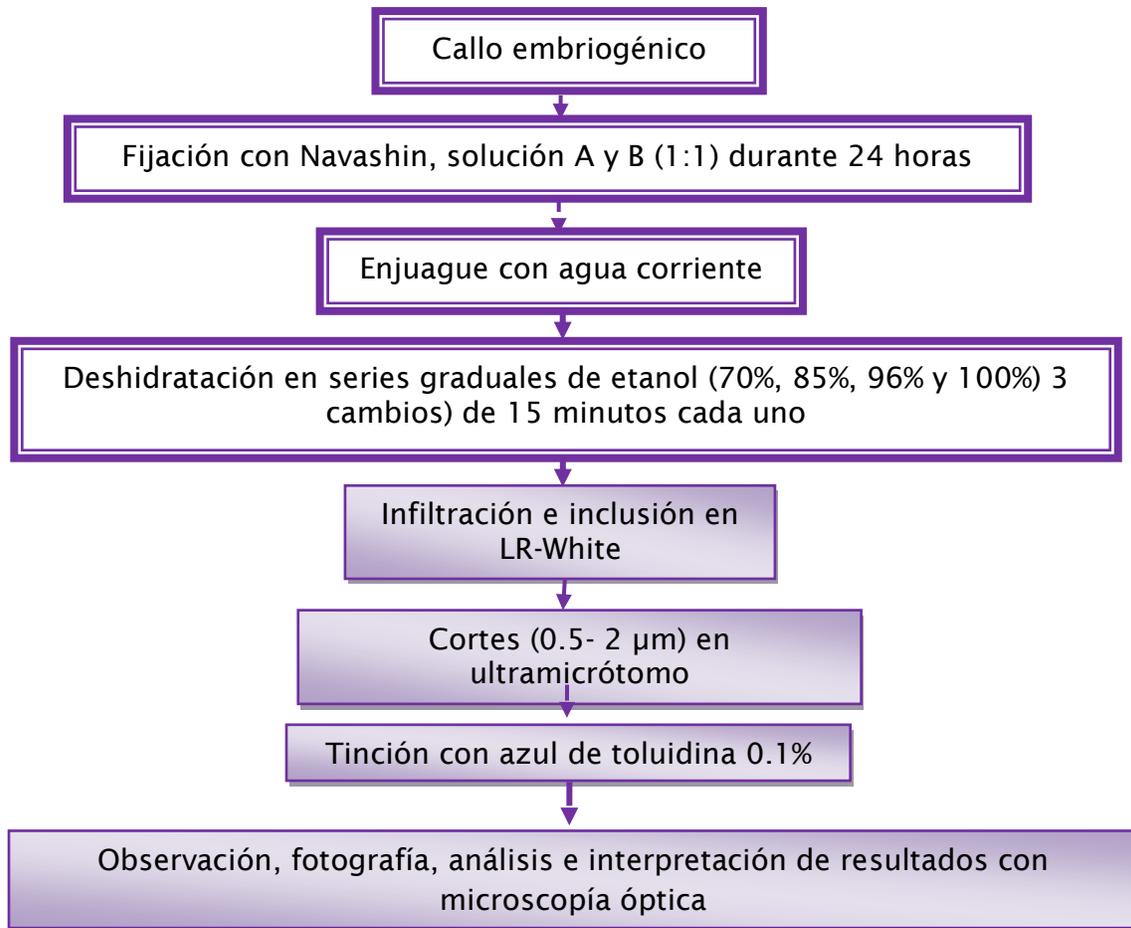


Figura 18. Diagrama de flujo del método utilizado para la obtención de cortes histológicos.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Material biológico

Se utilizaron 5 plantas juveniles de *A. victoriae-reginae*, las cuales fueron donadas por el Dr. Abisaí García Mendoza del Jardín Botánico IBUNAM (Figura 19).

7.1.1 Obtención de explantes

Los explantes (Figura 19) dependieron de las características de los mismos y fueron:

- A. Lámina (ápice foliar) de 1-4 cm de longitud.
- B. Vaina (base foliar) desde 2- 4 cm de longitud.
- C. Regiones meristemáticas provenientes del tallo de 1-3 cm de longitud.
- D. Ápices radiculares de 1-2 cm de longitud.

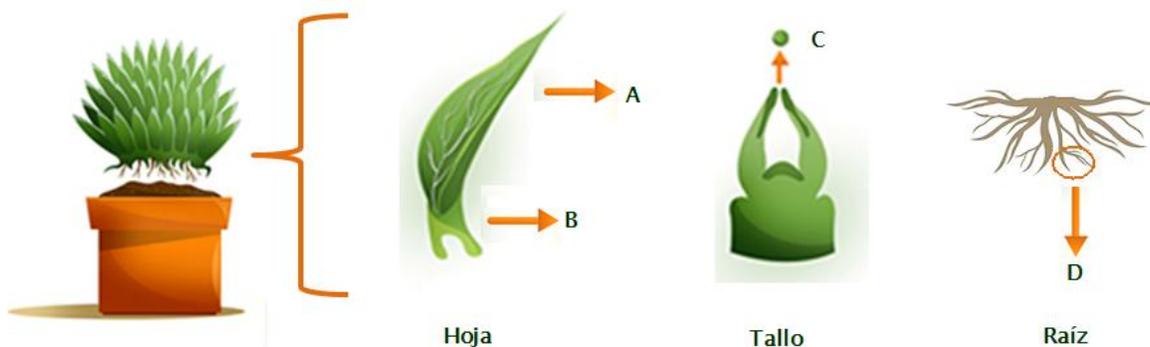


Figura 19. Selección de explantes provenientes de *A. victoriae-reginae*.

Dichas estructuras se obtuvieron a partir de las plantas completas de los agaves donados por el Jardín Botánico. El desarrollo *in vitro* de la presente investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de CTV del Jardín Botánico IBUNAM, a cargo de la M. en C. Goldhaber Pasillas y el Dr. Chávez Ávila.

7.1.2 Desinfección de explantes

Los explantes pasaron por un proceso de desinfección para eliminar microorganismos (hongos y bacterias) de contacto y sistémicos. Cada estructura (hoja, tallo y raíz) tuvo un protocolo de desinfección particular (Tabla 6).

Hojas

Se tallaron suavemente con una esponja y una mezcla de jabón en polvo diluido en 500 ml de agua potable para eliminar residuos de polvo o algún microorganismo superficial. Posteriormente se sumergieron en una solución jabonosa durante 15 min. Posteriormente, las hojas se sumergieron en una solución de etanol (70 %) durante 2 min, después pasaron a una solución de benomilo (3 g/L) y agua destilada y se hicieron dos cambios durante 5 h. Finalmente, se sumergieron las hojas en una solución de hipoclorito de sodio (30 % v/v) durante 15 min.

Tallos

Debido a la herida expuesta al disectar y retirar las raíces, el manejo de los tallos fue más cuidadoso; éstos se tallaron suavemente con una solución jabonosa jabón durante 10 min. Después, se sumergieron en una solución de etanol (70 %) durante 1 min para continuar con una solución de benomilo (3 g/L) y agua destilada, se realizaron dos cambios durante 3 h. Para finalizar, los tallos se pasaron a una solución de hipoclorito de sodio (30% v/v) durante 10 min.

Raíces

Son estructuras que al estar en contacto con el suelo y los microorganismos tienen más probabilidad de presentar contaminación que los otros explantes (hojas y tallos). Para ello, se utilizó el siguiente proceso de desinfección: bajo agua corriente, se frotaron las raíces de manera mecánica para eliminar restos de sustrato. Posteriormente fueron desinfectadas superficialmente con una solución jabonosa durante 20 min. Después, los explantes se colocaron en una solución de etanol (70 %) durante 3 min, seguidamente de una mezcla de benomilo (4 g/L) durante 6 h con tres enjuagues con agua destilada estéril y finalmente se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio durante 20 min. Para garantizar la supervivencia de los explantes, cada protocolo se revisó con antecedentes bibliográficos (Martínez-Palacios, 1998; Mata, 2000; Goldhaber, 2008; Valdés, 2010) y ensayos previos. Después, bajo condiciones asépticas los explantes (hoja, tallo y raíz) se sometieron a tres enjuagues con agua destilada estéril durante 2-3 min. Con la finalidad de prevenir un proceso de oxidación,

todos los explantes recibieron dos enjuagues con una solución de ácidos ascórbico (300 mg/ 500 ml) y cítrico (300 mg/ 500 ml).

Tabla 6. Procedimiento de desinfección para los distintos tipos de explantes (hojas, tallos y raíces)

Abreviaturas: ADE: Agua destilada esterilizada, AC: Agua corriente, SD: Solución de

Tratamiento 1	Tratamiento 2	Tratamiento 3	Tratamiento 4
Hojas exterior de la roseta	Hojas interior de la roseta	Tallos	Raíces
AC 5 min	AC 3 min	AC 3 min	AC 8 min
SD 15 min, sin enjuague	SD 15 min, sin enjuague	SD 10 min, sin enjuague	SD 20-30 min, sin enjuague.
SE 70 % 2 min, sin enjuague	SE 70 % 2 min, sin enjuague	SE 70 % 1 min, sin enjuague	SE 70% 3 min, sin enjuague
Bn/ ADE (3 g/L* 2 cambios durante 5 horas) sin enjuague	Bn/ ADE (3 g/L* 2 cambios durante 5 horas) sin enjuague	Bn/ ADE (3 g/L* 2 cambios durante 3 horas) sin enjuague	Bn/ ADE (4g/L* 3 cambios durante 6 horas) sin enjuague
CI 30% v/v durante 15 min con enjuague	CI 30% v/v durante 15 min con enjuague	CI 30% v/v durante 10 min con enjuague	CI 30% v/v durante 20 min con enjuague
DCFL: ADE (3 cambios)	DCFL: ADE (3 cambios)	DCFL: ADE (3 cambios)	DCFL: ADE (3 cambios)
SAC (150 mg/ 500 ml) + AA (150 mg/ 500 ml) 2 cambios DCFL	SAC (150 mg/ 500ml) + AA (150 mg/ 500 ml) 2 DCFL	SAC (150 mg/ 500 ml) + AA (150 mg/ 500 ml) 2 cambios DCFL	SAC (150 mg/ 500ml) + AA (150 mg/ 500 ml) 2 cambios DCFL

detergente, **Bn**: Benomilo, **CI**: Solución de hipoclorito de sodio, **SE**: Solución de etanol, **SAC**: Solución de ácido cítrico, **AA**: Solución de ácido ascórbico y **DCFL**: Dentro de la campana de flujo laminar.

7.1.3 Disección de explantes

Hojas

Con ayuda de un cuchillo de acero desinfectado superficialmente con una solución de etanol (96 %) y posteriormente esterilizado con la llama de mechero de Bunsen, se hicieron los cortes a los cuales se les retiró el margen de las hojas utilizando un bisturí con navaja en forma de oz. Éstas al no tener dientes permitieron quitar el margen sin pausa y con un sólo corte fino (Figura 20). También se retiró la espina terminal, la cual tenía un tamaño variable (1 mm hasta 3 cm) que dependía de la longitud de la hoja. Debido al tamaño y la cantidad de

fibras y rigidez de los explantes de hoja, éstos se dividieron en lámina (ápices foliares) y vaina (bases foliares) (Figura 21).

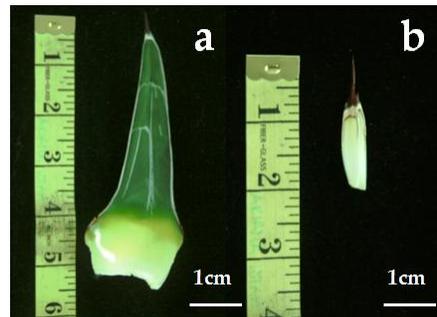


Figura 20. Explantes de hojas seccionadas de *A.victoriae-reginae*. **a)** Hoja de la parte externa de la roseta con una longitud de 5.5 cm y **b)** Hoja de la parte interna de la roseta con 2 cm de longitud.

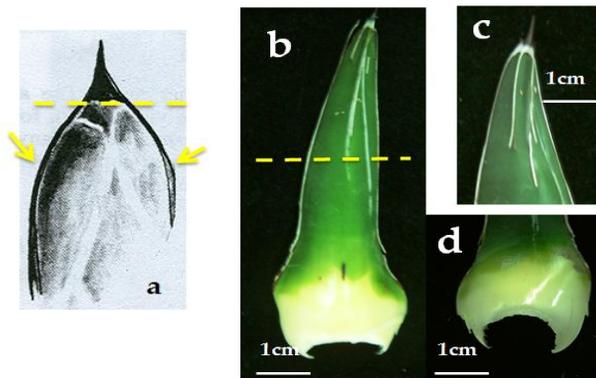


Figura 21. Hoja de *A. victoriae-reginae*: **a)** La línea punteada muestra la espina y las flechas señalan el margen que se desprendió, **b)** Las líneas amarillas indican donde se hicieron cortes para separar los explantes, **c)** Detalle de la lámina (ápice foliar) y **d)** Extremo correspondiente a la vaina (base foliar).

🌿 Tallos

Algunos tallos midieron entre 3 y 5 cm de longitud y se obtuvieron hasta 40 explantes desde 0.5 a 1 cm de longitud.

🌿 Raíces

Se seleccionaron únicamente las raíces vivas con tejido blando y succulento, las cuales median de 0.53 cm. Debido a esto los explantes medieron entre 0.3 hasta 1 cm aproximadamente.

7.2 Siembra *in vitro*

Se utilizó el medio nutritivo MS 50% (Murashige y Skoog, 1962) con 30 g/L de sacarosa. Se ensayaron dos tipos de antioxidantes: carbón activado (1 g/L) y PVP (2 g/L). El pH se ajustó a 5.7 y se solidificó con 4 g/L de gelrite. El medio se repartió (25 ml) en frascos de vidrio de 100 ml y fue esterilizado en autoclave a 120°C y 1.5 Kg/cm² durante 17 min.

Para los explantes de hoja y tallo se sembró un explante por frasco, mientras que en el caso de las raíces se colocaron dos en cada frasco. Los cultivos se mantuvieron a 23°C en oscuridad durante dos semanas iniciada la siembra con la finalidad de evitar la producción fenólica y disminuir el proceso de oxidación.

7.2.1 Tratamientos para inducir respuestas morfogénicas

Se cultivaron explantes de hoja, tallo y raíz en medio de inducción MS-50 adicionado con 2,4-D (0, 0.1, 0.5, 1, 2, 3, 4 mg/L) en combinación con BA (0, 0.5, 1, 2, 3 mg/L) a 21 °C durante un mínimo de 30 días. En cada frasco de cultivo se sembró un explante. Se hicieron 7 repeticiones de hoja y 5 repeticiones para tallo y raíz de *A. victoriae-reginae* (Tabla 7).

Tabla 7. Tratamientos para el cultivo de explantes de hoja, tallo y raíces. MS 50% con carbón activado (1 g/L)

Regulador de crecimiento 2,4-D mg/L	BA mg/L	0	0.5	1	2	3
0		1	2	3	4	5
0.1		6	7	8	9	10
0.5		11	12	13	14	15
1		16	17	18	19	20
2		21	22	23	24	25
3		26	27	28	29	30
4		31	32	33	34	35

7.3 Análisis estadístico

Para establecer diferencias significativas en las respuestas de los tejidos a los distintos tratamientos se realizaron las siguientes pruebas estadísticas: ANOVA, análisis de comparación de medias de Tukey, Chi-cuadrada y Exacta de Fisher mediante el programa SPSS 15.0.

7.4 Exploración morfogénica a partir de callo

Con la finalidad de explorar las respuestas morfogénicas a partir del callo obtenido de explantes de hoja (ápices y bases) y raíces, los callos de cada tratamiento se dividieron en dos grupos, cada uno con diferentes tipos de medio de cultivo (tabla 8). Uno de ellos se subcultivó en medio basal MS 50% sin RCV y en el segundo grupo se mantuvieron concentraciones originales de 2,4-D/BA. De esta forma, se lograría una exploración para inducir la formación de brotes. Se determinó el tipo de respuesta obtenida de los tres grupos y se evaluó la formación de brotes y su proliferación. También, se registró la coloración y consistencia (Tabla 7).

7.5 Elongación e individualización de los brotes regenerados

Al individualizar los brotes regenerados, fueron cultivados en MS 50% con diferentes concentraciones de sacarosa para inducir un incremento en la elongación de los agaves (Tabla 8). Se realizaron 24 repeticiones por tratamiento. Se evaluó la longitud de la hoja más larga de la roseta *in vitro*, el número de hojas, la presencia o ausencia de hijuelos, tamaño en cm y número de hojas de los hijuelos. Se tomó una medición transcurridos 30 días.

Tabla 8. Tratamientos utilizados para promover la elongación en los brotes regenerados

Grupo	MS 50% con distintas concentraciones de sacarosa
I	30 g/L (100%)
II	15 g/L (50%)
III	7.5 g/L (25%)

7.6 Exploración histológica de las etapas tempranas del CTV de *A. victoriae-reginae*

Es importante mencionar que para los propósitos del presente trabajo, se obtuvieron cortes histológicos del callo para comprobar si efectivamente ocurrieron respuestas de embriogénesis somática. Además, se determinó si las posibles estructuras piriformes bipolares y de los órganos formados *de novo* fueron proembriones somáticos de *A. victoriae-reginae*. Por tal motivo se realizó el proceso de análisis histológico en el Laboratorio de Desarrollo En Plantas de la Facultad de Ciencias, U.N.A.M. bajo la instrucción de la M. en. C. Pérez Pacheco y la Dra. Márquez Guzmán.

7.6.1 Fijación

El callo en diferentes etapas de desarrollo se fijó con Navashin (Apéndice III) Solución A y B (1:1) durante 24 horas dentro de envases ámbar para evitar la descomposición del mismo; después se lavaron con agua corriente (Sandoval, 2005).

7.6.2 Deshidratación

Se deshidrató en una serie gradual de alcohol etílico (30%, 50%, 70%, 85%, 96% y 100%) haciendo 3 cambios de 15 min en cada uno. El tiempo fue ajustado con base en la friabilidad del tejido. Las estructuras bipolares al igual que el callo (menor a 2 cm) se incluyeron en resina LR-White para obtener cortes finos.

7.6.3 Inclusión en LR- White

La inclusión en resina se realizó en frío, utilizando mezclas sucesivas de alcohol-LR-White (Tabla 9). La primera mezcla de alcohol- LR- White 50% se realizó durante 120 min. Después, las muestras fueron infiltradas con LR-White puro realizando tres cambios de 1 h cada uno (Ruzin, 1999; López- Curto et al. 2005).

7.6.4 Montaje

Posteriormente, las muestras se incluyeron dentro de cápsulas de gelatina y se cubrieron con LR-White puro, permaneciendo durante 24 horas en una estufa a 56°C para polimerizar la resina.

Tabla 9. Inclusión de las muestras con LR-White

LR-White (%)	Tiempo (horas)
25	1
50	1
75	1
100 puro (3 cambios de 1 h cada uno)	3

7.6.5 Obtención de cortes y tinción

Se realizaron cortes de 0.5 a 2 μm de grosor en un ultramicrotomo RMC modelo MT 990. Las laminillas de LR-White se secaron en una estufa a 56 °C y se tiñeron con azul de toluidina al 0.1%. Las fotomicrografías de los cortes histológicos se hicieron en un fotomicroscopio Olympus Provis AX70, bajo la

dirección de la Tec. Acad. Bieler Antolínen el Laboratorio de Microcine de la Facultad de Ciencias, U.N.A.M.

7.7 Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)

Algunas de las estructuras de callo y órganos de *A.victoriae-reginae* deshidratadas en etanol, se secaron a punto crítico con CO₂ en una desecadora CPD-030 Bal-Tec. Dichas estructuras se colocaron en porta muestras de aluminio con una cinta conductiva de carbón y se cubrieron con una película de oro en una ionizadora. Posteriormente, se observaron en el microscopio electrónico de barrido (MEB) Jeol JSM-5310LV con una aceleración de voltaje de 10-15 kV, y se tomaron fotografías en el Laboratorio de Microscopía Electrónica de Barrido de la Facultad de Ciencias, U.N.A.M.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Material biológico

De las 5 plantas de *A. victoriae-reginae* utilizadas se obtuvieron un total de 245 explantes para las secciones de lámina (ápice foliar), 245 de vaina (base foliar), 175 secciones de tallo y 175 de raíces (Figura 22), resultando un total de 840 explantes. El tamaño de dichos explantes varió de acuerdo al grosor y longitud de la planta madre.

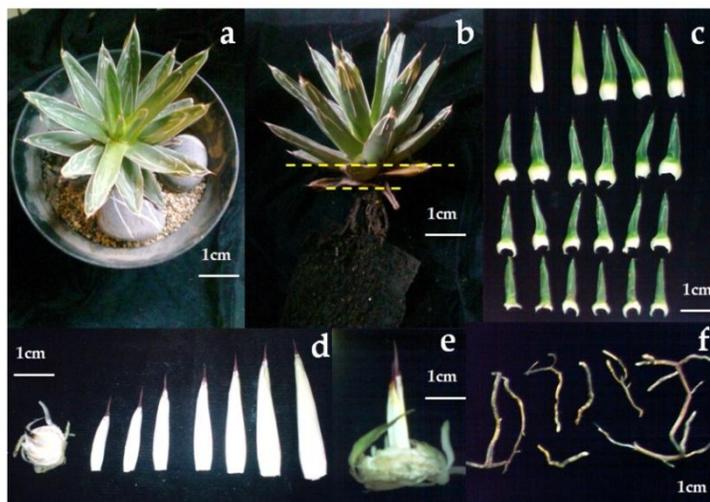


Figura 22. Secciones utilizadas de *A. victoriae-reginae*: a) y b) Planta completa; las líneas amarillas indican dónde se realizaron los cortes para separar los explantes, c) y d) Hojas, e) tallo con tres hojas internas y f) raíces.

8.2 Desinfección de los explantes

Los explantes provenientes de plantas que crecen en invernadero o en cuartos de aclimatización son relativamente más fáciles de desinfectar que los provenientes de plantas que crecen en el campo o bajo condiciones silvestres, como en jardines botánicos. También es más fácil la desinfección de explantes de órganos jóvenes que la de explantes provenientes de materiales adultos (Roca y Mroginski, 1991). Las plantas silvestres utilizadas en esta investigación padecieron contaminación por hongos al ser trasplantadas en macetas con sustrato esterilizado y bajo condiciones de invernadero. Se ha reportado que los agaves tienen asociaciones micorrícicas cuyos huéspedes forman una red fúngica laxa con desarrollo intra e intercelular en la corteza radical de la planta (Safir,

1990). Al brindarles un sustrato aséptico dichas redes lograron proliferar (Orcutt y Nilsen, 2000). En la presente investigación se desinfectaron las diferentes estructuras de *A. victoriae-reginae*, con una solución de etanol al 70%. Las hojas que se encontraban en el exterior de la roseta estuvieron sujetas a un tiempo de exposición de 2-3 min. Mientras que, para las hojas internas de la roseta el tiempo fue de 1-2 min. Los tallos estuvieron expuestos de 1-2 min y las raíces de 3 a 4 min. Salazar (2009) utilizó yemas axilares de *A. cocui* y las desinfectó con etanol 70% durante 1 min, mientras que Garnica (2008) usó vainas (base foliar) de *A. difformis*, las cuales desinfectó con etanol 70% durante 30 segundos. Robert (1987) empleó explantes de vaina (base foliar) de *A. fourcroydes* y el tiempo de desinfección en etanol al 70% fue de 5 min. Hazra (2002) desinfectó brotes de *A. sisalana* en etanol 70% durante 5 min. Finalmente, para la desinfección de semillas de *A. victoriae-reginae*, Martínez-Palacios (2003) utilizó etanol 70% durante 1 min. El hipoclorito de sodio concentrao elimina bacterias y esporas de hongos (Baker, 2000). El tiempo en el cual los explantes estuvieron expuestos a hipoclorito de sodio fue diverso. Las hojas internas de la roseta estuvieron expuestas 15 min a hipoclorito de sodio, mientras que las hojas externas por 20 min, los tallos 15 a 20 min y las raíces 30 min. Robert (1987) utilizó una solución con cloro comercial (1.5% NaOCl) durante 35 min para desinfectar los entrenudos de *A. fourcroydes*, mientras que Salazar (2009) utilizó (2.5% v/v NaOCl) por 5 min para desinfectar yemas adventicias de bulbilos de *A. cocui*. También, Salazar (2009) utilizó rizomas de *A. fourcroydes* los cuales permanecieron sumergidos en una solución (5% v/v NaOCl) durante 20 min y dentro de la campana de flujo laminar se volvieron a sumergir en una solución (2.5% v/v NaOCl) durante 3 min. Martínez-Palacios (2003) utilizó una solución de cloro comercial (1.2% v/v NaOCl) durante 20 min para las semillas de *A. victoriae-reginae*. El hipoclorito de sodio es un agente ampliamente utilizado para desinfectar explantes, sin embargo, el exceso de éste puede provocar severos daños. Valdés (2010) utilizó explantes foliares de *Dahlia tenuicaulis* los cuales sumergió en una solución de hipoclorito de sodio 20 % (v/v) durante 10 min; reportó un 100% en desinfección en las primeras pruebas. Aunque los explantes de hojas presentaron clorosis en forma de círculos pequeños bien definidos, provocando en aquellos explantes menores

a 1 cm² su muerte en un periodo de 14 días aproximadamente; esto se atribuye a su proceso de desinfección.

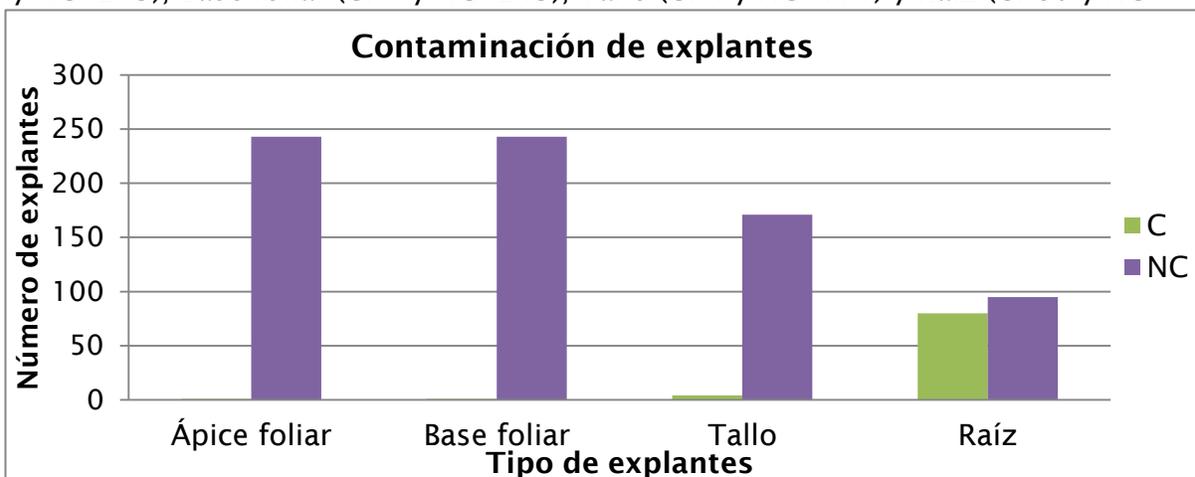
8.3 Siembra *in vitro*

El logro del CTV depende sustancialmente del medio de cultivo empleado. Para establecer un sistema de siembra *in vitro* se elabora primero un medio de cultivo que se ajuste a los principales requerimientos nutricionales de la especie vegetal, tipo de explante y sistema de cultivo. La efectividad de un cultivo depende tanto de los ingredientes básicos, azúcares y hormonas, como del agente gelificante (Romberger y Tabor, 1971). En condiciones asépticas, todos los explantes de hoja, tallo y raíz recibieron dos enjuagues con una solución antioxidante de ácido ascórbico y ácido cítrico 150 mg/500 ml de cada uno. El ácido ascórbico (10-100 mg/L) se considera benéfico en algunos casos debido probablemente a su capacidad para actuar como un agente reductor y para retrasar la formación de sustancias similares a la melanina, que inhiben el crecimiento, y no debido a su papel como vitamina (George, 2008; Smith, 2000). Murashige (1962), sugirió tanto el sumergimiento previo de los explantes dentro de una solución antioxidante con ambos ácidos ascórbico y cítrico, así como su adición al medio de cultivo y durante la siembra de los explantes para interrumpir la oxidación de los fenoles. Existen distintos reportes en CTV que avalan el uso de antioxidantes: Saucedo (2006) para *Cephalocereus apicicephalum* reportó el control de la oxidación al sumergir los explantes dentro de una solución de ácido cítrico (100 mg/L) y ácido ascórbico (250 mg/L) durante 30 min. Lara (2010), al término del proceso de desinfección, sumergió los explantes de tallo de *Aporocactus flagelliformis* en una solución de ácido ascórbico (250 mg/L) y ácido cítrico (250 mg/L). Gómez (2010) para *Chamaedorea elegans* sumergió los explantes foliares en una solución antioxidante (250 mg/L de ácido ascórbico y ácido cítrico 1:1 v/v) durante 3 h y reportó que la oxidación disminuyó hasta un 40%. Vargas (1988) describió que entre mayor sea el tiempo de exposición de los explantes al agente antioxidante se obtendrá un menor porcentaje de oxidación.

8.4 Contaminación de explantes

Después de 20 días iniciados los cultivos, se observó contaminación fúngica en los cuatro tipos de explantes: ápices foliares, bases foliares, tallo y raíz (Figura 23). De 244 explantes de ápices foliares solamente uno presentó contaminación en las bases foliares. También, los explantes de tallo presentaron contaminación. En 4 de 175 explantes se observó crecimiento fúngico en el explante, lo que corresponde aproximadamente a un 2% de contaminación. Tanto los explantes de hoja (ápices y bases) como los de tallo respondieron adecuadamente al protocolo de desinfección (Figura 24). Se observó contaminación severa en los explantes de raíz, 35 de los 175 explantes se contaminaron. Después de 25 días la contaminación incrementó, ya que 60 de los 140 explantes restantes presentaron contaminación fúngica; es decir, más del 40% de explantes murieron debido a contaminación (Tabla 10). Los hongos comenzaron a crecer a partir del interior del explante, lo que sugiere que éstos se encontraban de manera endógena, posiblemente formando asociaciones micorrícicas. Es importante mencionar que, de los tres tipos de explantes utilizados en esta investigación, las raíces fueron las que más contaminación presentaron. Para evaluar diferencias significativas en los niveles de contaminación entre diversos explantes se utilizaron las pruebas estadísticas no paramétricas Chi-cuadrada y exacta de Fisher.

Figura 23.Contaminación de explantes sembrados en MS 50%. Ápice foliar (C: 1 y NC: 243), Base foliar (C: 1 y NC: 243), Tallo (C: 4 y NC: 171) y Raíz (C: 80 y NC: 95).



95). Abreviaturas: C: contaminados y NC: no contaminados.

Tabla 10. Resultados significativos de contaminación de explantes para los distintos tratamientos con RCV después de un mes iniciado el cultivo

Número de tratamiento	BA/2,4-D (mg/L)	Explantes								P
		Ápice foliar		Base foliar		Tallo		Raíz		
		C	NC	C	NC	C	NC	C	NC	
1	1/0	0	7	0	7	0	5	2	3	<0.0001*
2	0.5/0.1	0	7	0	7	0	5	1	4	<0.0001*
6	1/0.1	0	7	0	7	0	5	1	4	<0.0001*
9	2/0.1	0	7	0	7	0	5	1	4	<0.0001*
10	3/0.1	0	7	0	7	1	4	2	3	<0.0445
12	0.5/0.5	0	7	0	7	0	5	1	4	<0.0001*
15	3/0.5	0	7	0	7	0	5	1	4	<0.0001*
16	0/1	0	7	0	7	0	5	2	3	<0.0001*
17	0.5/1	0	7	0	7	0	5	2	3	<0.0001*
18	1/1	0	7	0	7	0	5	1	4	<0.0001*
19	2/1	0	7	0	7	0	5	1	4	<0.0001*
20	3/1	0	7	0	7	1	4	0	5	<0.0001*
22	0.5/2	0	7	0	7	0	5	2	3	<0.0001*
24	2/2	0	7	0	7	0	5	2	3	<0.0001*
27	0.5/3	0	7	0	7	0	5	1	4	<0.0001*
29	2/3	0	7	0	7	0	5	5	0	<0.0001*
30	3/3	0	7	0	7	0	5	2	3	<0.0001*
33	¼	0	7	0	7	0	5	1	4	<0.0001*

Abreviaturas: C: contaminados, NC: no contaminados y * $P < 0.05$ para la prueba estadística de Fisher.

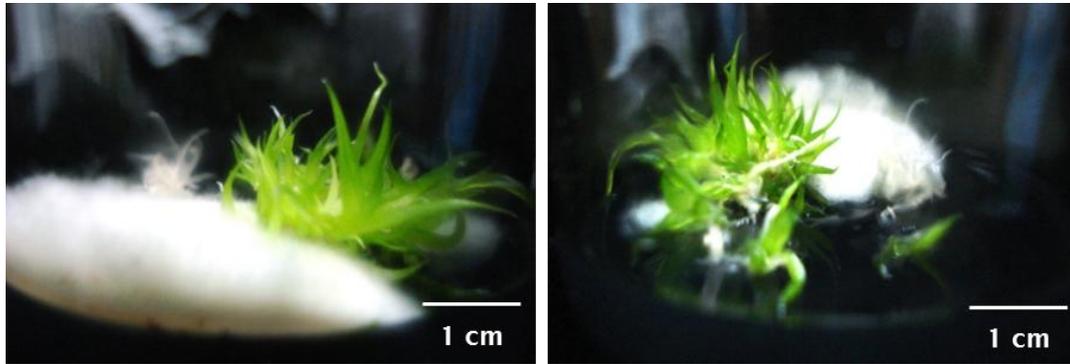


Figura 24. Contaminación después de 60 días de plantas *in vitro* de *A. victoriae-reginae*. La contaminación fúngica presentó textura algodonosa y voluminosa, el color variaba de blanco a grisáceo.

Se realizaron las mismas pruebas estadísticas para evaluar contaminación entre explantes usando cada RCV (BA y 2,4-D) por separado (Tablas 11 y 12). Para 6 diferentes concentraciones de citocininas, 5 resultaron significativas ($P < 0.05$) para contaminación en raíz usando la prueba de chi-cuadrada y, posteriormente, pruebas pareadas de Fisher (Tabla 11). Asimismo, se encontró contaminación en raíz en las 7 diferentes concentraciones de auxinas (2,4-D) utilizadas en esta investigación ($P < 0.05$; Tabla 12). Lo anterior sugiere que la raíz, con o sin RCV, es el explante más susceptible a contaminación. Como se mencionó anteriormente, esto se debe quizá a la presencia de hongos sistémicos en la planta madre previo al proceso de propagación vegetativa.

Tabla 11. Resultados significativos de contaminación de explantes con el empleo de citocininas (BA) (después de un mes iniciado el cultivo)

Citocinina BA (mg/L)	Explantes								P
	Ápice foliar		Base foliar		Tallo		Raíz		
	C	NC	C	NC	C	NC	C	NC	
0.0	1	48	1	48	2	33	8	27	<0.0015*
0.5	0	49	0	49	1	34	7	28	<0.0001*
1.0	0	49	0	49	1	34	7	28	<0.0001*
2.0	0	49	0	49	0	35	5	30	<0.0006*
3.0	0	49	0	49	0	35	8	27	<0.0001*

Abreviaturas: C: contaminados, NC: no contaminados y* $P < 0.05$ para la prueba estadística de Fisher.

Tabla 12. Resultados significativos de contaminación de explantes con el empleo de auxinas (2,4-D) (después de un mes iniciado el cultivo)

Auxina 2,4-D (mg/L)	Explantes								P
	Ápice foliar		Base foliar		Tallo		Raíz		
	C	NC	C	NC	C	NC	C	NC	
0.0	0	35	0	35	1	24	10	15	<0.0001*
0.1	1	34	0	35	1	24	7	18	<0.0002*
0.5	0	35	0	35	1	24	8	17	<0.0001*
1.0	0	35	0	35	0	25	1	24	<0.0001*
2.0	0	35	1	34	0	25	5	25	<0.0017*
3.0	0	35	0	35	1	24	3	22	<0.0158*
4.0	0	35	0	35	0	25	1	24	<0.0001*

Abreviaturas: C: contaminados, NC: no contaminados y * $P < 0.05$ para la prueba estadística de Fisher.

Dichos resultados se mantienen realizando las mismas pruebas estadísticas para proporción total de explantes contaminados entre ápice foliar, base foliar, tallo y raíz (Tabla 13). Existen diferentes estudios que apoyan la relación hongo-*Agave*. Cui y Nobel (1992) describieron el porcentaje de colonización y relación entre huésped y hospedero, el cual fue de 64% para *A. tequilana*. Aunque está comprobado que en vida silvestre esta asociación incrementa la asimilación de CO₂, también modifica las relaciones hídricas de las plantas mediante diferentes mecanismos, los cuales incluyen una ampliación en el área de superficie de raíces, regulación estomática y resistencia en el transporte de agua y de solutos (Ruíz-Lozano y Azcón, 1995; Orcutt y Nilsen, 2000).

Tabla 13. Contaminación de explantes (ápice y base foliar, tallo y raíz)

	Ápice	Base	Tallo	Raíz
Contaminados	1	1	4	35
No contaminados	244	244	171	140
$X^2 = 303.23,$ $gl = 3$ $P < 0.0001$				

Otro factor importante es que los agaves, antes de la siembra *in vitro*, fueron regados una vez por semana durante un mes. Además, recibieron luz solar de manera indirecta a través de una ventana. Las raíces de los agaves crecen de manera superficial, lo cual facilita la absorción de agua de lluvia, generalmente escasa, que sólo humedece la superficie del suelo (García-Mendoza, 2007). Al incrementar la cantidad de agua en el sustrato, microorganismos como los hongos tuvieron la oportunidad de invadir las raíces de la planta y reproducirse en estas estructuras.

8.5 Control de oxidación para los cultivos de hoja (Carbón activado v/s PVP)

A pesar de las medidas de prevención con los enjuagues de ácidos ascórbico (150 mg/ 500 ml) y cítrico (150 mg/ 500 ml), la oxidación de explantes se presentó desde los primeros cinco días iniciados los cultivos. Este proceso se observó en los cuatro tipos de explantes analizados (ápices y bases foliares, tallo y raíz). Sin embargo, al contar con mayor número de explantes de hoja (ápices y bases) se hicieron dos tipos de medio de cultivo, 122 explantes de ápices foliares se sembraron en MS 50% con PVP (2 g/L) y 122 en MS 50% con carbón activado (1 g/L), del mismo modo para los explantes de bases foliares.

Con la finalidad de comparar la efectividad entre un antioxidante como el PVP (2 g/L) y un adsorbente como el carbón activado (1 g/L) se realizaron pruebas estadísticas (ANOVA, Tukey y Exactas de Fisher). Ambos tratamientos estuvieron en oscuridad durante 20 días, debido a que la exposición de los cultivos a la luz incrementa la actividad de las enzimas tanto en la biosíntesis como en la oxidación de los fenoles (George y Sherrington, 1984).

Los explantes de hoja tanto ápices como bases comenzaron a oxidarse en los lugares donde se realizaron incisiones con el bisturí. Los explantes presentaron una coloración que varió de café oscuro a negro. Esto se debe a la liberación al medio de compuestos fenólicos por parte de los explantes (Murthy y Pyati, 2001). La respuesta de las plantas ante el estrés es un factor clave en el desarrollo de

células, tejidos y órganos (Pasternak, 2005). Para mitigar el efecto de la oxidación que recibieron los explantes en *A. cocui*, Salazar et al. (2009) realizaron distintos enjuagues en soluciones antioxidantes de ácidos cítricos y ascórbicos, aunque muchos explantes murieron debido a necrosis. Este fenómeno concuerda con los resultados obtenidos en la presente investigación.

8.5.1 Ápices foliares

A los 60 días en medio de inducción con PVP (2 g/L), ningún explante en los 14 tratamientos logró mostrar respuestas morfogénicas; solamente varió la coloración café, mostrando en la mayoría de los explantes un estadio avanzado de oxidación (Figura 25). Esta oxidación gradual comenzó desde el día 5, cuando la mayoría de explantes se encontraron oxidados. Zaid et al. (1987) describieron este proceso como un tipo de respuesta que conlleva a la senescencia de los explantes. En 72 de los 98 explantes que concluyeron la etapa de inducción, se presentó una coloración café con exudaciones fenólicas, lo que equivale a un 73% de oxidación (Figura 26). El tratamiento con más incidencias de oxidación fue el adicionado con 2 mg/L de 2,4-D ($P = 0.0291$; Tabla 14). Posiblemente esto se debió a que las auxinas y el 2,4-D en altas concentraciones pueden resultar tóxicos para las plantas. Por lo mismo, se recomienda el subcultivo a medios que contengan auxinas alternas (Woodward y Bartel, 2005). Dado que los explantes en todos los tratamientos, incluidos el control, se oxidaron, se puede concluir que los reguladores de crecimiento no influyeron en la oxidación. Esto concuerda con lo registrado por Martínez-Palacios (1998), quien cultivó segmentos de hojas de plántulas germinadas *in vitro* de *A. victoriae-reginae* y obtuvo altos porcentajes de oxidación en todos los tratamientos de inducción reportando hasta el 100% de necrosis en varios de ellos.

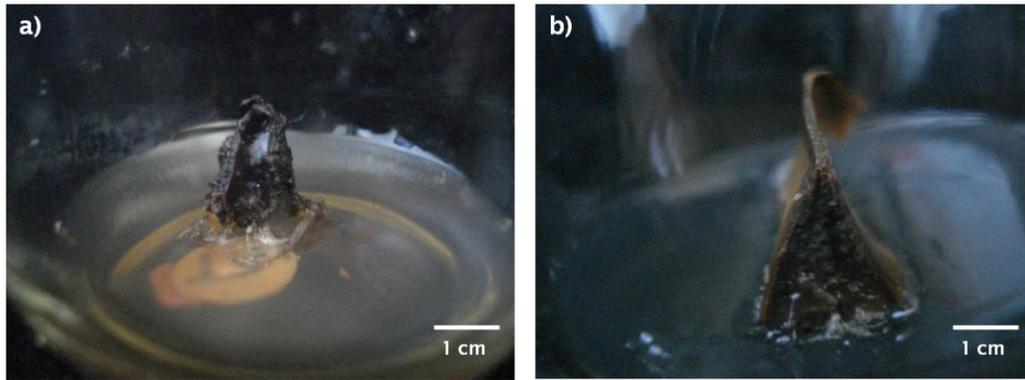


Figura 25. Oxidación después de 15 días de explantes *in vitro* de ápices foliares de *A. victoriae-reginae* en MS 50% con PVP (2 g/L). La excesiva producción fenólica cambió el color del medio de cultivo, de transparente a café rojizo e incluso negro.

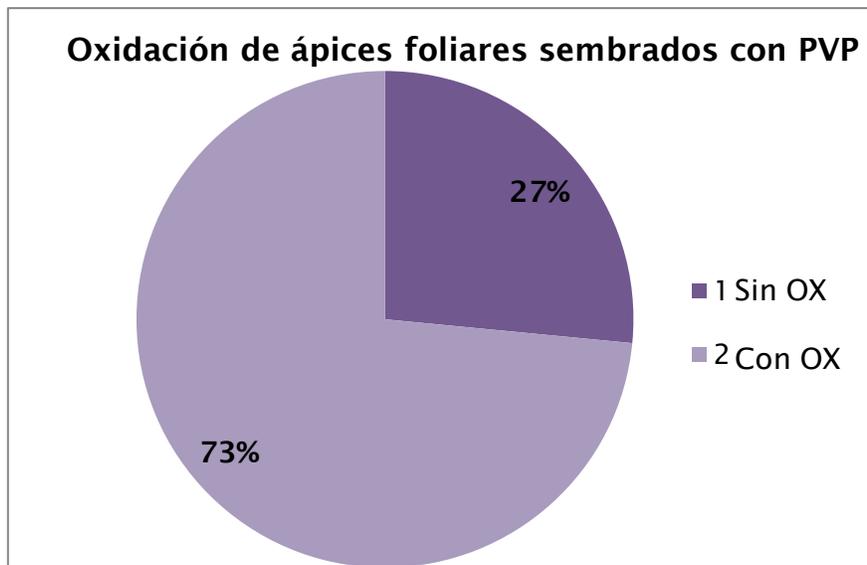


Figura 26. Porcentaje de explantes oxidados de ápices foliares de *A. victoriae-reginae* sembrados en MS 50% con PVP (2 g/L). Abreviatura: OX: Oxidación.

La respuesta con el carbón activado fue inversamente proporcional a la obtenida con el PVP, ya que de 98 explantes sembrados en MS 50% con carbón activado (1 g/L), solamente 15 se oxidaron, lo que equivale al 15% del total de casos (Figura 27). Los explantes presentaron poca oxidación en la región donde se realizó el corte. En este sentido, la oxidación avanzó poco y no se registraron

casos severos o letales. Después de 15 días comenzó la formación de callo (Figura 28). A los 30 días de inducción seguían mostrando una coloración que varió de verde olivo a amarillo, en los tratamientos sin señales de oxidación. Además, en 50 de los 98 explantes comenzaron a formar estructuras piriformes, incluso en aquellos explantes que presentaron algún grado de oxidación. La generación de embriones incrementa cuando se aplican altas concentraciones de auxinas, siendo el 2,4-D el más activo (George et al. 2008).

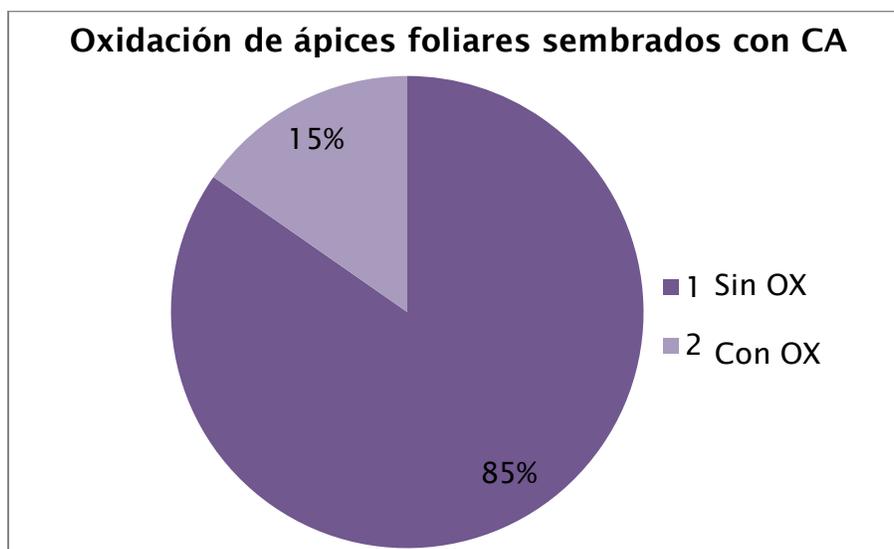


Figura 27. Porcentaje de explantes oxidados de ápices foliares de *A. victoriae-reginae* sembrados en MS 50% con carbón activado (1 g/L). Abreviaturas: OX: Oxidación y CA: carbón activado.

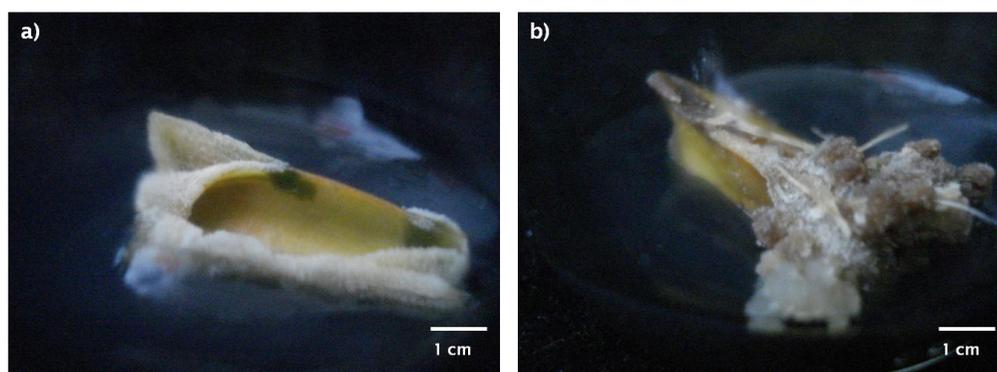


Figura 28. Oxidación después de 15 días de explantes *in vitro* de ápices foliares de *A. victoriae-reginae* en MS 50% con carbón activado (1 g/L).

Para demostrar las diferencias significativas entre cada grupo de antioxidantes (carbón activado y PVP) empleados en el medio de cultivo, se hicieron 14 pruebas independientes de Fisher. En la Tabla 14 se muestran los resultados tanto significativos ($P < 0.05$) como no significativos ($P > 0.05$).

Tabla 14. Valores de las pruebas estadísticas entre los grupos de antioxidantes para explantes de hoja región apical

Número de tratamiento	Concentración RCV BA/ 2,4-D (mg/L)	Explantos				P
		Ápices foliares				
		PVP		CA		
		OX	NOX	OX	NOX	
1	0/0	5	2	1	6	<0.1026
2	0.5/0	3	4	3	4	> 0.9999
6	0/0.1	6	1	1	6	<0.0291*
7	0.5/0.1	5	2	0	7	<0.021*
11	0/0.5	4	3	0	7	<0.0699
12	0.5/0.5	6	1	0	7	<0.0047*
16	0/1	5	2	1	6	<0.1026
17	0.5/1	5	2	2	5	<0.2861
21	0/2	6	1	1	6	<0.0291*
22	0.5/2	3	4	3	4	> 0.9999
26	0/3	5	2	1	6	<0.1026
27	0.5/3	5	2	1	6	<0.1026
31	0/4	7	0	0	7	<0.0006*
32	0.5/4	7	0	1	6	< 0.0001*

Abreviaturas: OX: Oxidado, NOX: No oxidado y * $P < 0.05$ para la prueba estadística de Fisher.

Los tratamientos que presentaron diferencias significativas entre el empleo del carbón activado y PVP para los explantes de ápices foliares fueron: T6, T7, T12, T21, T31 y T32 (Tabla 14). Cuatro de estos seis tratamientos tuvieron una mayor concentración de auxinas (2,4-D) que de citocininas (BA). Martínez Palacios (1991) reportó hasta un 40% de necrosis en explantes *in vitro* de *A. victoriae-reginae*, debido a altas concentraciones de 2,4-D. También, Ayala (2010) registró en *A. atrovirens* un 100% de oxidación en los embriones cigóticos sembrados *in vitro* con altas concentraciones de auxinas. De igual forma Bairu et al. (2009) observó en cultivos a partir de hojas de *Harpagophytum procumbens*, una rápida oxidación en callos sembrados con auxinas, las cuales potenciaron el proceso de oscurecimiento en los explantes.

8.5.2 Bases foliares

Los explantes al inicio del cultivo presentaron una coloración verde olivo. Después de los primeros 10 días los explantes comenzaron a mostrar señales de oxidación (Figura 29), siendo esta más severa en el tratamiento adicionado con 0.5 mg/L 2,4-D ($P = 0.021$; Tabla 15). La oxidación no estuvo relacionada con los RCV empleadas, ya que el grupo control también presentó oxidación. En general, de 98 explantes sembrados en MS 50% adicionado con PVP (2 g/L), 61 explantes mostraron oxidación, lo que equivale al 62% del total de explantes (Figura 30). Todos estos cultivos presentaron un color café oscuro y en la mayoría de los casos los explantes no perdieron su identidad. También, el medio de cultivo adquirió un color que varió de café oscuro a café rojizo debido a la producción fenólica.

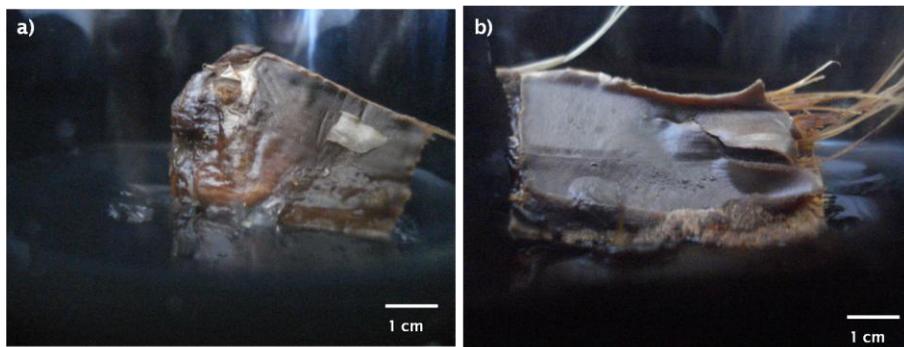


Figura 29. Oxidación después de 15 días de explantes *in vitro* de bases foliares de *A. victoriae-reginae* en MS 50% con PVP (2 g/L). El medio de cultivo cambió de color debido a la excesiva producción fenólica.

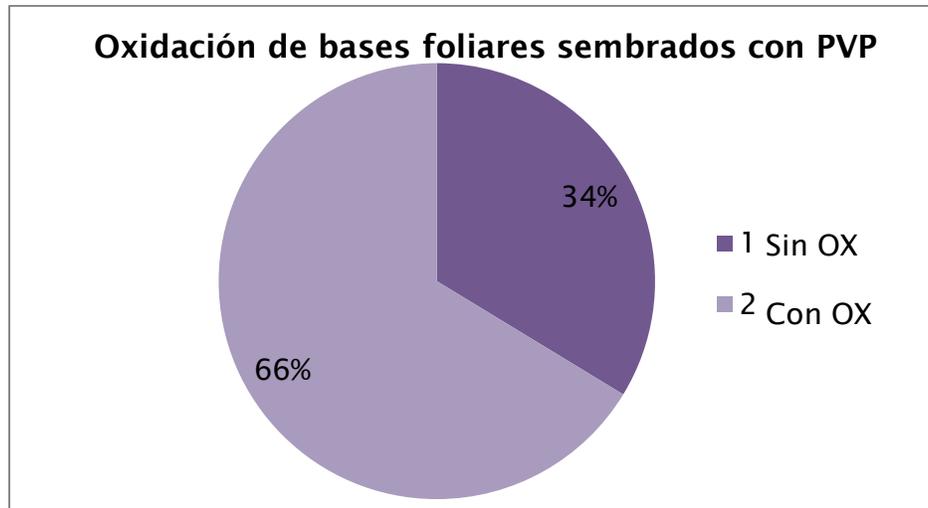


Figura 30. Porcentaje de explantes oxidados de bases foliares de *A. victoriae-reginae* en MS 50% con PVP (2 g/L). Abreviatura OX: Oxidación.

Los segmentos de ápices foliares sembrados en MS 50% adicionado con carbón activado (1g/L) presentaron una coloración verde olivo. A los 10 días se observó un poco de oxidación (Figura 31a). Sin embargo, de 98 explantes sólo 19 presentaron oxidación, lo que equivale al 19% (Figura 32). El tratamiento 22 (BA/2,4-D 0.5/2 mg/L) fue el que presentó mayor oxidación ($P = 0.0291$; Tabla 15), ya que de siete explantes sembrados bajo las mismas condiciones seis presentaron oxidación. Cuando se utilizó este tratamiento, se observó un crecimiento limitado, que en algunos casos se debió a oxidación basal que progresó al resto del tejido (Figura 31b). El carbón activado (0.1% a 5%) incorporado al medio ha mostrado ser de utilidad en el cultivo de diferentes explantes, posiblemente por adsorber los metabolitos secundarios que suelen ser tóxicos (Roca y Mronginski, 1991). En este sentido, el medio de cultivo suele tener una red muy fina de poros con gran área de superficie interna, la cual es indispensable para el crecimiento y desarrollo celular al adsorber compuestos inhibidos en el medio de cultivo y disminuir la cantidad de metabolitos tóxicos producidos por exudación fenólica (Smith, 2000; George, 2008). Sin embargo, el carbón activado también tiene la desventaja de adsorbe vitaminas, iones metálicos y RCV (Smith, 2000). Otra ventaja del carbón activado es que elimina el 5-hidroximetilfurfural (HMF) producido como resultado de esterilizar el medio de

cultivo en autoclave y que se forma a partir de la deshidratación de la sacarosa, lo cual puede inhibir el desarrollo celular (George, 2008).

Al término de los 75 días de inducción, los explantes mostraron diferentes colores: verde olivo, amarillo, crema, verde claro y café oscuro. La mayoría de los explantes lograron diferenciarse y producir callos, brotes y embriones somáticos.

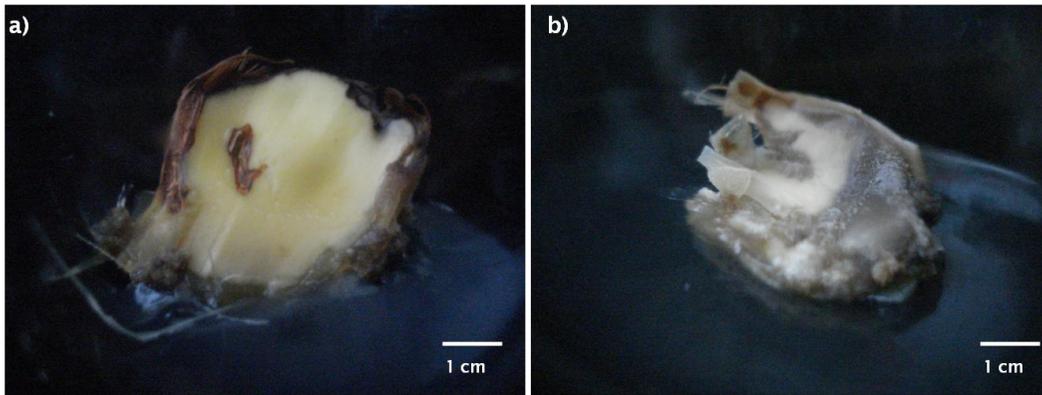


Figura 31. Oxidación después de 15 días de explantes *in vitro* de bases foliares de *A. victoriae-reginae* en MS 50% con carbón activado (1 g/L).

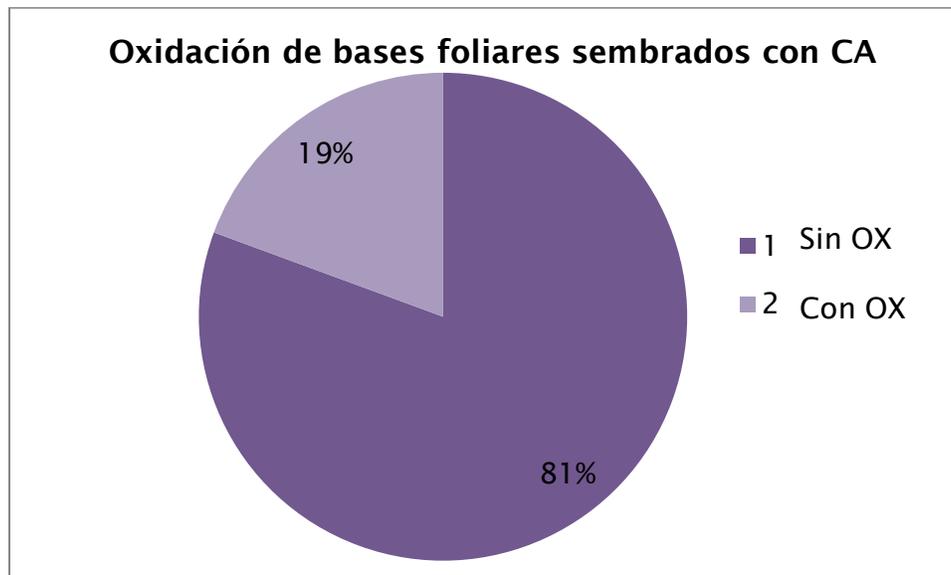


Figura 32. Porcentaje de explantes oxidados de bases foliares de *A. victoriae-reginae* sembrados en MS 50% con carbón activado (1 g/L). Abreviaturas: OX: Oxidación.

Tabla 15. Valores de las pruebas estadísticas entre los grupos de antioxidantes para explantes de hoja región basal

Número de tratamiento	Tratamiento BA/2,4-D (mg/L)	Explantes				P
		Bases foliares				
		PVP		CA		
		OX	NOX	OX	NOX	
1	0/0	4	3	0	7	<0.0699
2	0.5/0	5	2	0	7	<0.021*
6	0/0.1	4	3	0	7	<0.0699
7	0.5/0.1	3	4	3	4	> 0.9999
11	0/0.5	5	2	0	7	<0.021*
12	0.5/0.5	2	5	0	7	<0.4615
16	0/1	4	3	4	3	<0.5921
17	0.5/1	6	1	3	4	<0.2657
21	0/2	4	3	0	7	<0.0699
22	0.5/2	6	1	1	6	<0.0291*
26	0/3	4	3	3	4	> 0.9999
27	0.5/3	4	3	2	5	<0.5921
31	0/4	5	2	2	5	<0.2861
32	0.5/4	5	2	1	6	<0.1026

Abreviaturas: OX: oxidado, NOX: no oxidado y * $P < 0.05$ para la prueba estadística de Fisher.

Los tratamientos que presentaron diferencias significativas entre el empleo del carbón activado o del PVP para los explantes de ápices foliares utilizando pruebas independientes de Fisher fueron: T2, T11 y T22 (Tabla 15). Dos de los tres tratamientos que mostraron diferencias significativas ($P < 0.05$) en el número de explantes con oxidación presentaron altas concentraciones de auxinas que de citocininas (Tabla 15). A diferencia de los tratamientos a los que se les adicionó carbón activado, se observó que en todos los explantes a los que se les adicionó PVP se presentaron oxidación. De 14 tratamientos 6 no tuvieron ningún explante oxidado: T1, T2, T6, T11, T12 y T21 (Tabla 15).

Las respuestas de las plantas ante el estrés son un factor clave en el desarrollo de células, tejidos y órganos (Pasternak, 2005). La producción de especies reactivas al oxígeno (ROS) es cuidadosamente controlada por la planta (Hancock,

2001), en la cual existe un equilibrio dinámico entre la formación de ROS y la actividad antioxidante (Mittler, 2002). Sin embargo, cuando las plantas son expuestas a estrés abiótico, se acumulan altas concentraciones de ROS, causando un daño oxidativo a nivel celular y molecular (Vranova, 2002) que a su vez conduce a una disminución en la productividad de la planta (Mittler et al.1999; Mittler, 2002). ROS rápidamente puede oxidar la membrana lipídica, proteínas y otros organelos celulares, conduciendo a una disfunción o atrofia de los mismos (Vranova, 2002). Para protegerse de la oxidación ROS, las plantas liberan diferentes concentraciones de radicales libres, enzimas como el ascorbato peroxidasa (APX), catalasas, superóxido dismutasa y, en bajas concentraciones, los tocofenoles (Hancock et al. 2001). La capacidad de las plantas para contrarrestar las condiciones de estrés depende de la eficiencia y velocidad para generar moléculas de protección (Neill et al.2002). La mayoría de los agaves son susceptibles a tener oxidación. Distintas investigaciones sugieren que este es uno de los mayores problemas de la siembra *in vitro* para dicho género. Por ejemplo, Martínez Palacios (1991) reportó altos porcentajes de oxidación en todos los tratamientos (hasta del 100% de necrosis en varios de ellos) en cultivo de segmentos de hojas de plántulas clon de *A. victoriae-reginae*. Estos explantes se oxidaron tanto en medio basal como en medios con citocininas (BA), auxinas (2,4-D) y en combinación (BA/2,4-D). Asimismo, Salazar (2009) describió el proceso de oxidación en cultivos *in vitro* de *A. cocui* en yemas axilares durante las primeras dos semanas de tratamiento. Valenzuela-Sánchez (2006) describió la formación de callo a partir de explantes friables, verdes y oxidados del tallo de *A. tequilana*. Ayala (2010) observó en *A. atrovirens* que los callos no desarrollaron ningún tipo de respuesta en alguno de los tratamientos. Únicamente reportó una rápida oxidación que culminó en necrosis total del tejido.

8.6 Inducción a callo

Los explantes de hoja: ápices y bases, tallo y raíz de *A. victoriae-reginae* fueron cultivados en medio de inducción MS 50% con 30 g/L de sacarosa, suplementado con distintas concentraciones de RCV (2,4-D/BA) y sumando 35 tratamientos en total. Después de tres meses de inducción los explantes respondieron de distintas maneras; a pesar de la adición de reguladores de crecimiento vegetal, algunos explantes nunca perdieron su identidad. Otros derivaron en un callo compacto, pequeño y de lento crecimiento. Algunos produjeron callo altamente friable, hiperhidratado, hialino, verde y de rápido crecimiento. Otras respuestas fueron la producción de embriones somáticos y algunos explantes murieron debido al exceso de oxidación (Figuras 33, 34, 35 y 36). En las Tablas 16, 17, 18 y 19 se muestran los resultados obtenidos de inducción de callo de los explantes de *A. victoriae-reginae* con los reguladores de crecimiento 2,4-D y BA.

Tabla 16. Efecto de los reguladores de crecimiento en la inducción de explantes de bases foliares *in vitro* de *A. victoriae-reginae*. Resultados a los 3 meses del inicio de la inducción de los cultivos

RCV 2,4-D mg/L	BA mg/L	0	0.5	1	2	3
0		C	---	C,B	C,B	C,B
0.1		C	C,B	C,B	C,B	C,B
0.5		C	C,B	C,B	C,B	C
1		C	C	C,B	C,B	C,B
2		C,B,E	C,E	C	C,E	C
3		C,E	C	C,E	C,E	C
4		C,E	C,E	C,E	C	C,E

Abreviaturas: C: Callo, B: Brotes, E: Embriones, (---): sin respuesta

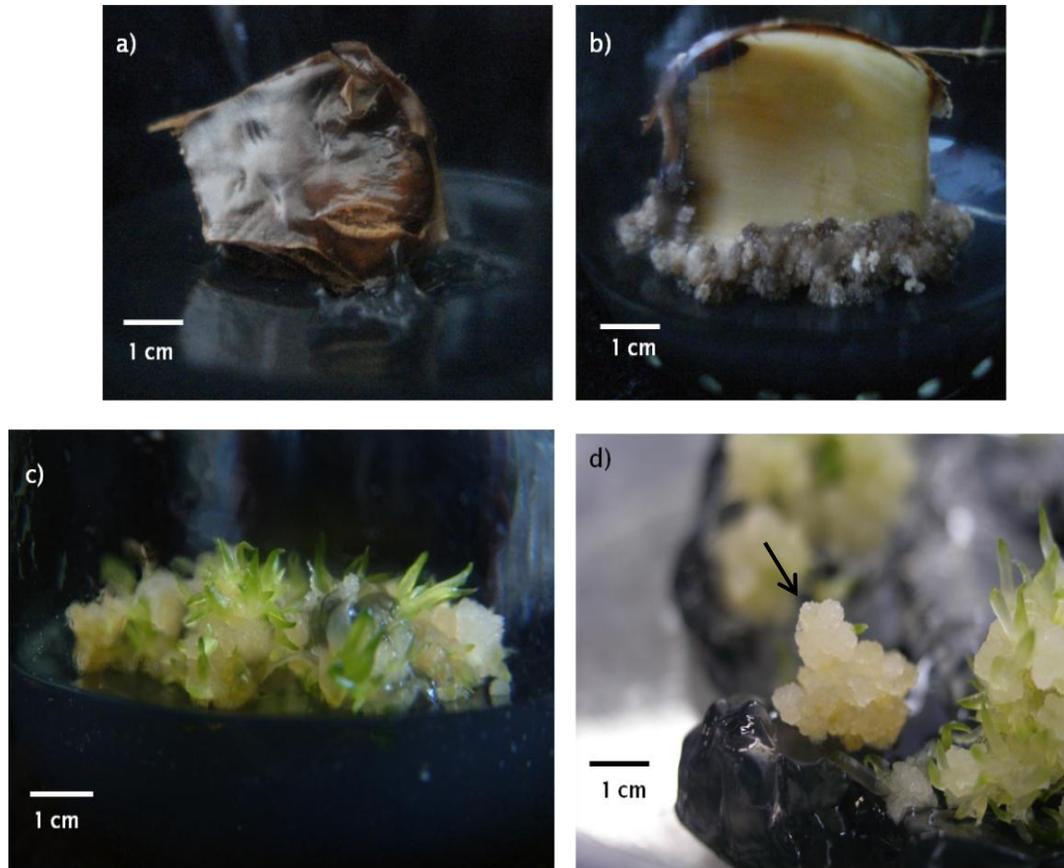


Figura 33. Respuestas de explantes de base foliar sembrados en MS 50% con carbón activado (1 g/L): **a)** T2 el explante nunca perdió su identidad, presentó mucha oxidación que culminó en su muerte, **b)** T6 formación de callo en la región basal (2-4 cm²) con poca biomasa, de color blanco pajizo a café oscuro, compacto y escaso, **c)** T31 embriones somáticos asincrónicos hialinos con plántulas de color verde intenso a amarillo pajizo y **d)** T32 la flecha negra señalará un conglomerado de embriones somáticos de color hialino.

Tabla 17. Efecto de los reguladores de crecimiento en la inducción de explantes de ápices foliares *in vitro* de *A. victoriae-reginae*. Resultados a los 3 meses del inicio de la inducción de los cultivos

RCV	BA	0	0.5	1	2	3
2,4-D	mg/L					
0		---	C	B,C	C	C
0.1		C	C,B	C	C	C
0.5		C	C,B	C	C	C
1		C	C	C	C	C
2		C	C,E	C,E	C	C
3		C,B,E	C,E	C,E	C	C
4		C,B,E	C,E	C,B,E	C	C

Abreviaturas: C: Callo, B: Brotes, E: Embriones, (---): sin respuesta

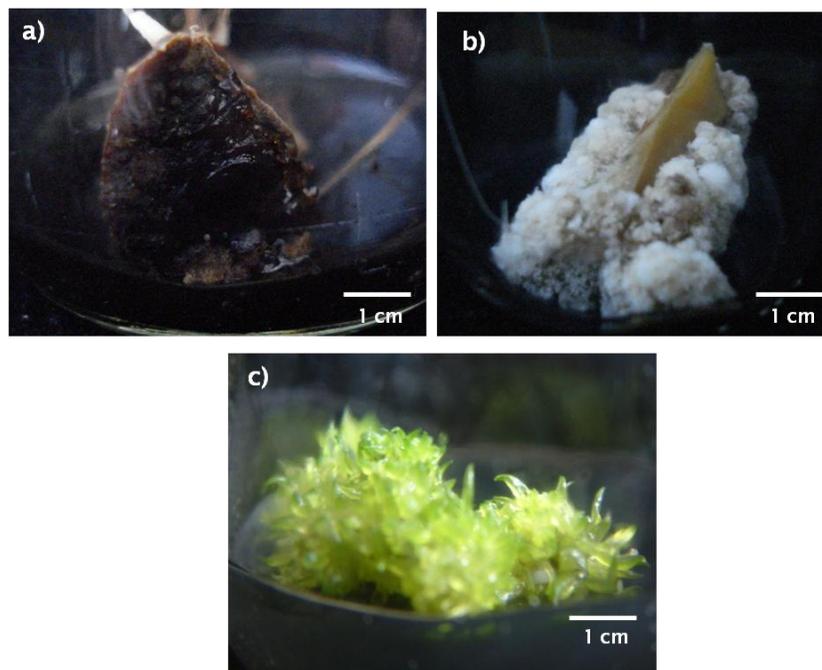


Figura 34. Respuesta de explantes de ápices foliares sembrados en MS 50% con carbón activado (1 g/L): **a)** T1 el explante nunca perdió su identidad, presentó mucha oxidación con secreciones de metabolitos secundarias de color café, **b)** T9 formación de callo en la región basal (2-5 cm²) con poca biomasa, de color blanco a café oscuro, compacto, granuloso y escaso y **c)** T26 embriones somáticos asincrónicos, con mucha biomasa (3- 6 cm²) algunos hialinos, otros de color verde intenso a amarillo con plántulas de color verde.

Tabla 18. Efecto de los reguladores de crecimiento en la inducción de explantes de tallo *in vitro* de *A. victoriae-reginae*. Resultados a los 3 meses del inicio de la inducción de los cultivos

RCV 2,4-D mg/L	BA mg/L	0	0.5	1	2	3
0		B	B	B	B	B
0.1		B	B	B	B	B
0.5		B	B	C	B	B
1		B	B	B	B	B
2		B,E	B	C,E	C,E	B
3		B,E	B,E	C,E	C,E	B
4		B,E	B,E	C,E	C,E	B

Abreviaturas: C: Callo, B: Brotes, E: Embriones

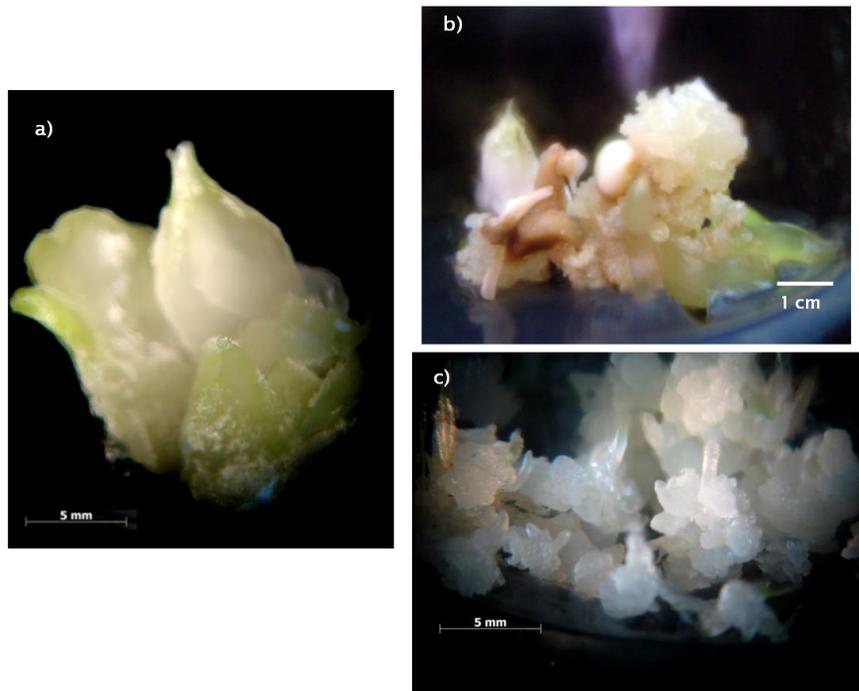


Figura 35. Respuestas de explantes de tallo sembrados en MS 50% con carbón activado (1 g/L): **a)** T1 el explante comienza a formar brotes de folíolos de color blanco a verde en los márgenes de las hojas, **b)** T13 el explante mide entre 3-5 cm², con apertura foliar de color blanco y en las puntas y márgenes de color verde, se observa callo blanco, amarillo, compacto, granuloso, escaso y **c)** T21 conglomerado de embriones somáticos, asincrónicos, con mucha biomasa (3- 8 cm²), hialinos y plántulas germinadas.

Tabla 19. Efecto de los reguladores de crecimiento en la inducción de explantes de raíz *in vitro* de *A. victoriae-reginae*. Resultados a los 3 meses del inicio de la inducción de los cultivos

RCV	BA	0	0.5	1	2	3
2,4-D	mg/L					
0		---	---	---	---	---
0.1		---	---	---	---	---
0.5		---	C,B	---	---	---
1		C,B	---	---	---	---
2		C	---	C	---	---
3		C,B	---	C,E	---	---
4		C	---	C	---	---

Abreviaturas: C: Callo, E: Embriones, (---): sin respuesta

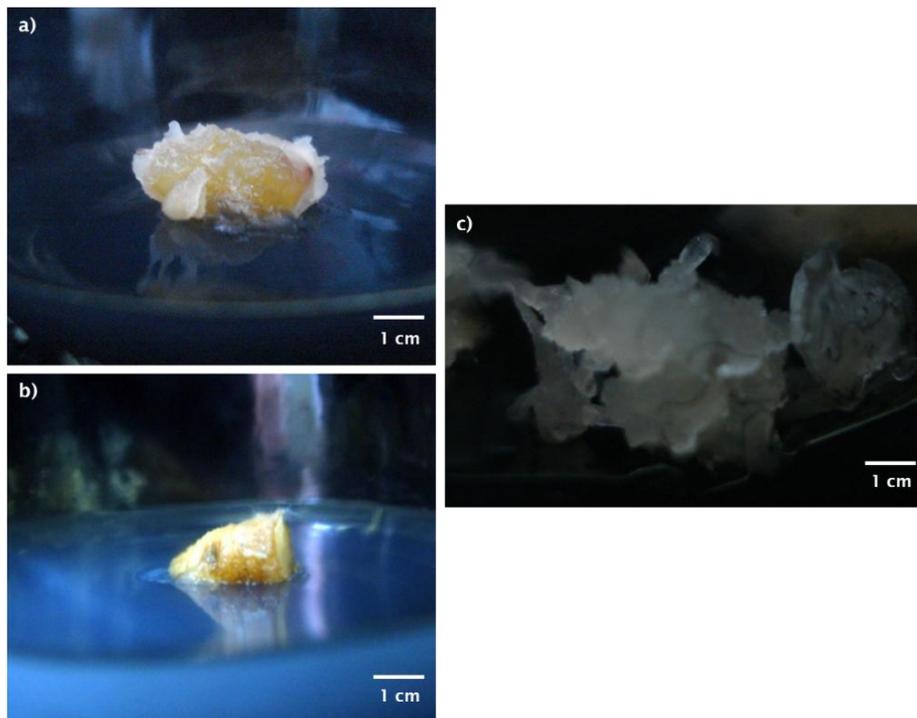


Figura 36. Resultados de explantes de raíz sembrados en MS 50% con carbón activado (1 g/L): **a)** T6 el explante comienza a diferenciarse con poca formación de callo (1-2 cm²) en la región basal, compacto de color amarillo pajizo a café, **b)** T18 el explante nunca perdió su identidad con poca oxidación y **c)** T28 el embriones somáticos hialinos.

8.7 Cultivo de segmentos de Hoja

Los ápices foliares presentaron una coloración verde olivo, mientras que los explantes de las bases foliares, dependiendo de la disposición de la roseta presentaron colores blancos o verdes (Figura 37a). Después de 10 días se observó en los explantes que la coloración verde se tornó verde claro, amarillo, crema e incluso blanco. Este matiz de colores posiblemente se debió a la disminución de plastidios (George, 2008). También se observó un hinchamiento y encorvamiento en los bordes del explante, dando origen al proceso de morfogénesis (Figura 37b). La hiperhidratación en las estructuras foliares se presentó en el 50-60% del total de explantes cultivados con citocininas, los cuales promovieron un engrosamiento acuoso en los tejidos. Los RCV han demostrado promover la hidratación en los explantes (George et al. 2008). Esto concuerda con Gómez (2010), quien observó que en *A. salmiana* más del 40% de brotes presentaron hiperhidratación. Estrada (2015) *com. pers.* describió el mismo fenómeno para las plántulas *in vitro* de *A. comiteco*. Pese a la oxidación que presentaron, la mayoría de los explantes lograron formar callo, órganos y en algunos casos embriones somáticos.

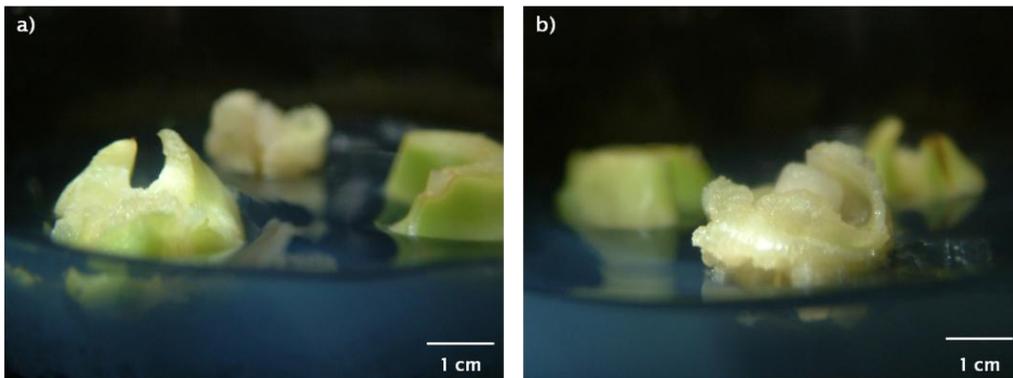


Figura 37. Bases foliares de *A. victoriae-reginae* en MS 50% con carbón activado (1 g/L): **a)** Los explantes muestran una coloración verde claro y amarilla y **b)** El explante presenta colores: blanco y amarillo claro y tiene una textura húmeda con aspecto hiperhidratado.

8.7.1 Descripción del callo

8.7.1.1 Ápices foliares sembradas con PVP

Después de tres meses de inducción, 23 de 98 explantes de ápices foliares sembrados en MS 50% (Figura 38) adicionado con PVP (2 g/L) generaron callos friables, con mucha biomasa (5-7 cm²) cuyos colores variaron de amarillo opaco a café oscuro; en ninguno momento se observó coloración verde, además el callo resultó ser poco compacto. Adicionalmente, 20% de los explantes produjeron callos friables, con biomasa en cantidades intermedias (3-4 cm²) de colores amarillo claro a café oscuro. El 22% de los explantes formaron escaso callo (1-2 cm²) con poca biomasa, cuyos colores variaron de ambarino pajizo a café oscuro; los callos fueron muy friables y de lento crecimiento. Finalmente, el 35% de explantes presentaron una excesiva oxidación, a lo cual le siguió la muerte del explante sin que perdieran su identidad (Figura 39).

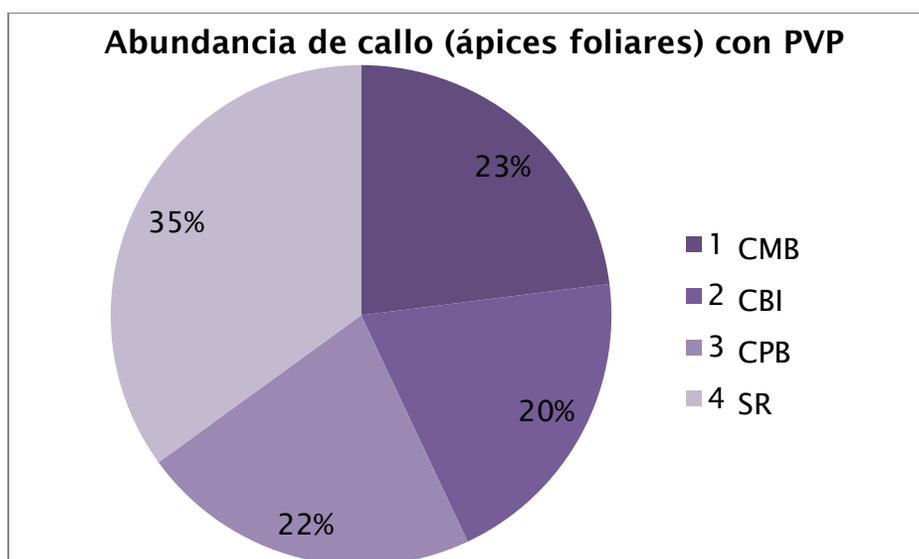


Figura 38. Abundancia de callo de explantes de ápices foliares sembrados con MS 50% y PVP (2 g/L). Abreviaturas: CMB: callo con mucha biomasa (23%), CBI: callo con biomasa intermedia (20%), CPB: callo con poca biomasa (22%) y SR: sin respuesta (35%).

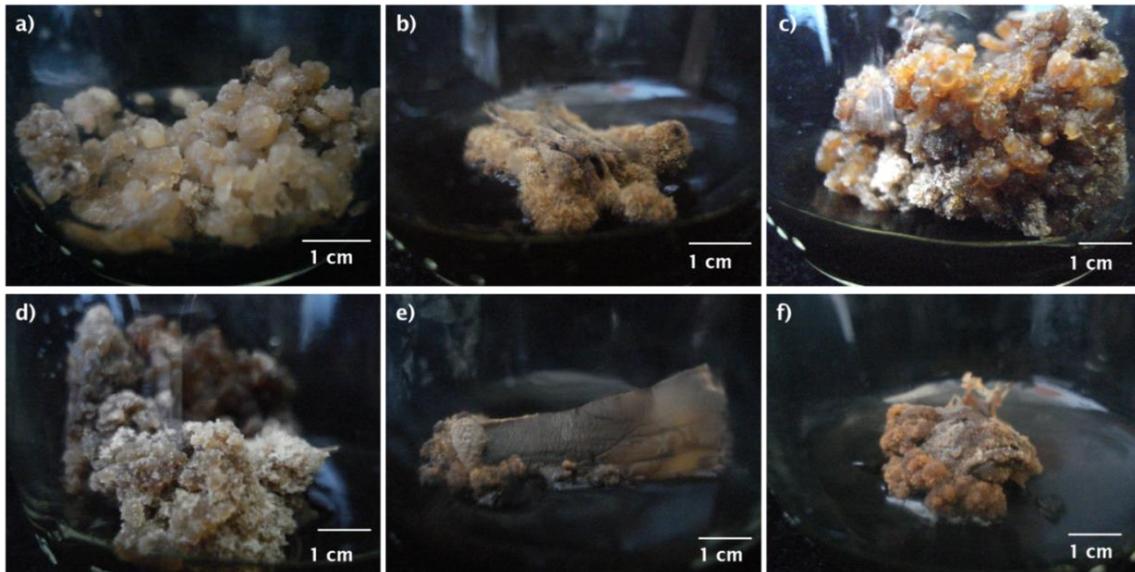


Figura 39. Ápices foliares sembrados en MS 50% con PVP (2 g/L), todos presentan excesiva oxidación tanto en el explante como en el medio de cultivo: **a)** Callo con friabilidad intermedia, compacto, con apariencia nodular y de lento crecimiento, **b)** Explante que no ha perdido su identidad al 100%, formación de callo escaso y compacto en la base que se encuentra en contacto con el medio de cultivo, **c)** Callo poco friable, compacto, apariencia nodular, con estructuras piriformes, **d)** Callo altamente friable, de apariencia húmeda y suave, **e)** el explante se mantiene casi íntegro, con poca formación de callo en la porción que hace contacto con el medio de cultivo y **f)** Inicia la formación y crecimiento de callo a partir de la base del explante, presenta oxidación abundante en el explante y el medio de cultivo.

Para comprobar cuáles combinaciones de RCV (BA/2,4-D) tuvieron un efecto significativo en la formación de callo para los explantes de ápices foliares sembrados en MS 50% con PVP (2 g/L), se realizó una prueba estadística ANOVA. En ningún caso se observaron valores significativos, es decir, no existe una combinación de RCV óptima para la formación de callo para este tipo de explante. Esto probablemente se debe a la excesiva oxidación que presentaron los callos durante los primeros 20 días de cultivo, causando una necrosis letal en el tejido y promoviendo la formación de ROS, como O_2 y H_2O_2 , moléculas que inician las cascadas de señalización que culminan con la muerte celular programada (Hancock, 2001). Estos resultados no concuerdan con los obtenidos por Salazar (2009) en explantes foliares de *A. cocui*, quien obtuvo hasta 60% de oxidación en los cultivos que tenían auxinas durante las primeras dos semanas de cultivo.

Después de 60 días algunos explantes que formaron callo, generaron estructuras piriformes y hialinas. En este sentido, el estrés oxidativo puede servir como un modulador de la embriogénesis somática en las plantas mediante la inducción de la división celular autónoma (Smith, 2000; George, 2008; Pasternak, 2002).

8.7.1.2 Ápices foliares sembrados con carbón activado

De un total de 98 explantes sembrados en MS 50% con carbón activado (1 g/L), el 30% presentó callos con mucha biomasa (5-10 cm²) cuya coloración varió de su verde a amarillo intenso; las estructuras fueron, por lo general, compactas poco friables y apariencia granulada de rápido crecimiento. El 15% de explantes produjo callo friable con biomasa intermedia (3-5 cm²) de color amarilla (Figura 40). El 28% de explantes generó escaso callo (1-2 cm²) poco friable y con una coloración que varió de amarillo a verde claro. El 27% de explantes no presentaron cambio alguno y nunca perdieron su identidad (Gráfica 41).

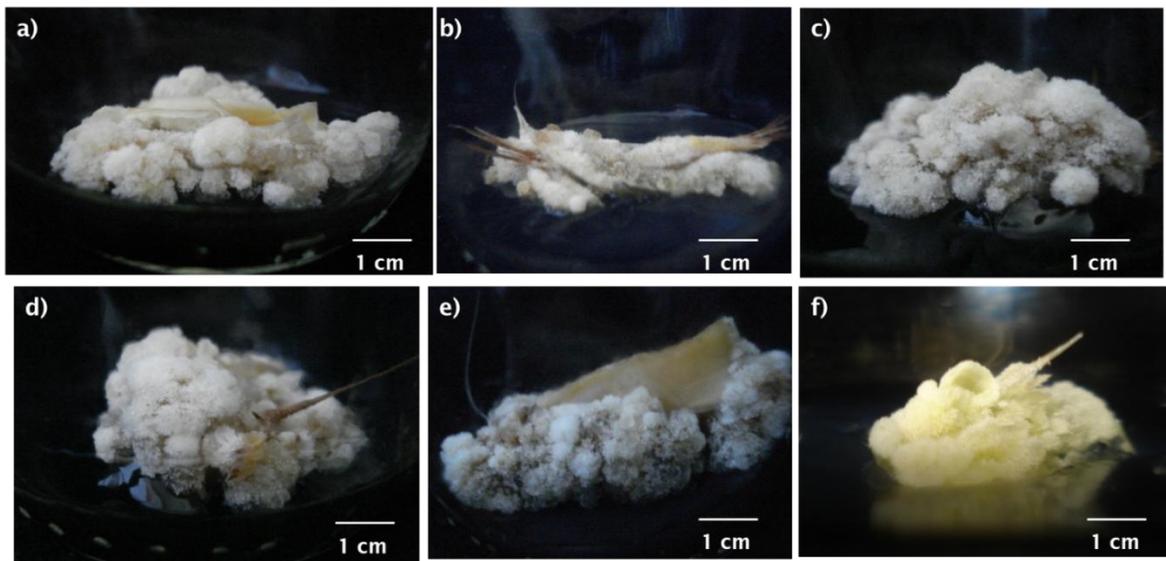


Figura 40. Explantes de hoja región apical sembrados en MS 50% con carbón activado (1 g/L) presentan poca oxidación: **a)** Callo friable con textura húmeda, suave, permanecen remanentes de la identidad del explante, **b)** Callo escaso y friable con apariencia húmeda, no ha perdido su identidad al 100%, **c)** callo friable, blanco y suave, **d)** Callo friable, muestra restos de fibras, **e)** el explante no ha perdido su identidad, presenta formación de callo en la parte basal de color blanco, friable y con textura húmeda y **f)** Callo amarillo pajizo, suave, hidratado y sin oxidación.

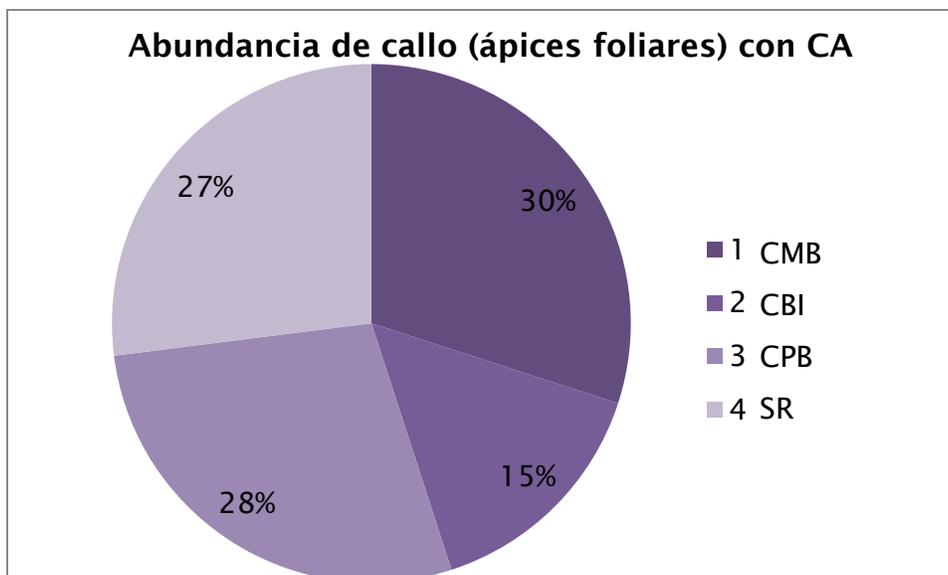


Figura 41. Abundancia de callo de explantes de ápices foliares sembrados con MS50% y CA (1 g/L). Abreviaturas: CMB: Callo con mucha biomasa (30%), CBI: Callo con biomasa intermedia (15%), CPB: Callo con poca biomasa (28%) y SR: Sin respuesta (27%).

La combinación de RCV (2,4-D/BA) para la formación de callo en los ápices foliares tuvo un valor significativo ($P \leq 0.001$). Para corroborar el resultado obtenido por la ANOVA, se realizó una prueba de Tukey (Tabla 22 Apéndice 3). La principal característica de los explantes que formaron callo con valores significativos ($P = 0.026$; Tabla 22 Apéndice 3) fue que presentaron una mayor concentración de auxinas. La morfología del callo depende principalmente del tipo de RCV empleada así como del órgano utilizado como explante (Gómez et al. 1998). En el presente trabajo se observó que las auxinas solas o en concentraciones mayores a las citocininas promueven la formación de callo. Esto concuerda con los resultados obtenidos por Binh et al. (1990) para *A. cantala*, *A. fourcroydes* y *A. sisalana*, donde a partir de explantes de plántulas germinadas *in vitro* en medio MS 50% adicionado con 0.1 mg/L de 2,4-D se obtuvo la formación de callo. De la misma forma, Papaplotzi (2008) obtuvo mayor cantidad de callo en *A. salmiana* en MS 50% adicionado únicamente con 2 mg/L 2,4-D. Valenzuela-Sánchez et al. (2006), sembraron explantes de hoja y tallo de *A. tequilana* y observaron que mientras más auxinas (2,4-D) tenía su medio de cultivo más cantidad de callo (biomasa) obtenían.

Para obtener callo en *A. victoriae-reginae* a partir de explantes de ápices foliares sembrados en MS 50% con carbón activado (1 g/L) es necesaria la interacción de ambos RCV ($P < 0.001$). Las citocininas en concentraciones de 2 y 3 mg/L tuvieron un mayor efecto en la formación de callo en combinación con altas concentraciones de auxinas: 2, 3 y 4 mg/L ($P < 0.001$; Tablas: 23 y 24 Apéndice 3). Valenzuela-Sánchez (2006) observó que el callo de *A. tequilana* no sobrevive en ausencia de auxinas lo cual concuerda con lo observado en *A. victoriae-reginae*, ya que en el grupo control no se obtuvo formación de callo. Robert (1987) observó lo mismo en callos obtenidos a partir de hojas en *A. fourcroydes*.

También, se observó que en presencia de citocininas, los callos obtenidos de *A. victoriae-reginae* lucían colores verdes. Esta respuesta posiblemente se debe a las diferentes concentraciones de citocininas (BA), las cuales incrementan el contenido de clorofila a través de la diferenciación de cloroplastos (Davies, 1995). Esto concuerda con lo observado por Sálazar (2009) en los cultivos de *A. cocui*, durante el período de inducción, ya que sólo el 40% de sus explantes sembrados con citocininas (BA) se mantuvieron de color verde.

8.7.1.3 Bases foliares sembradas con PVP

De los 98 explantes de bases foliares sembrados en MS 50% con PVP (2 g/L) tan sólo el 12% generó callo friable, con mucha biomasa (5-7 cm²), de color amarillo pajizo a café oscuro (Figura 42). Asimismo, el 16% produjo callo friable con biomasa intermedia (3-4 cm²). En cambio, el 18% formó muy poco callo (1-2 cm²) con poca biomasa de color café oscuro. Finalmente, el 54% de explantes no lograron diferenciarse en callo, nunca perdieron su identidad y murieron como consecuencia de su excesiva oxidación (Figura 43).

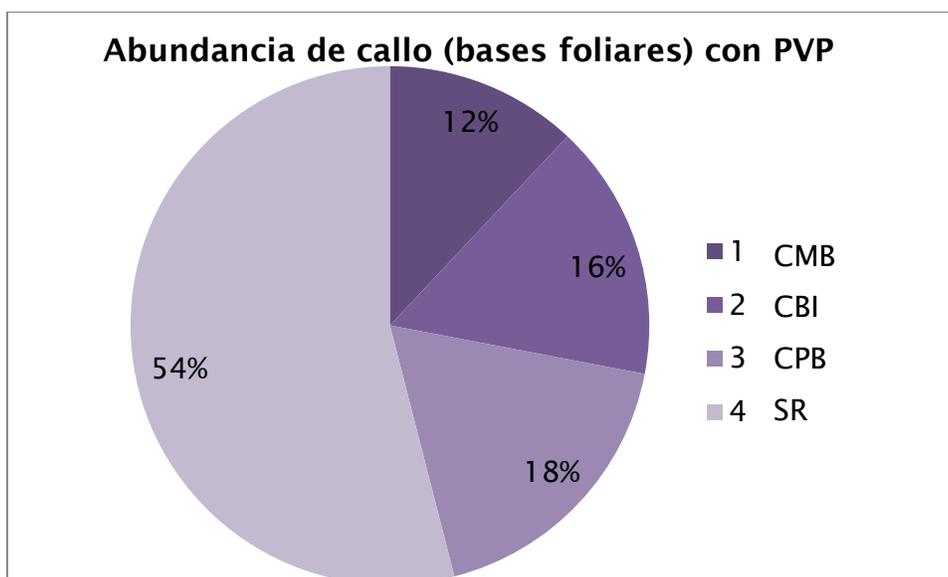


Figura 42. Abundancia de callo de explantes de bases foliares sembrados con MS 50% y PVP (2 g/L). Abreviaturas: CMB: callo con mucha biomasa (12%), CBI: callo con biomasa intermedia (16%), CPB: callo con poca biomasa (18%) y SR: sin respuesta (54%).



Figura 43. Explantes de bases foliares sembradas en MS 50% con PVP (2 g/L), todos los explantes presentan oxidación: **a)** Formación de callo a partir de la base del explante, tiene color blanco a café oscuro, compacto y con apariencia húmeda. En el centro se observan restos de la identidad del explante, **b)** Callo abundante y compacto, su formación comenzó en la base del explante en contacto con el medio de cultivo y **c)** El explante no ha perdido su identidad y se encuentra oxidado.

Ante la excesiva oxidación que presentaron los tejidos de hoja tanto en los explantes de ápices y bases foliares, se realizaron dos subcultivos cada veinte días con la misma concentración de RCV. Está comprobado que acortar el intervalo de tiempo entre subcultivos disminuyen los efectos nocivos de la oxidación ocasionada por polifenoles (Roca y Mronginski, 1991).

8.7.1.4 Bases foliares sembradas con carbón activado

De 98 explantes de bases foliares sembrados en MS 50% con carbón activado (1 g/L), el 33% de los explantes generó callo friable, compacto, de apariencia granulada, rápido crecimiento y mucha biomasa (5-9 cm²). La coloración de los callos fue variada, desde verde olivo a amarillo (Figura 44a). Aproximadamente, el 13% formó callo friable con biomasa intermedia (3- 5 cm²) de color verde a amarillo hialino (Figura 44b). El 22% generó poco callo (1- 2 cm²) con muy poca biomasa, de textura friable, con una coloración amarilla pajiza a café claro y con escasa oxidación. Finalmente, el 32% no tuvo ninguna respuesta (Figura 44c) y el tejido se mantuvo integro (Figura 45).



Figura 44. Explantes de base foliar en MS50% con carbón activado (1 g/L): **a)** Callo friable, con textura húmeda y una coloración que va del amarillo claro, blanco a translúcido conserva restos del explante original, **b)** Inicia la formación de callo a partir de la base del explante y **c)** Comienza a formar callo de la base, el explante aún conserva su identidad

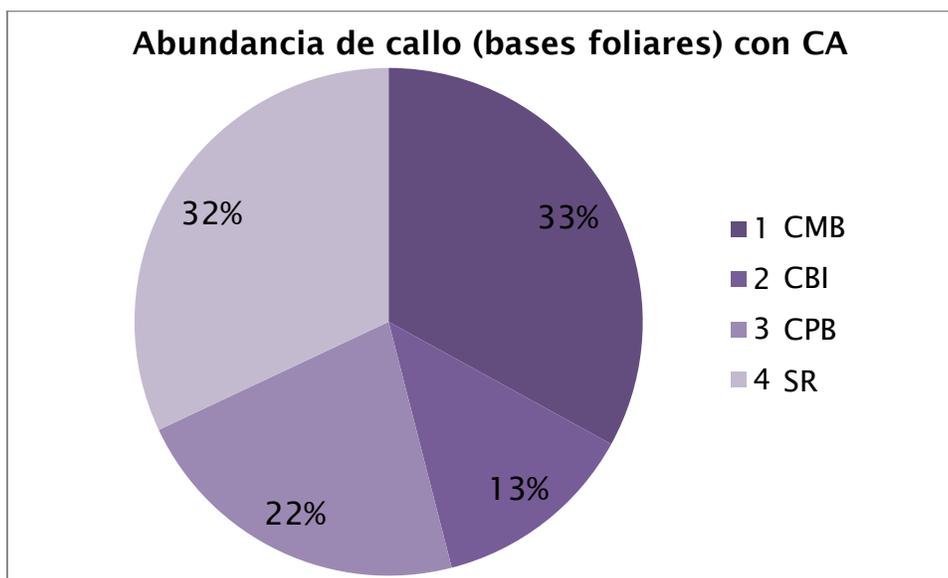


Figura 45. Abundancia de callo de explantes de bases foliares sembrados con MS50% y CA (1 g/L). Abreviaturas: CMB: Callo con mucha biomasa (33%), CBI: Callo con biomasa intermedia (13%), CPB: Callo con poca biomasa (22%) y SR: Sin respuesta (32%).

Para la formación de callo en los explantes de bases foliares es necesaria la combinación de auxinas y citocininas (2,4-D/BA). La prueba estadística ANOVA presentó un valor significativo de $P < 0.001$ (Apéndice 3; Tabla 25). Ésta combinación de RCV es la más utilizada para la inducción de callo, ya que la presencia de ambos BA promueve la división celular y la presencia de 2,4-D promueve la replicación de ADN (Smith, 2000; George, 2008; Tablas 26 y 27; Apéndice 3).

8.7.2 Organogénesis

Después de 40 días de cultivo en inducción se observó la formación de brotes y plántulas (Figura 46). La combinación de BA/2,4-D para la formación de brotes en explantes de base foliar con carbón activado (1 g/L) tuvo un valor significativo ($P < 0.004$; Tabla 28; Apéndice 3). Sin embargo, se observó una importante relación entre 2,4-D (0.5 mg/L) y BA (0.5 mg/L) en concentraciones intermedias, siendo el

tratamiento 12 (0.5 mg/L BA en combinación con 0.5 mg/L 2,4-D) el que mayor número de brotes promovió ($P = 0.012$; Tabla 28; Apéndice 3).

Ruvalcaba (1999) reportó la obtención de brotes vía organogénesis indirecta en *A. parrasana* con 2,4-D mg/L y BA mg/L. Hazra (2002) obtuvo múltiples brotes vía organogénesis indirecta en *A. sisalana*



Figura 46. Desarrollo de plántulas de *A. victoriae-reginae* vía organogénesis indirecta T12 MS 50% con carbón activado (1 g/L), etapas de desarrollo: **A-** 40 días, la plántula luce hinchado debido a la hiperhidratación de los tejidos, **B-** 45 días en inducción, **C-** 50 días los primordios foliares de la plántula han crecido en longitud, **D-** 65 días le han crecido nuevas hojas creció en longitud y **E-** 80 días la planta comienza a tener más brotes vía organogénesis directa.

Para obtener brotes a partir de explantes de ápices foliares sembrados en MS 50% con carbón activado (1 g/L), no es necesaria la combinación de ambos RCV (2,4-D y BA). Sin embargo, la presencia de citocininas (BA) en altas concentraciones 2 y 3 mg/L es capaz de promover una respuesta vía organogénesis indirecta ($P = 0.013$; Tabla 29; Apéndice 3). Resultados similares fueron descritos por Enríquez del Valle (2005) en *A. angustifolia*, quien reportó que la única manera de obtener brotes vía organogénesis indirecta es adicionando BA (1 mg/L) al medio. En este sentido, Valenzuela-Sánchez (2006) obtuvo brotes de *A. tequilana* a partir del empleo de altas concentraciones de citocininas, hasta 4 μ M de BA.

Al término de los 65 días de cultivo en medio de inducción se subcultivaron brotes y plántulas en medio basal MS 50% con carbón activado (1 g/L) (Figura 47).

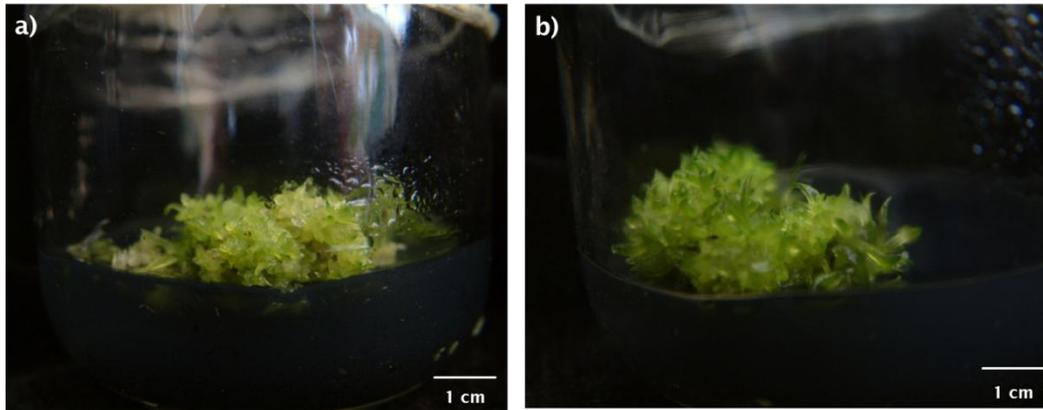


Figura 47. Brotes y plántulas de *A. victoriae-reginae* vía organogénesis indirecta, medio de inducción MS50% adicionado con carbón activado (1 g/L).

Los explantes de ápices foliares sembrados en MS 50% con PVP (2 g/L) no tuvieron un valor significativo para inducir organogénesis indirecta. Dicha respuesta no estuvo influenciada por los RCV, ya que ningún tratamiento presento valores significativos. Las plántulas y brotes de los agaves *in vitro* se caracterizaron por tener una coloración que varió de hialino a verde claro, con los ápices de color verde bandera, apariencia acuosa y con crecimiento asincrónico (Figura 48).

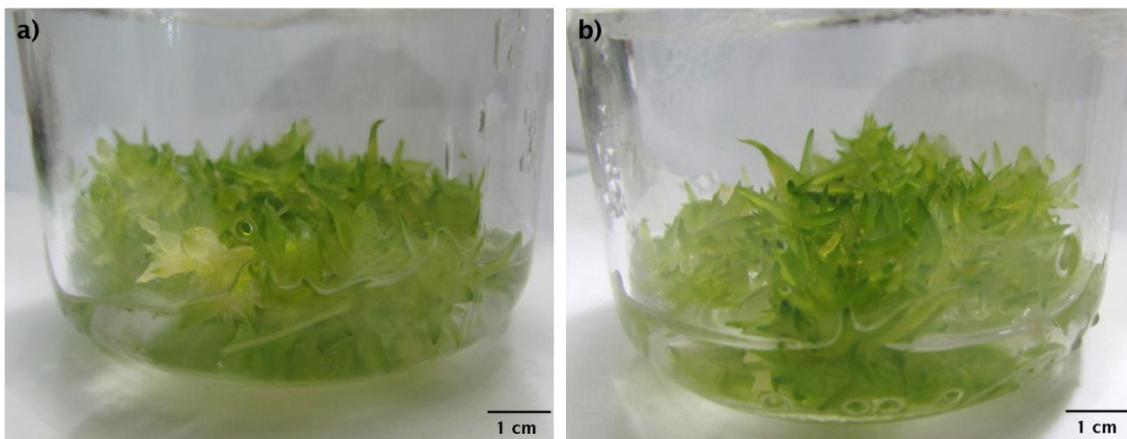


Figura 48. Brotes y plántulas de *A. victoriae-reginae*, después de 55 días en inducción MS 50% con PVP (2 g/L), T23. Tienen apariencia húmeda, hiperhidratados, coloración verde a amarilla con las puntas foliares de color verde bandera.

8.7.3 Embriogénesis somática

Después de 40 días en inducción se observó la formación de una masa embriogénica en los tratamientos suplementados con 2,4-D, tanto con PVP (2 g/L) como con carbón activado (1 g/L) (Figura 49). Las estructuras lucían húmedas, compactas y con una coloración que varió de hialino a verde claro, lo que sugirió una respuesta embriogénica (Figura 50). La combinación de citocininas con 2,4-D induce embriogénesis somática y es indispensable para la regeneración y mejoramiento genético de plantas (Smith, 2000). Esto concuerda con los resultados obtenidos en este trabajo en cuanto a la formación de embriones somáticos, los cuales estuvieron influenciados por la combinación de 2,4-D y BA, siendo óptimo el T23 (2 mg/L 2, 4-D con 1 mg/L BA), donde se dio mayor número de embriones somáticos con apariencia acuosa, textura nodular y compacta y desarrollo asincrónico (Figura 51a-b). Algunos embriones germinaron después de 50 días (Figura 51c). Lo anterior coincide con lo reportado por González (2004), quien obtuvo embriones somáticos de *A. fourcroydes* mediante la adición de 6-BAP en combinación con 2,4-D. Ayala et al. (2010) en *A. atrovirens*, reportó hasta un 29% de inducción embriogénica utilizando concentraciones elevadas de 2,4-D. Tejavathi et al. (2007) observó que la concentración 4.52 μM 2,4-D y 5.37 μM NAA inducía la formación de embriones somáticos en secciones de hoja en *A. vera-cruz*. Arzate-Fernández et al. (2011) obtuvo masa embriogénica somática a partir del cultivo de ejes embrionarios cigóticos de *A. angustifolia* en MS 100% adicionado con 2 y 3 mg/L de 2,4-D en combinación con 1 mg/L de BA. Nikam et al. (2003), por otra parte, obtuvo embriones somáticos a partir de explantes de hoja de *A. sisalana* sembrados en MS adicionado con 2,4-D (0.5-1 mg/L) en combinación con BAP (1-2 mg/L). Asimismo, Portillo et al. (2007) exploró la embriogénesis somática a partir de explantes de hoja de *A. tequilana* sembrados en MS 50% adicionado con distintas concentraciones de 2,4-D/BA.

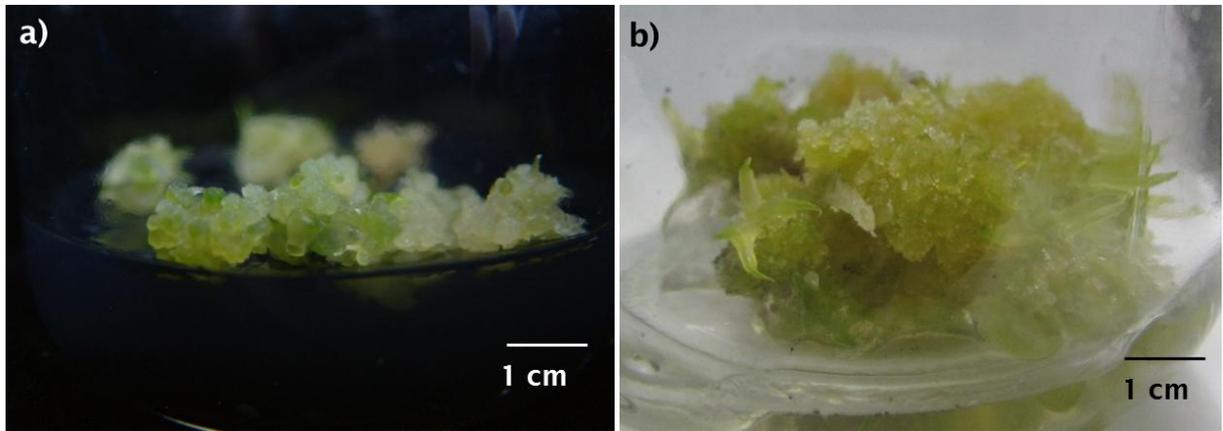


Figura 49. Explantes de bases foliares que dieron origen a embriones somáticos: **a)** Los embriones somáticos tienen apariencia húmeda, textura nodular, hialinos, algunos amarillos y verdes (MS 50% T28 con carbón activado 1 g/L) y **b)** Callo embriogénico, textura suave, apariencia nodular con plántulas germinadas (MS 50% T28 con PVP 2 g/L).

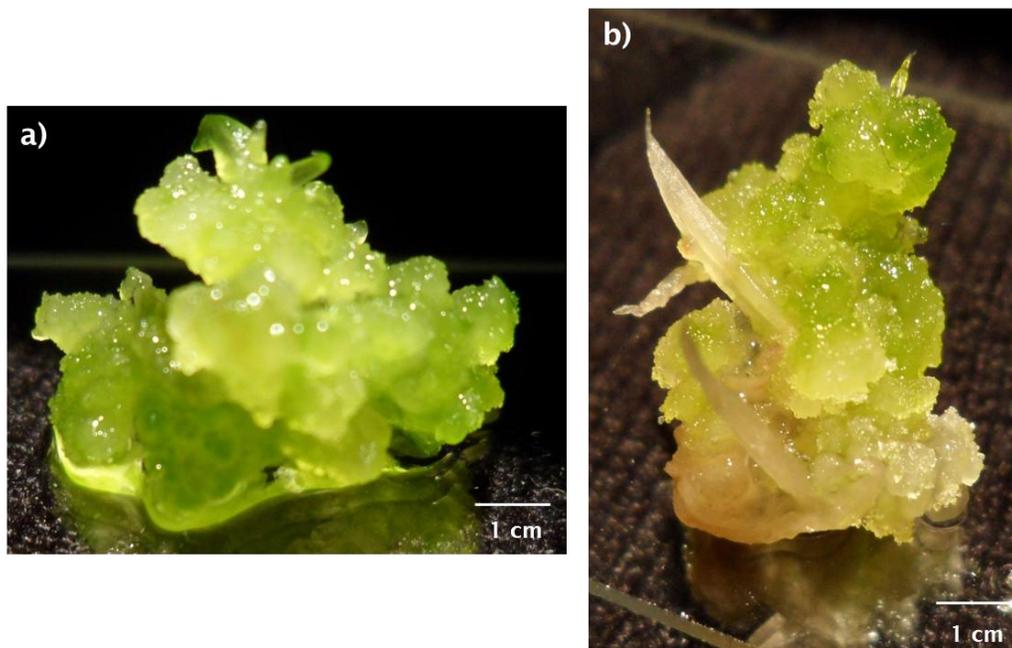


Figura 50. Detalle de los embriones somáticos obtenidos en MS 50%: **a)** Con carbón activado (1 g/L) y **b)** En PVP (2 g/L).



Figura 51. Etapas de embriogénesis somática en *A. victoriae-reginae*. Explantes de hoja región basal en MS 50% inducción T27 con carbón activado (1 g/L): **a)** A los 40 días se observan embriones en etapa globular, hidratados, amarillentos, compactos y con capacidad de regeneración, **b)** Después de 55 días en inducción se observa un conglomerado de embriones somáticos asincrónicos, hialinos a amarillos, plántulas germinadas de color verde, hinchadas debido a la hiperhidratación y **c)** MS 50% sin RCV explantes provenientes del T10, se observa en la base del explante restos de la base foliar, encima callo embriogénico, apariencia húmeda, nodular y compacta y en la cima plántulas germinadas de color verde a amarillo, hiperhidratadas y asincrónicas.

Otro factor importante a considerar para la formación de tejido embriogénico es la excesiva oxidación que presentaron los explantes al inicio del cultivo. Los explantes permanecieron 15 días en oscuridad para posteriormente estar expuestos a baja intensidad lumínica. Thorpe (2000) sugiere que la embriogénesis somática puede ocurrir bajo diferentes regímenes de luz-oscuridad. Para algunas especies la oscuridad puede también favorecer la inducción y formación de embriones (Jiménez et al. 1998). Los explantes, al estar menos expuestos a la luz, lograron disminuir el estímulo para la producción de fenoles y presentaron menor oxidación; gracias a esto se obtuvieron embriones somáticos. Lo anterior concuerda con los resultados obtenidos por Rodríguez-Garay et al. (1996) quien empleó bajas intensidades lumínicas para obtener embriones somáticos de *A. victoriae-reginae*. Dichos resultados, sin embargo, no concuerdan con los obtenidos en *A. fourcroydes* por González et al. (2004), quienes, desde el inicio, incubaron sus cultivos en cámaras con una iluminación de $\sim 3,000$ lux ($37,5 \mu\text{mol m}^2/\text{s}$) y un fotoperíodo de 16 horas luz.

Entre 45 y 55 días de inducción, los embriones somáticos comenzaron a germinar (Figura 52). Sin embargo, después de 60 días de inducción los explantes fueron subcultivados en medio MS 50% con sacarosa (30 g/L) y carbón activado (1 g/L) y medio MS 50% con PVP (2 g/L). A las pocas semanas los embriones comenzaron a proliferar de forma masiva (Figura 53). En cada frasco germinaron embriones y plántulas de forma asincrónica, observándose hasta 80 individuos (Figura 54). Esto concuerda con lo descrito por Halperin (1964), quien sugiere que el proceso de embriogénesis somática es favorecido por la transferencia de explantes de un medio de cultivo suplementado con altas concentraciones de auxinas a uno libre con diferentes reguladores de crecimiento (George, 2008).



Figura 52. Distintas etapas de desarrollo del proceso de embriogénesis somática en *A. victoriae-reginae*. Explantes de hoja región basal en MS 50% con carbón activado (1 g/L) provenientes del T28: **a)** Germinación y crecimiento de las plántulas, lucen hiperhidratados, verdes y con textura suave y **b)** Germinación y crecimiento de las plántulas, después de 30 días en medio sin RCV los agaves comienzan a dar nuevos brotes vía embriogénesis directa.

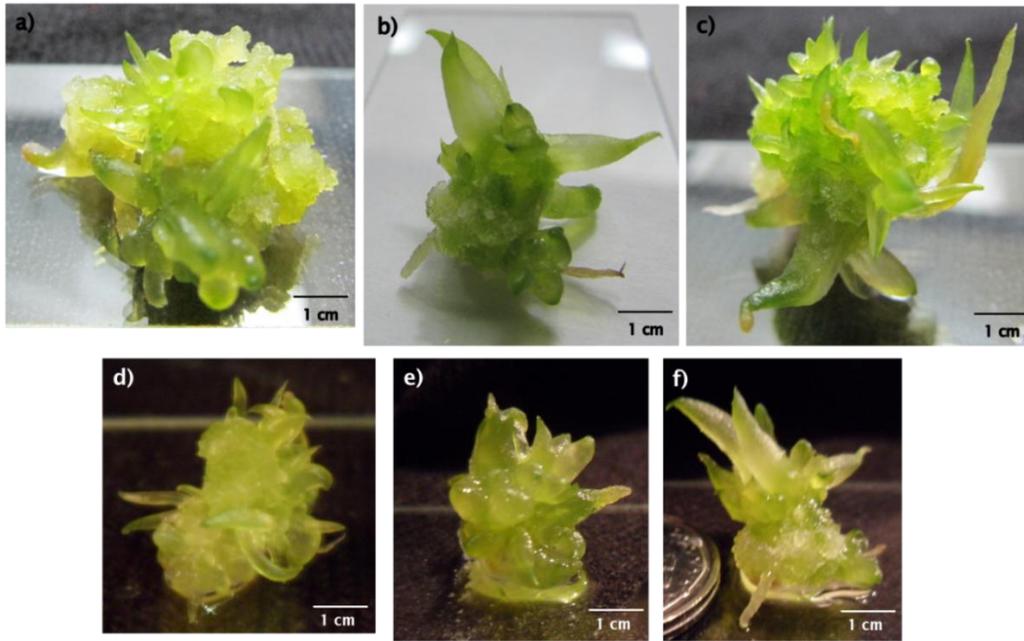


Figura 53. Etapa de proliferación, los embriones han germinado y además les están surgiendo nuevos brotes vía embriogénesis directa: **a)**, **b)** y **c)** Explantes sembrados en PVP (2 g/L) T28 y **d)**, **e)** y **f)** Explantes sembrados en carbón activado (1 g/L) T28.

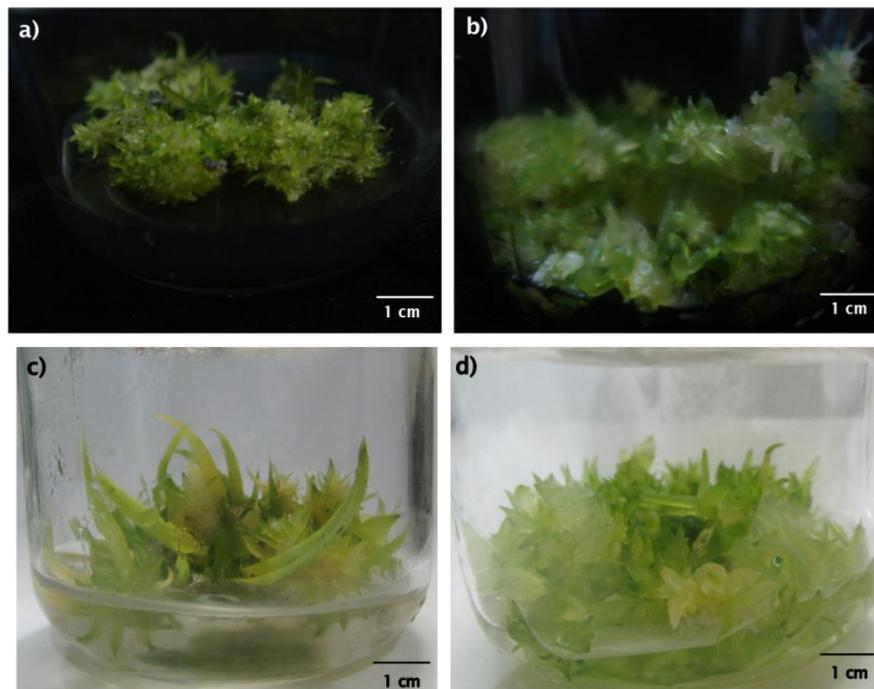


Figura 54. Multiplicación y proliferación de plántulas de *A. victoriae-reginae*: **a)** y **b)** Son explantes de hoja región basal en MS 50% con carbón activado (1 g/L), **c)** y **d)** Explantes de hoja región basal en MS 50% con PVP (2 g/L).

8.8 Cultivo de segmentos de Tallo

Al momento de la siembra los explantes de tallo presentaron una coloración blanca, con textura lisa y fueron más fáciles de cortar que los tejidos foliares debido a su consistencia suave. Los explantes de tallo fueron cultivados en medio de inducción MS 50% con sacarosa (30 g/L) y carbón activado (1 g/L). Los medios de cultivo fueron suplementado con distintas concentraciones de RCV (2,4-D/ BA) para generar un total de 35 tratamientos. A los 10 días de cultivo los explantes de tallo (abundantes en regiones meristemáticas) comenzaron a activar su crecimiento en todos los tratamientos y parecían hidratados. Se observó una coloración verde claro (Figura 55: a y b), probablemente como resultado de la exposición a la luz; otros explantes de tallo comenzaron a desarrollar una coloración translúcida (Figura 55 c-d).

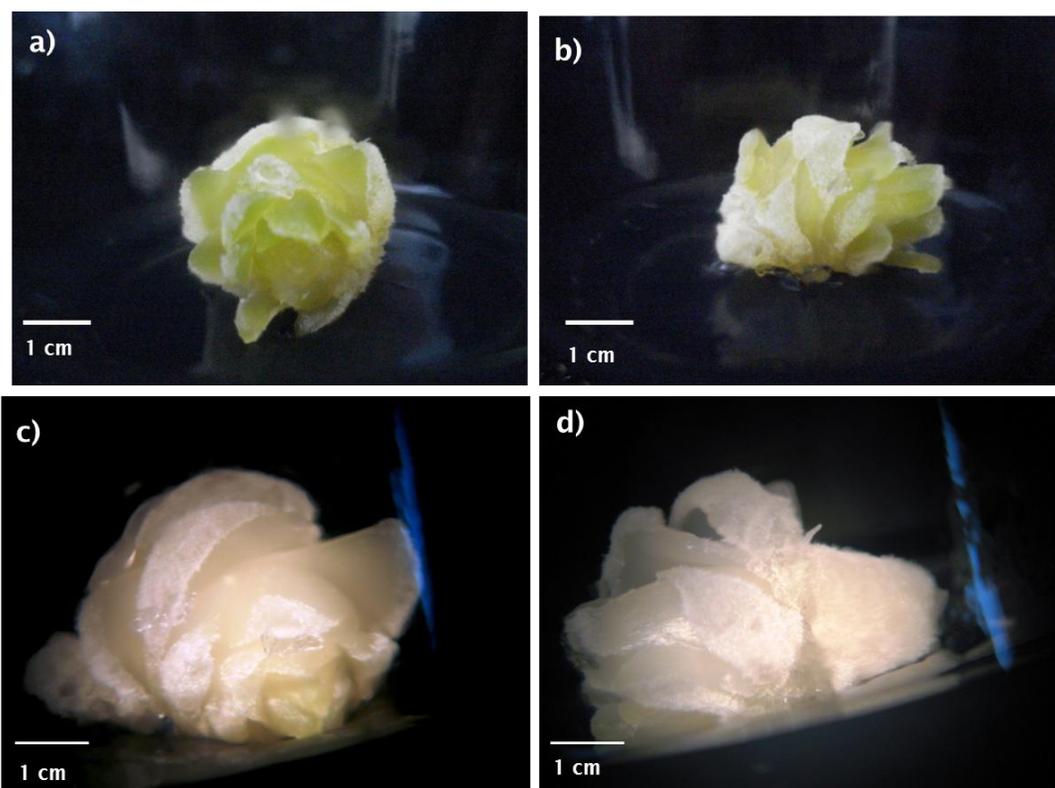


Figura 55. Explantes de tallo en MS 50% con carbón activado (1 g/L): **a)** T4 vista frontal y **b)** Vista lateral del mismo explante de color verde claro, éste comienza a abrirse y formar brotes; **c)** T5 vista frontal y **d)** Vista lateral del mismo explante de color blanco hialino, comienza abrirse la roseta para la formación de brotes.

8.8.1 Organogénesis

Durante los primeros 25 días de cultivo las yemas laterales de los explantes comenzaron a formar brotes, los cuales llegaron a alcanzar longitudes de 1 cm (Figura 56a), con coloración que varió de translúcida a blanca, textura suave e hiperhidratados (Figura 56b). Después de 35 días el explante comenzó a tener una coloración verde clara (Figura 57c), aunque de mayor tamaño debido al exceso de agua.

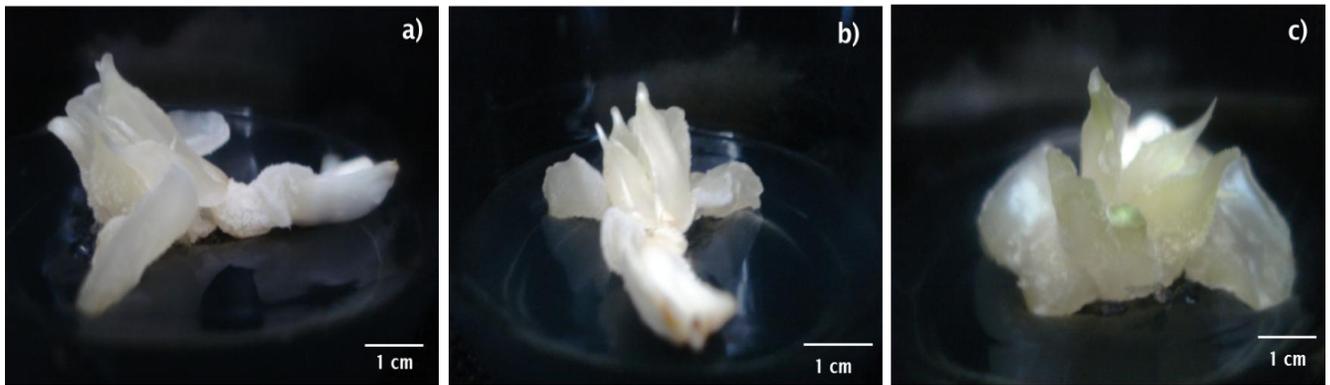


Figura 56. Explantes de tallo sembrado en MS50% con carbón activado (1 g/L) T9: **a)** Presenta una coloración blanca, hiperhidratada con apariencia suave, vista lateral, **b)** Vista posterior y **c)** Después de 35 días el explante comienza a cambiar de color, luce ligeramente más verde, vista anterior

Después de 40 días de cultivo, el 40% de los explantes comenzaron a formar callo friable, abundante y de color amarillo. Sin embargo, la formación de callo en los explantes de tallo no presentaron valores significativos en la prueba estadística ANOVA ($P > 0.05$). El explante también formó órganos mediante organogénesis directa; esto probablemente se debió a la activación de regiones meristemáticas provenientes del tallo del agave (Figura 57).

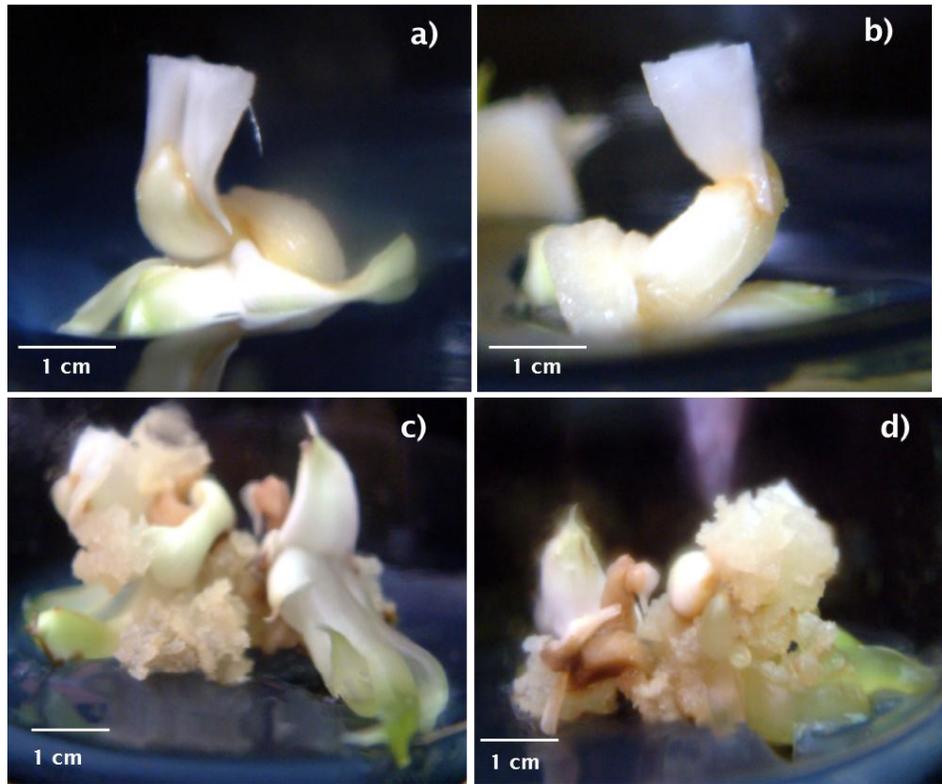


Figura 57. Explantes de tallo sembrado en MS 50% en inducción con carbón activado (1 g/L) T14: **a)** Vista frontal y **b)** Vista lateral del mismo explante de color verde claro a amarillo y en las puntas blanco, éste comienza a abrirse y formar brotes; **c)** Vista lateral anterior y **d)** Vista lateral posterior del mismo explante, de un extremo se observa la formación de callo friable y amarillo y del otro extremo se pueden observar los primordios foliares y hojas creciendo

La respuesta morfogénica en los cultivos de tallo no estuvo asociada con la presencia de reguladores de crecimiento. Sin embargo, esta respuesta se observó en los tratamientos adicionados con mayor concentración de citocinina ($P = 0.001$; Tabla 31 Apéndice 3). La prueba estadística de Tukey determinó que una elevada concentración de citocinina (2 y 3 mg/L) promueve la formación de brotes. En este sentido, los tratamientos 4 y 5 presentaron valores significativos ($P = 0.039$ y $P = 0.039$, respectivamente; Tabla 31; Apéndice 3). George y Sherrington (1984) argumentan que altas concentraciones de citocininas y bajas de auxinas promueven la proliferación de yemas axilares o laterales. Esto ocurre porque las citocininas estimulan el transporte de auxinas de los tallos a los brotes laterales (Jankiewicz, 1999). Es muy posible que algo similar haya ocurrido con A.

victoriae-reginae, ya que en los explantes de tallo había yemas laterales que, con la combinación de BA y 2,4-D en el medio, se diferenciaron en brotes. Asimismo, Martínez-Palacios (1998) obtuvo resultados muy parecidos a los presentados en esta investigación en cultivos de segmentos de tallos de plántulas germinadas de semilla a partir de *A. victoriae-reginae* utilizando BA (1-2 mg/L). De manera similar, Enriquez del Valle (2005) observó la generación de brotes vía organogénesis directa en *A. angustifolia* a partir de segmentos de médula sembrados en MS 50% adicionado con BA (1 mg/L).

8.8.2 Embriogénesis somática

En 3 de los 175 explantes de tallo se observó la formación de estructuras globulares, hialinas, compactas y con apariencia húmeda, sugiriendo la formación de embriones somáticos. Los tratamientos de RCV que dieron origen a embriones somáticos fueron: 26 (3 mg/L 2,4-D), 31 (4 mg/L 2,4-D) y 33 (BA 1 mg/L en combinación con 4 mg/L 2,4-D) (Figura 58). Sin embargo, al realizar las pruebas estadísticas de ANOVA y Tukey no se observaron diferencias significativas entre tratamientos ($P > 0.05$). Se ha reportado que a partir de explantes de tallo se presenta la formación de un elevado porcentaje de embriones somáticos, Martínez- Palacios (1998) obtuvo embriones somáticos a partir de tallos de plántulas de *A. victoriae-reginae* sembrados en medio de inducción adicionado con 2,4-D y BA, después pasaron a medio basal sin RCV . Esto indica que con altas concentraciones de auxinas, estimulan la formación de estructuras embrionarias incluso en aquellos tejidos como los provenientes de tallo ricos en regiones meristemáticas que promueven una formación de brotes en lugar de estadios embrionarios.

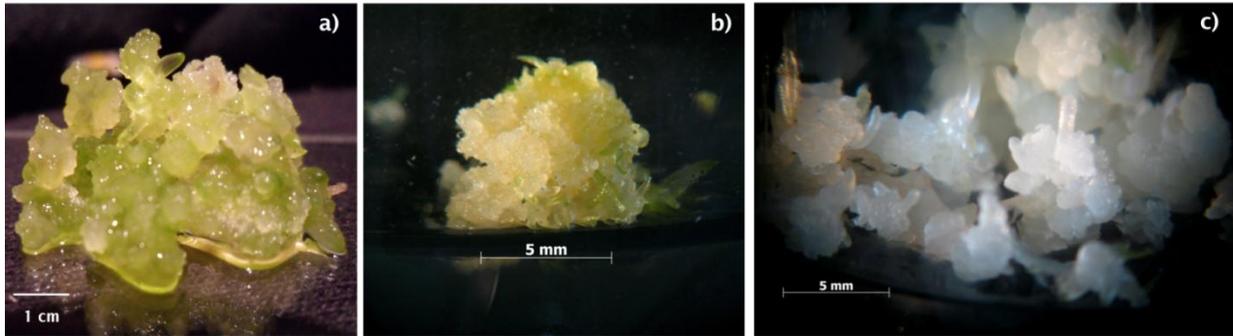


Figura 58. Embriones somáticos a partir de explantes de tallo: **a)** T26 se observan estructuras globulares y piriformes, hialinas a amarillas y verdes, con apariencia húmeda, **b)** T31 estructuras globulares y compactas y **c)** T33 estructuras globulares y brotes de color blanco a hialino, con apariencia húmeda y altamente densos.

8.8.3 Proliferación

Después del período de inducción, los embriones somáticos pasaron a medio sin RCV, MS50% con carbón activado (1 g/L) y sacarosa (30 g). Después de 20 días los embriones somáticos comenzaron a proliferar de una forma masiva y asincrónica, en algunos frascos se podían observar más de 80 individuos (entre embriones y plántulas germinadas). Tanto embriones somáticos como plántulas presentaron hiperhidratación, esto fue notable debido al hinchamiento de sus tejidos, la coloración varió desde hialinas a blancas, amarillas y verdes. Y todos los frascos albergaron cultivos asincrónicos (Figura 59).

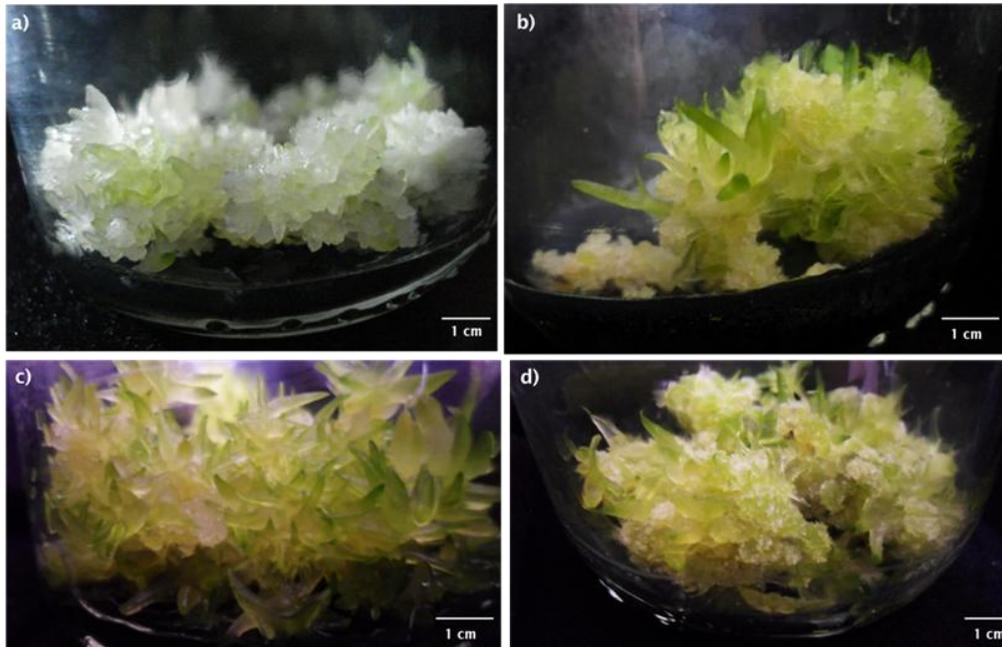


Figura 59. Embriones somáticos y plántulas asincrónicas sembradas en MS 50% con sacarosa (30 g) y carbón activado (1 g/L): **a)** Embriones somáticos provenientes del T33, hialinos algunos verdes, apariencia húmeda y suave **b)** y **c)** Explantes provenientes del T26 se observan embriones de color amarillo a translúcido e hiperhidratados y **d)** Estructuras provenientes del T31, algunos hialinos, amarillos y verdes, con apariencia húmeda y textura suave.

Mientras que, en la proliferación vía organogénesis directa en total se obtuvieron 800 brotes; el mayor número de regenerantes se logró en el tratamiento T4 ($P = 0.010$) con aproximadamente 70 brotes (Figura 60a), seguido del tratamiento T5 ($P = 0.015$) con 60 brotes (Figura 60b; Tabla 32 Apéndice 3). La mayoría de los brotes lucieron hiperhidratados con una coloración verde clara a translúcida y en los ápices foliares se observaba un punto verde bandera (Figura 61). En algunos casos los brotes presentaron una coloración amarilla, esto probablemente se debe a la cantidad y disponibilidad lumínica de la cámara de incubación, la cual en exceso o de manera muy directa promueve la producción de fenoles que conlleva a una oxidación de los tejidos (Figura 62). Los explantes cultivados en medio de inducción respondieron de mejor manera después de subcultivarlos a medio basal (MS 50% libre de RCV con carbón activado 1 g/L). Hubo la formación de nuevos brotes además de que los explantes originales crecieron hasta 7 cm de longitud durante los primeros tres meses de subcultivo (Figura 63). La formación de brotes vía organogénesis directa a través de explantes de tallo, es relativamente sencilla,

ya que no fue necesaria la adición de concentraciones elevadas de reguladores de crecimiento, lo importante es controlar la oxidación mediante el empleo de un antioxidante o adsorbente como el carbón activado que mitigue o disminuya la cantidad de fenoles en el explante y el medio de cultivo. Un punto importante a resaltar es que de los tres explantes estudiados, los segmentos de tallo fueron los que presentaron el mayor número de regenerantes. Esto sugiere la habilidad de los segmentos de tallo de agaves para generar brotes en corto tiempo, puede ser empleada exitosamente para una rápida propagación mediante un adecuado balance del medio y reguladores de crecimiento (Groenewald et al. 1977; Rodríguez-Garay, 1996 y Martínez-Palacios, 1998).

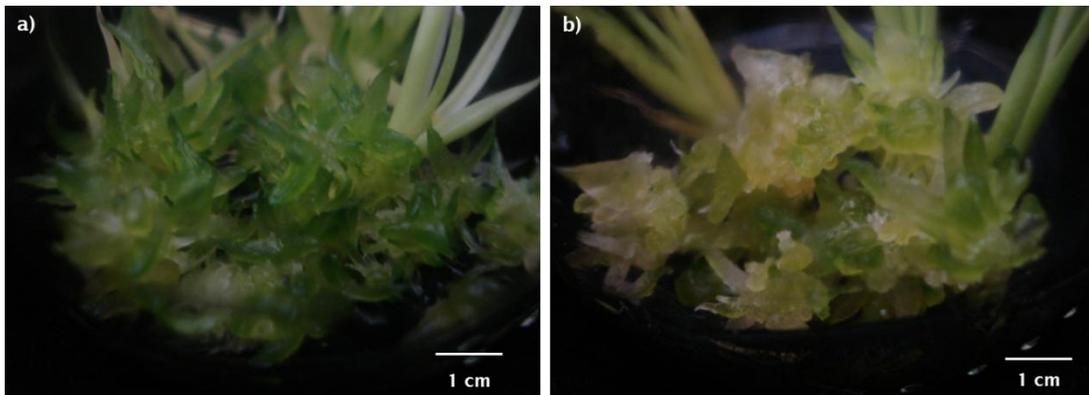


Figura 60. Brotes de *A. victoriae-reginae* vía organogénesis directa a partir de explantes de tallo: a) T4 y b) T5.



Figura 61. Individuos de *A. victoriae-reginae* vía organogénesis directa a partir de explantes de tallo. Nótese la coloración de los explantes verde clara a hialina con los ápices de color verde como si fuera un punto.

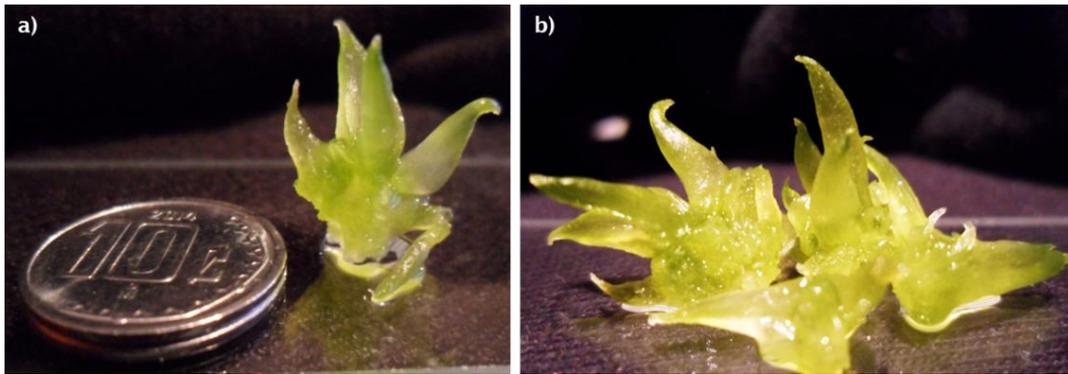


Figura 62. Plántulas de *A. victoriae-reginae* subcultivados en MS 50% sin RCV : a) Muestra hiperhidratación de color verde hialino con apariencia húmeda y b) Los agaves tienen una coloración más amarilla.

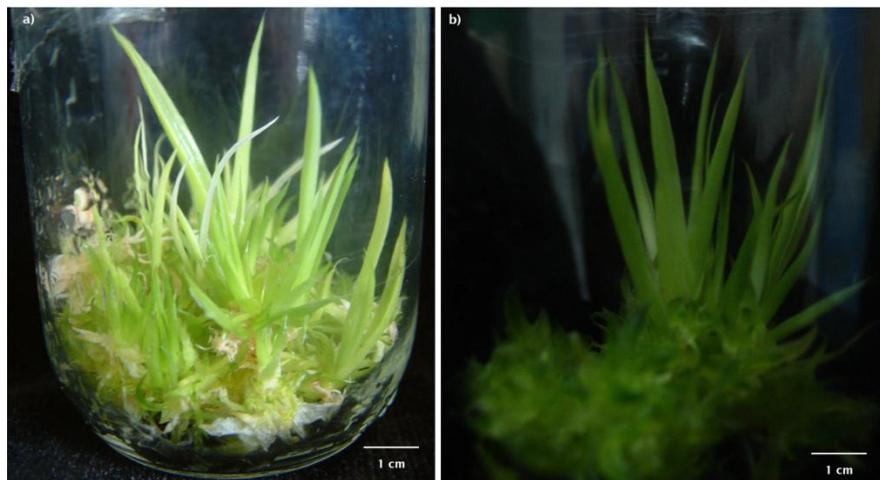


Figura 63. Brotes y plántulas de *A. victoriae-reginae* vía organogénesis directa a partir de explantes de tallo en MS 50% sin RCV.

El empleo de segmentos de tallo con yemas laterales, es el indicado para la propagación masiva de cultivares comerciales, ya que es un método rápido, simple, económico, sin problemas severos de contaminación y oxidación y altamente reproducible (Geethay y Shetty, 2000). El único inconveniente que existe es que al utilizar plantas en peligro de extinción deben aprovecharse al máximo las estructuras tanto de hoja, tallo y raíz que se puedan obtener como

explantes para propagación *in vitro*. Además que el tamaño de los tallos es muy variado ya que dependen de la especie y edad del agave, por lo tanto el número de explantes puede ser limitado y escaso.

8.9 Cultivo de ápice de Raíz

El sistema radicular de los agaves es superficial, lo cual facilita la absorción del agua de lluvia, se caracteriza por ser fibroso (García-Mendoza, 2007) (Figura 64a) una cualidad que difícilmente se puede aprovechar para fines de propagación; por esta razón solamente se utilizaron los ápices, los cuales presentaron en el exterior una coloración café clara y en el interior de color blanco a crema (Figura 64b), éstos tenían una consistencia suave que facilitó su disección.

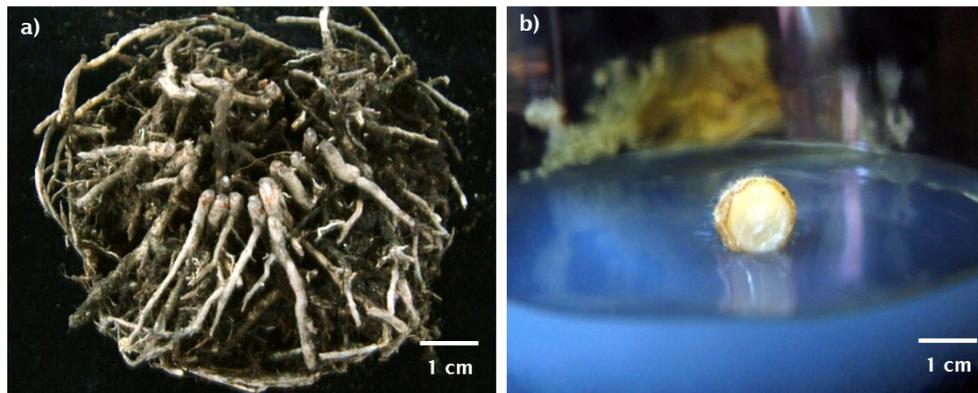


Figura 64. a) Sistema radicular de uno de los individuos empleados para la obtención de explantes de *A. victoriae-reginae* y b) Explante de ápice de raíz en MS 50% adicionado con carbón activado (1 g/L) grupo control.

8.9.1 Embriogénesis somática

Después de 40 días de cultivo tres explantes comenzaron a formar callo nodular, oxidado, pajizo y con la formación de estructuras globulares, hialinas y con apariencia húmeda (Figura 65a). También se observa la formación de callo nodular, friable, oxidado y hialino (Figura 65b) y callo embriogénico, oxidado, con estructuras piriformes, hialinas y con apariencia húmeda (Figura 65c). Se empleó la prueba estadística ANOVA para determinar los valores significativos en los 35

tratamientos. Sin embargo, está resultó no significativa. Posteriormente, se realizaron dos pruebas de Tukey para comprobar si alguna de los RCV o ambos estaban involucradas con la formación del callo. Se observó que la adición de auxinas (2,4-D) $P = 0.001$ promueve la formación de callo embriogénico y en concentraciones mayores a 2, 3 y 4 mg/L resulta ser más eficiente su efecto para promover el desarrollo de estructuras nodulares (Tabla 33 Apéndice 3).

A los 50 días de inducción, se observó en dos explantes correspondientes al tratamiento 28 (1 mg/L BA/2,4-D 3 mg/L), la formación de estructuras globulares, compactas y con una coloración que varió de blanco a hialino (Figura 66), sugiriendo la formación de embriones somáticos.

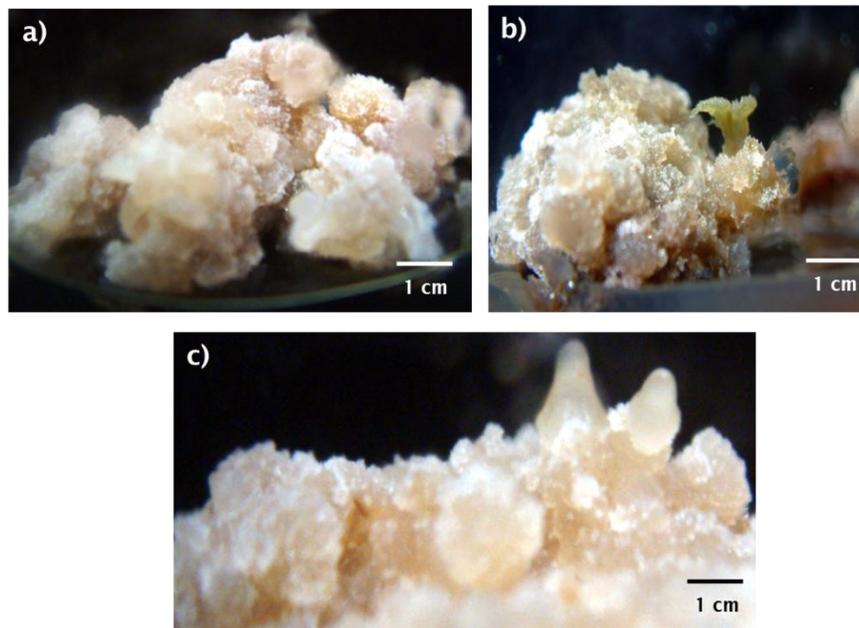


Figura 65. Callos formados a partir de explantes de raíz de *A. victoriae-reginae*: **a)** T21 callo friable de color café a blanco y con textura suave, **b)** T26 callo friable de color café con la formación de un brote color verde y **c)** T31 callo altamente friable, oxidado y con la formación de dos estructuras piriformes y hialinas.

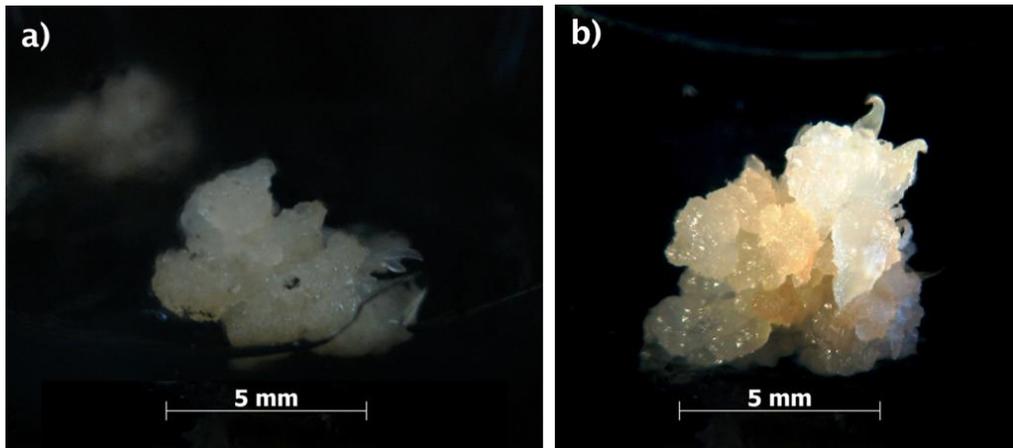


Figura 66. Embriones somáticos obtenidos a partir de explantes de raíz de *A. victoriae-reginae* en T28: **a)** Estructuras globulares, hialinas, compactas y con apariencia húmeda y **b)** Embriones somáticos asincrónicos, se pueden observar estructuras globulares y piriformes, hialinas, compactas y con apariencia húmeda.

A los 60 días de inducción, la mayoría de los explantes en los 35 tratamientos, no lograron generar una respuesta morfogénica, permaneció su identidad, lo único que varió fue su coloración que comenzó a mostrar daños por un exceso de producción fenólica. Esta oxidación gradual comenzó desde el día 15 con algunos explantes, por lo que este proceso se llega a considerar una expresión de senescencia del mismo explante (Zaid, 1987). Los explantes sembrados se mantuvieron siempre en oscuridad, Sánchez-Cuevas et al. (2004) describieron el proceso enzimático que intervienen durante la biosíntesis y la oxidación de fenoles, las cuales se incrementan con la luz. En 135 de los 140 explantes que se encontraban en la etapa de inducción, se presentó una coloración café, lo que corresponde a un proceso de oxidación. Debido a que todos los tratamientos presentaron oxidación, incluso el grupo control, esta no estuvo influenciada por los RCV. El ápice de raíz de plantas en condiciones silvestres ha sido empleado en el cultivo *in vitro* Hurtado et al. (1987), pero es poco utilizado en la micropropagación en *Agaves*, por lo que no hay estudios reportados en la literatura en los cuales se haya visto que obtuvieron embriones somáticos.

8.10 Individualización y enraizamiento de los brotes regenerados

Los carbohidratos desempeñan un papel importante en los cultivos *in vitro*, aportan a las plantas energía una fuente de carbono para llevar a cabo sus funciones vitales, también actúan como un agente osmótico (George, 2008). Además, modulan la expresión génica de las plantas (Koch, 1996).

Por lo general, las células verdes que se encuentran *in vitro* son incapaces de realizar el proceso de fotosíntesis, razón por la cual el medio de cultivo requiere la adición de una fuente de carbono. La sacarosa es la más utilizada en CTV (Smith, 2000). Es el disacárido más abundante y también la forma principal en la que los carbohidratos se transportan en las plantas; se compone de un grupo α -D-glucopiranosil y β -D-fructofuranósido y participa en el enlace glucosídico. También recibe el nombre de azúcar de mesa o común (Voet, 1999; Baynes, 2011). El azúcar blanca refinada es eficiente para emplearse en el medio de cultivo, es más barata que la glucosa y es ampliamente utilizada en el CTV (George, 2008). La sacarosa o la glucosa al 2-5% (w/v) se emplea de manera general en el cultivo *in vitro*. También se pueden emplear otras fuentes de carbohidratos, como fructosa y almidón (Smith, 2000). Con la finalidad de no emplear más RCV, se utilizaron distintas concentraciones de sacarosa (Tabla 9) en los agaves *in vitro*. Los resultados se analizaron con pruebas estadísticas distribución de t de Student. La hoja principal de los agaves *in vitro* en el medio de cultivo con 7.5 g de sacarosa (Figura 67 a-b) presentó una media de 4.3 cm (EE= 0.20882 cm) y con 15 g de sacarosa (Figura 67 c-d) tuvo una media de 2.1 cm (EE= 0.12549 cm). Estas diferencias fueron significativas (t_{23} no pareada P de dos colas < 0.001).

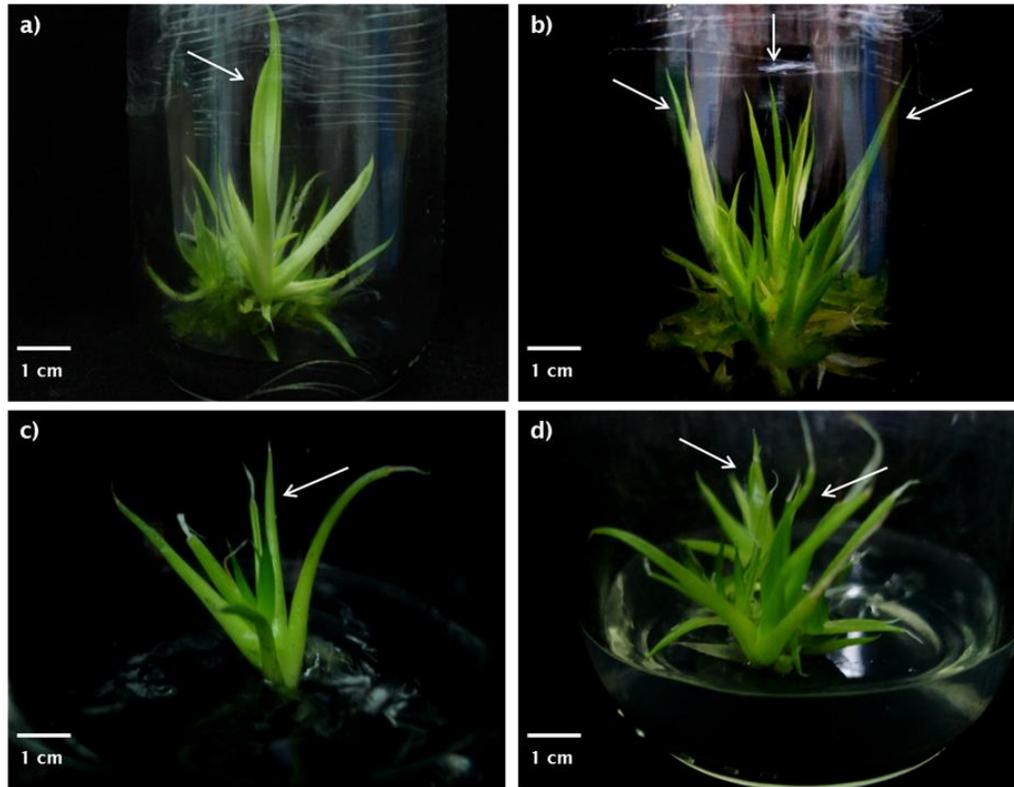


Figura 67. Efecto de distintas concentraciones de sacarosa para promover el crecimiento de los explantes de *A. victoriae-reginae* en MS-50% con carbón activado (1 g/L): **a)** Agave subcultivado con 7.5 g de sacarosa, la hoja principal de la roseta muestra una longitud de 7 cm, **b)** Tres agaves subcultivados con 7.5 g de sacarosa de izquierda a derecha las medidas de las hojas principales de la roseta fueron: 6.5 cm, 4.6 cm y 5 cm, **c)** Agave subcultivado con 15 g de sacarosa, la hoja principal de la roseta tiene una longitud de 3.1 cm siendo la más alta para éste grupo de sacarosa al 50% y **d)** Dos agaves subcultivados con 15 g de sacarosa de atrás hacia adelante las medidas de las hojas principales de la roseta fueron 2.5 cm y 2.8 cm.

El tratamiento con sacarosa al 25% incrementó la longitud de la hoja principal de la roseta, una explicación es que al disminuir la concentración de carbohidratos en el medio de cultivo, las plantas se ven forzadas a crecer en longitud compitiendo para alcanzar la luz y por lo tanto realizar el proceso de fotosíntesis. Las hojas también mostraron una coloración verde oscura, exhibieron la presencia de una espina terminal hidratada y probablemente de textura blanda.

A diferencia, de las tonalidades exhibidas por las hojas de los agaves en el medio MS 50% con sacarosa al 50% (Figura 68) las cuales presentaron colores: blanco, amarillo y verde claro. Esto puede deberse a que la sacarosa en el medio de cultivo vegetal inhibe específicamente la formación de la clorofila y por lo tanto dificulta el proceso de fotosíntesis e impide el desarrollo de células autotróficas (George, 2008). Solamente un número limitado de líneas celulares en plantas *in vitro* tiene la capacidad de responder de manera autótrofa, éstas son capaces de suministrar y satisfacer su necesidad de energía, es decir, de hidratos de carbono por la asimilación del dióxido de carbono durante el proceso de fotosíntesis. Sin embargo, dentro de los frascos las plantas *in vitro* tienen una baja concentración de dióxido de carbono disponible, lo cual limita su crecimiento y desarrollo (Bergmann, 1967; Tandeau de Marsac y Peaud-Lenoel, 1972a,b; Chandler et al. 1972; Anon, 1980; Larosa et al. 1981). Sin embargo, existen estudios que revelan que al disminuir la cantidad de carbohidratos es posible activar o incentivar a las células fotoautotróficas. El éxito depende de la disponibilidad de dióxido de carbono dentro de los frascos *in vitro*, y reducir o eliminar el azúcar en el medio de cultivo de esta manera se optimiza el entorno de las plantas *in vitro*, se mantienen niveles altos de clorofila y es más factible que se lleve a cabo el proceso de fotosíntesis (Kozai, 1991; George, 2008).

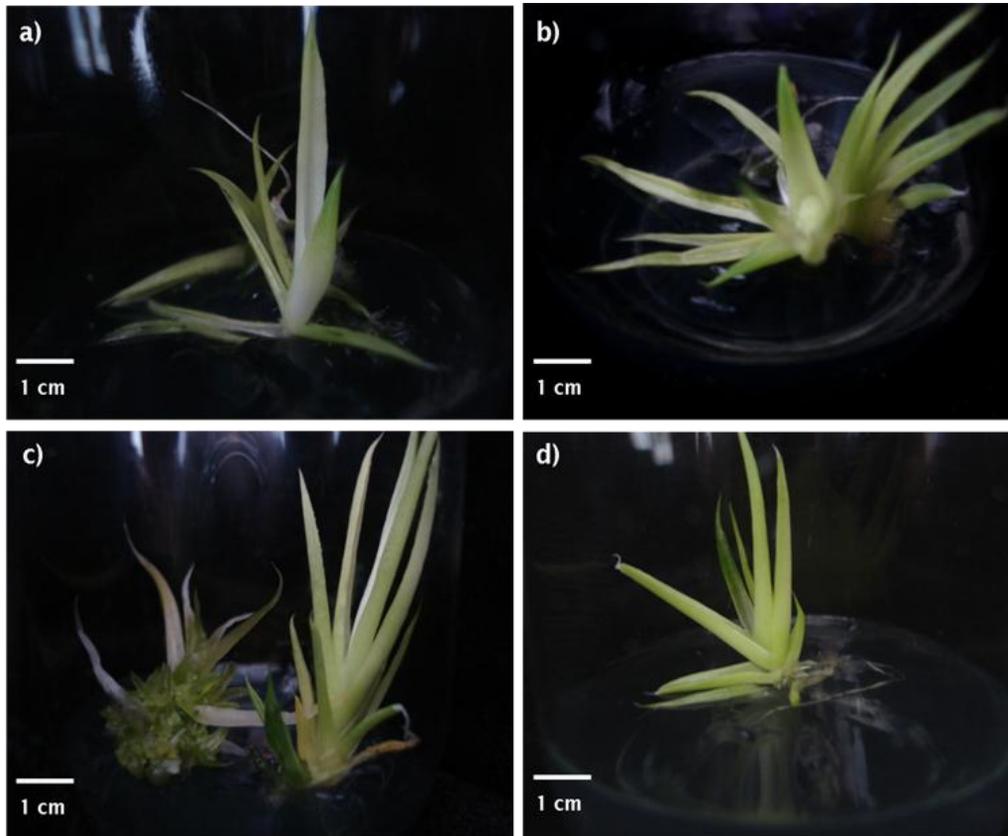


Figura 68. Explantes de *A. victoriae-reginae* subcultivados en MS 50% con carbón activado (1 g/L) y adicionado con 15 gr de sacarosa. Los agaves presentan colores blanco, amarillo y verde claro. Probablemente presentan una baja concentración de clorofila, con cloroplastos atrofiados y baja fotosíntesis. Tienen una textura suave, las hojas no han desarrollado espina terminal y la composición de las hojas asemeja más un abanico que una roseta, característica del género.

Thapa y Dhakal (2007), observaron en el cultivo *in vitro* de maíz que al disminuir la cantidad de sacarosa, las plantas crecían más en longitud, los primordios foliares de los embriones presentaban una coloración verdosa. Farrukh y Sumaira (2008), reportaron en el cultivo *in vitro* de callo de trigo que al aumentar las concentraciones de sacarosa en el medio aumenta el peso seco del material vegetal pero disminuyen la cantidad de clorofila presente en los explantes además del potencial hídrico y osmótico. Rahman e Islam (2010), sembraron nudos de plantas *in vitro* de papa utilizando sacarosa, glucosa y manitol. A los 21 días de cultivo, los explantes sembrados en sacarosa crecieron hasta 6.56 cm de altura. Sin embargo, los explantes que crecieron con manitol llegaron a tener hasta 7.23 cm. Siendo el manitol una fuente de carbono más

eficiente en el cultivo *in vitro* de explantes de papa para la obtención de plántulas más altas. Distintas referencias apoyan el empleo de la sacarosa en bajas concentraciones para obtener explantes vigorosos, capaces de realizar el proceso de fotosíntesis, sin problemas severos de hiperhidratación y con un buen desarrollo radicular. En el cultivo *in vitro* de *A. victoriae-reginae*, a menor concentración de sacarosa las raíces crecían más (Figura 69a) mientras que altas concentraciones generaban pocas raíces y de poco tamaño (Figura 69b).

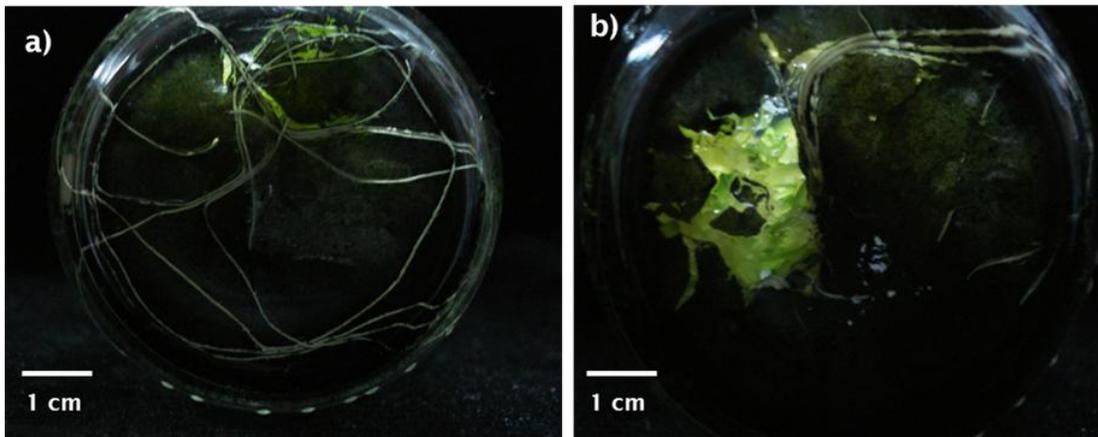


Figura 69. Explantes de *A. victoriae-reginae* subcultivados en MS-50% con carbón activado (1 g/L) adicionado con distintas concentraciones de sacarosa, **a)** Agave subcultivado con 7.5 g de sacarosa muestra una producción mayor de raíces, las cuales son más larga y han desarrollado pelos radiculares finos y **b)** Explantes subcultivados con 15 g de sacarosa, muestran un menor número de raíces y con menor longitud

Para saber con cual tratamiento de sacarosa se obtuvo un mayor número de hojas, se realizó una prueba t- Student. El medio de cultivo adicionado con 15 g de sacarosa tuvo una media de 9.6 cm (E.E.= 1.05), mientras que el tratamiento con 7.5 g de sacarosa presentó una media de 5.5 cm (E.E.= 0.32). Estas diferencias fueron significativas (t_{23} no pareada P de dos colas < 0.001). El tratamiento con sacarosa al 50% fue mayormente significativo para promover la formación de hojas en los agaves (Figura 70a) a diferencia del tratamiento con sacarosa al 15% (Figura 70b). Khuri y Moorby (1995), mencionan que la sacarosa es el componente principal para establecer un protocolo de micropropagación de papa y mencionan que la adición del 3% de sacarosa al medio es el óptimo, para obtener explantes vigorosos, verdesos y con suficiente crecimiento radicular. Se ha reportado que la adición de carbohidratos estimula la histodiferenciación

(Ramsay et al., 2003). Según Körbes y Droste (2005), la concentración de sacarosa puede afectar la inducción morfogénica, así como actuar como un regulador osmótico potencial del medio de cultivo.

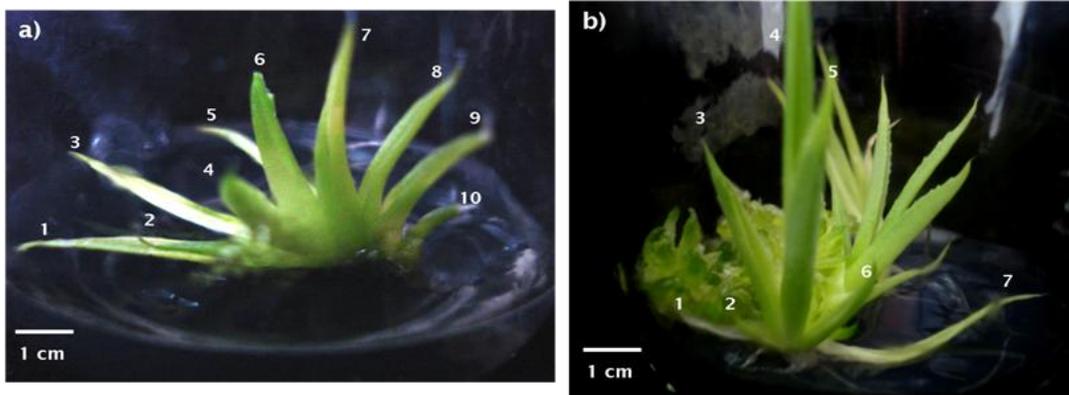


Figura 70. Explantes de *A. victoriae-reginae* subcultivados en MS-50% con carbón activado (1 g/L) adicionado con distintas concentraciones de sacarosa, **a)** Agave subcultivado con 15 g de sacarosa con diez hojas dispuestas en forma de abanico y **b)** Agave subcultivado con 7.5 g de sacarosa muestra siete hojas dispuestas en forma de una pequeña roseta.

A pesar de que los explantes de *A. victoriae-reginae* sembrados con 100% de sacarosa presentaron hiperhidratación (Figura 71a), se pudo observar la formación de estructuras globulares, con coloración amarilla, verde y en algunos casos hialina, de apariencia húmeda y rápida germinación (Figura 71b), las cuales necesitaron de varios subcultivos debido a la rápida multiplicación y a la formación de un gran número de brotes (Figura 71c). La forma, color y respuesta ante el subcultivo, sugieren que tales estructuras son embriones somáticos (Figura 71d), hecho que se evidenció mediante microscopía electrónica de barrido y cortes histológicos (página 116, Figuras 80 y 81). La hiperhidratación es una respuesta que puede generar estrés oxidativo en el tejido, hasta causarle una necrosis total al explante, aunque la mínima concentración endógena de auxinas, en conjunto con dicho estrés oxidativo, estimulan la formación de embriones somáticos (Pasternak et al. 2005; Valdés, 2010).

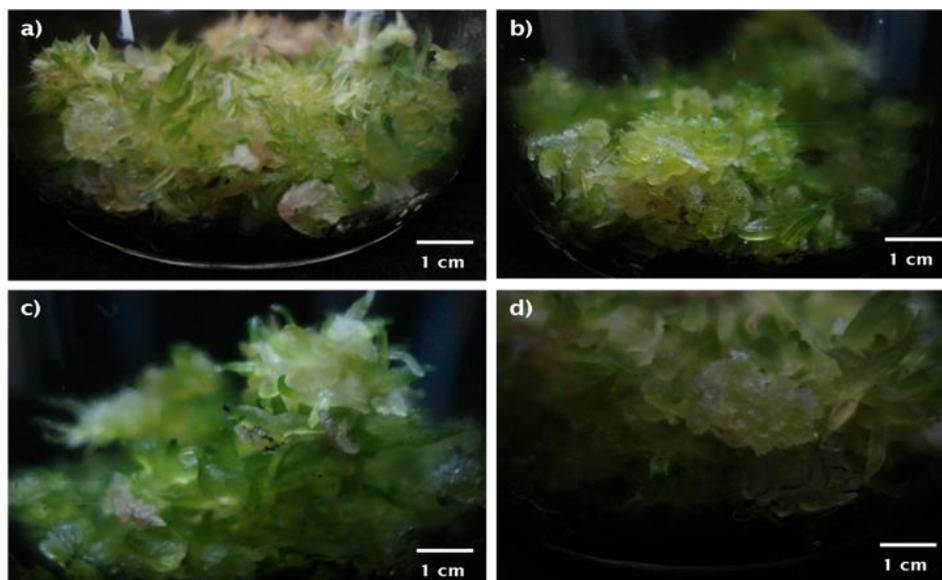


Figura 71. Explantes de *A. victoriae-reginae* subcultivados en MS 50% carbón activado (1 g/L) adicionado con 30 g de sacarosa. Los explantes muestran hiperhidratación, con formación de estructuras globulares y algunas piriformes de colores hialino, amarillo y verde, cualidad que adquieren los embriones somáticos.

Valdés (2010) observó que los nudos de plantas *in vitro* de *Dahlia tenuicaulis*, presentaron hiperhidratación, el cual promovió la formación de estructuras globulares, de coloración amarilla, verde y hialinas, las cuales al ser subcultivadas a medio basal se multiplicaron y desarrollaron numerosos brotes. Las plantas recurren a muchas estrategias de adaptación en respuesta al estrés abiótico, tales como la alta concentración de sales, carbohidratos, deshidratación, frío, calor y estrés osmótico que afectan el crecimiento y desarrollo del individuo (Epstein et al. 1980; Shu et al. 2004). Distintos autores como Shankhadhar et al. (2000) y Al-Khayri y Al-Bahrany (2002) han reportado el efecto del estrés osmótico y las concentraciones de carbohidratos que tienen en el callo para promover la formación de embriones somáticos en monocotiledóneas. Algunos ejemplos bioquímicos que se llevan a cabo en los explantes son la extrusión o absorción de iones, cambios metabólicos en los enlaces de carbono, la síntesis de solutos compatibles, tales como la activación de la prolina, la cual modera el estrés osmótico.

Al-Khayri y Al-Bahrany (2002), explicaron la efectividad de distintos agentes osmóticos, tales como la sacarosa, manitol y sorbitol en cultivos *in vitro* de arroz. Estos carbohidratos no sólo actúan como una fuente de carbono en el medio celular, sino que también promueven un papel fundamental para evitar el déficit hídrico, por lo tanto a mayor concentración de agentes osmóticos posiblemente exista hiperhidratación en los tejidos y células. Gauchan (2012) describió que los embriones somáticos del maíz requieren concentraciones más altas de azúcar, posiblemente a la necesidad de mayor energía para llevar a cabo la división celular. Por lo tanto, la cantidad de carbohidratos que se deben emplear al medio de cultivo, dependen del tipo y la edad del material vegetal, además de la vía de regeneración (organogénesis directa e indirecta o embriogénesis somática) que se desee obtener.

8.11 Aclimatización

Durante el proceso de individualización y enraizamiento, se observó que las plántulas de *A. victoriae-reginae* continuaron proliferando de forma masiva y asincrónica (Figura 72 a-c) e incluso siguieron formando embriones somáticos (Figuras 72 b-d). Esto dificultó la obtención de plantas de mayor tamaño (Figura 73) razón por la cual se realizó un ensayo de aclimatización con otra especie de *Agave in vitro*.

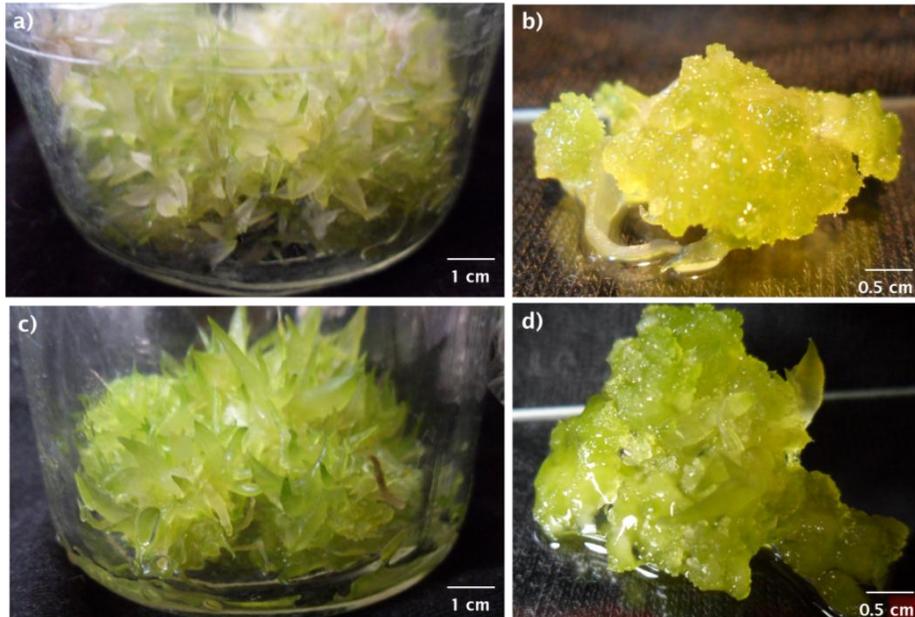


Figura 72. Plántulas de *A. victoriae-reginae* en MS 50%: a) y c) Embriones somáticos y plántulas creciendo de manera asincrónica, con apariencia húmeda, hialina a amarillas y verdes, b) y d) Acercamiento a las estructuras globulares y piriformes, compactas, hialina y con apariencia húmeda.

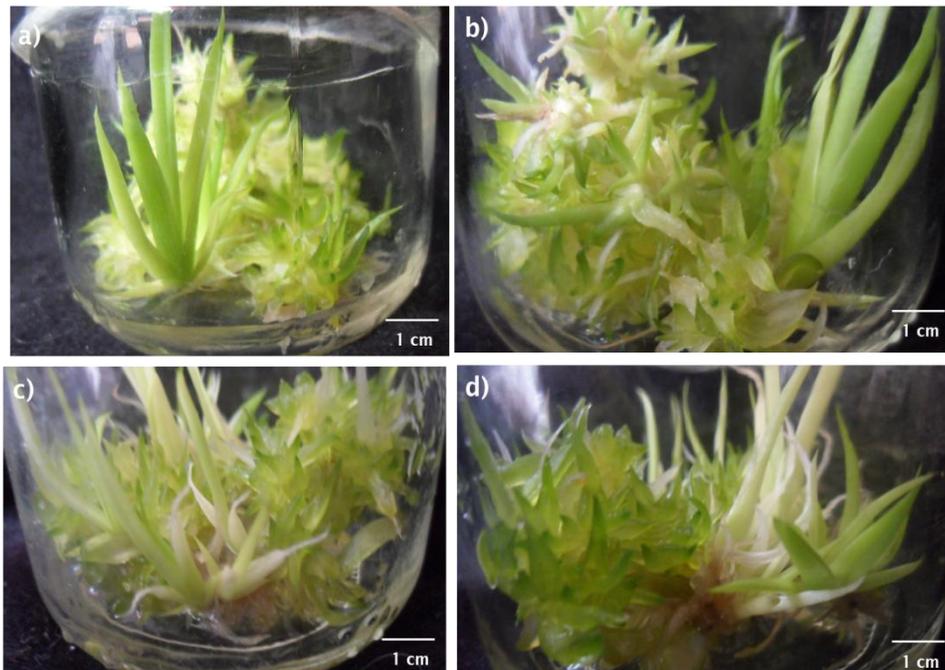


Figura 73. Cultivos asincrónicos de *A. victoriae-reginae* en MS50% sin RCV con plántulas y plantas hiperhidratadas.

Se seleccionaron quince plantas enraizadas de *A. victoriae-reginae* y quince plantas enraizadas de *A. comiteco*. La planta más alta que se utilizó de *A. victoriae-reginae*, midió en promedio 7 cm de largo por 5.5 cm de ancho, con 12 hojas y 8 raíces vigorosas de 3 a 10 cm de longitud (Figura 74a). Mientras que, la planta de *A. comiteco* más alta que se empleó, midió en promedio 7.3 cm de largo por 8 cm de ancho, con 6 hojas y 15 raíces vigorosas de 2 a 15 cm de longitud (Figura 74b).



Figura 74. Proceso de aclimatización: **a)** *A. victoriae-reginae* y **b)** *A. comiteco*.

Se observaron características morfológicas distintas entre ambas especies, las plantas de *A. victoriae-reginae* presentaron tonalidades de verde claro a limón, incluso algunas hojas eran blancas (Figura 75a) con textura suave e hidratada con una espina terminal pequeña y delgada. La disposición de las hojas era en forma de abanico (Figura 75 b-c) y no en roseta y las raíces presentaron una coloración blanca a amarilla, con apariencia húmeda y textura crasa. Mientras que, las plantas de *A. comiteco*, presentaron una coloración verde bandera e incluso glauca, con algunas manchas rojas a púrpuras (Figura 76a). Las hojas tenían textura más rígida, sin espina terminal y con dientes pequeños y finos en el margen de las hojas (Figura 76b). El arreglo foliar en disposición de roseta,

característico de los agaves (Figura 76c) y las raíces presentaron colores café claro a oscuro y eran más resistentes al tacto. Sería interesante comparar las características morfológicas que exhiben las plántulas de *A. victoriae-reginae* y *A. comiteco*, germinadas a partir de semillas y en sustrato, simulando las características de su hábitat. Ya que las plantas *in vitro* se encuentran bajo condiciones especiales, donde los nutrientes están disponibles, la humedad ambiental es alta y la radiación lumínica es menor que en su hábitat. Estas condiciones dan como resultado, en algunos casos, plántulas con morfología, anatomía y fisiología anómalas o distintas a las que tendrían en vida silvestre (Pospíšilová, 1999). Tales como la formación de hojas pequeñas, suculentas e hiperhidratadas, cutícula delgada, deformación y apertura diurna de los estomas, cloroplastos no funcionales, con poca formación de grana y abundante estroma y baja producción de clorofila, con un sistema vascular inmaduro y limitado, raíces suaves, hiperhidratadas con apariencia delicada, fusionadas entre ellas y con poca o nula formación de pelos radiculares (George, 2008).



Figura 75. Planta de *A. victoriae-reginae*: **a)** Hojas hiperhidratadas, coloración blanca a amarilla y verde limón, espina terminal, **b)** Sin formación de la roseta clásica de los agaves y **c)** Disposición de las hojas en forma de abanico.



Figura 76. Planta de *A. comiteco*: **a)** Hojas rígidas y gruesas, con márgenes dentados, sin espina terminal y con coloración verde bandera a púrpura, **b)** Formación del cono central de hojas y **c)** Disposición de las hojas en forma de roseta.

El proceso de aclimatización empleado en ambas especies fue el siguiente: se enjuagaron directamente bajo agua corriente hasta retirar el exceso de medio de cultivo de las hojas y raíces. Después, los agaves se sumergieron en 1 L de agua corriente adicionada con dos gotas de Microdyn® durante 10 min. Posteriormente, permanecieron sumergidas en agua corriente durante 24 h. Después, se colocaron las plantas sobre papel periódico durante 4 h (Estrada *com pers*, 2015).

Finalmente, se plantaron los agaves en charolas de plástico con una mezcla de sustrato: 3 Tepojal, 1 Tierra negra, $\frac{1}{2}$ Tezontle y $\frac{1}{4}$ *Sphagnum* (Figura 77). Es importante mencionar que el sustrato no se esterilizó, esto se hizo con la finalidad de no eliminar a los microorganismos que se encuentra de forma natural en el suelo, los cuales mantienen una competencia con los organismos patógenos y por lo tanto, disminuyen su proliferación. Valdés (2010) aclimatizó plantas de *Dahlia brevis* y *D. tenuicaulis* en sustrato esterilizado, obteniendo altos porcentajes de contaminación (aproximadamente 80%). Después, realizó un segundo ensayo de aclimatización utilizando sustrato no esterilizado, el cual permitió la sobrevivencia del 80% de las plantas. Estos resultados se atribuyen a la

relación interespecífica que se lleva a cabo en el sustrato donde crecen las plantas aclimatizadas, al esterilizar el sustrato, se eliminan los microorganismos que se encuentran de forma natural en el suelo, los cuales mantienen una competencia con los organismos patógenos y por lo tanto disminuyen su proliferación, esto le brinda una ventaja a las plantas en un ambiente *ex vitro*. Vázquez (2015) *com pers.* ha observado el mismo proceso en *Agave salmiana*, al emplear sustrato no esterilizado tampoco observó contaminación en plantas aclimatizadas. Gómez (2010), aclimatizó plantas de *A. salmiana* en sustrato esterilizado y obtuvo más del 60% de contaminación durante las primeras 4 semanas *ex vitro*. Domínguez (2008), registró en plantas de *A. cupreata* hasta un 47% de mortandad durante el proceso de aclimatización.

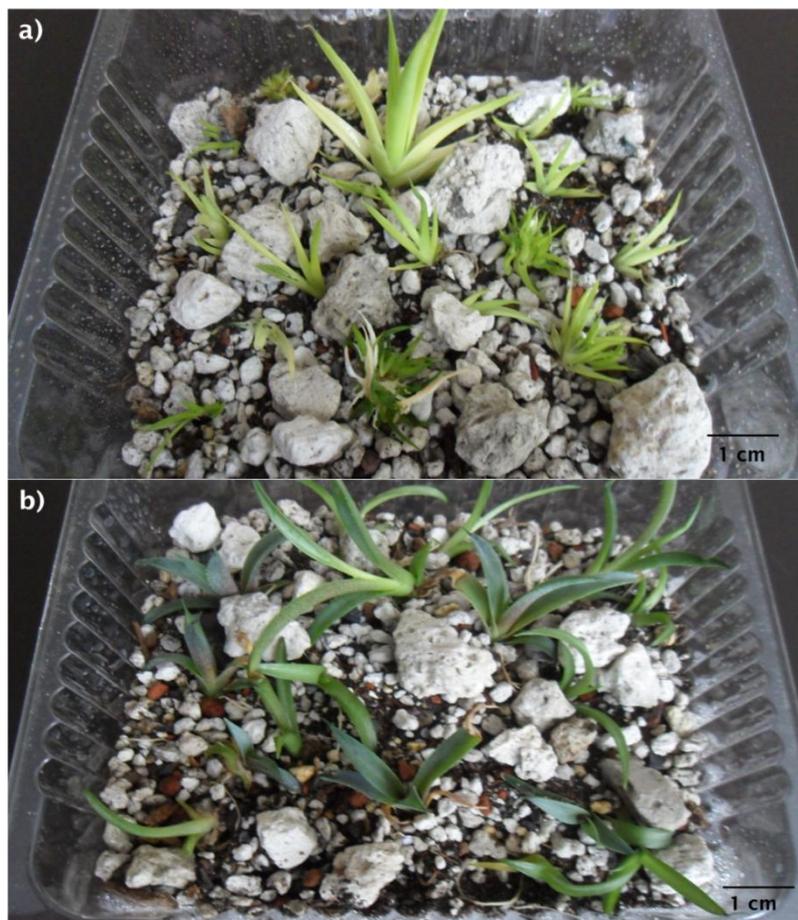


Figura 77. Plantas en proceso de aclimatización cultivadas en una mezcla de tepojal, tierra Negra, tezontle y *Sphagnum*: a) *A. victoriae-reginae* y b) *A. comiteco*.

Durante las primeras dos semanas, tanto las plantas de *A. victoriae-reginae* como de *A. comiteco*, se regaron cada dos días para posteriormente hacerse dos veces por semana. Apesar de que los Agaves son especies adaptadas al estrés hídrico, se ha observado que en *A. comiteco*, *A. salmiana* y *A. victoriae-reginae*, la acumulación de grandes cantidades de agua durante la aclimatización y posteriormente se deshidratan. La primera causa de muerte de plantas aclimatizadas es la contaminación seguida de la deshidratación (Martínez-Palacios, 1998; Gómez, 2010; Estrada, 2015 *com pers.*).

Después de 62 días el porcentaje de supervivencia de las plantas aclimatizadas de *A. victoriae-reginae* fue de 87% mientras que para *A. comiteco* fue del 94%. Se observó que la principal causa de mortandad durante la etapa de aclimatización de ambas especies fue la deshidratación de los tejidos que desafortunadamente causó la pérdida de las plantas. Domínguez et al. (2008) reportó hasta el 53% de supervivencia en plantas de *A. cupreata*, 73% para *A. difformis*, 60% para *A. karwinski* y hasta 100% para *A. obscura*. Martínez et al. (2003) obtuvo hasta el 92% de supervivencia en plantas aclimatizadas de *A. victoriae-reginae*, mientras que Gómez et al. (2010) registró únicamente el 32% de supervivencia en plantas aclimatizadas de *A. salmiana*.

8.12 Histología y morfología de callo embriogénico de *A. victoriae-reginae*

Etapa 1 Callo proembriogénico

Después de 40 días de inducción se obtuvo callo embriogénico proveniente de explantes de la base foliar (vaina) de *A. victoriae-reginae* con 2,4-D (2 mg/L) y BA (1 mg/L) (T23), el cual presentó una respuesta significativa para la formación embriones somáticos ($P=0.008$). Morfológicamente, el callo embriogénico presenta estructuras globulares y piriformes, con una coloración que varía de hialina a blanca e incluso amarilla y en algunos casos verde (Figura 78), también observado durante la embriogénesis somática en *A. tequilana* (Portillo et al. 2007)



Figura 78. Callo embriogénico con formación de estructuras globulares y hialinas.

Respecto a la anatomía, se observó en un corte longitudinal de callo proembriogénico la formación de regiones meristemáticas (Figura 79a), las cuales tienen una respuesta análoga a las células embriogénicas observadas durante el desarrollo de los embriones cigóticos (Jones, 1999). De manera similar, Nikam et al. (2003), reportó en *A. sisalana* la formación de cúmulos meristemáticos. En las regiones meristemáticas se pueden apreciar las divisiones anticlinales y periclinales de las células (Figura 79 b-c) lo cual fue observado por Monja-Mio et al. (2013) en *A. fourcroydes*, quienes describieron que las primeras divisiones asimétricas son etapas anteriores a la formación de proembriones somáticos.

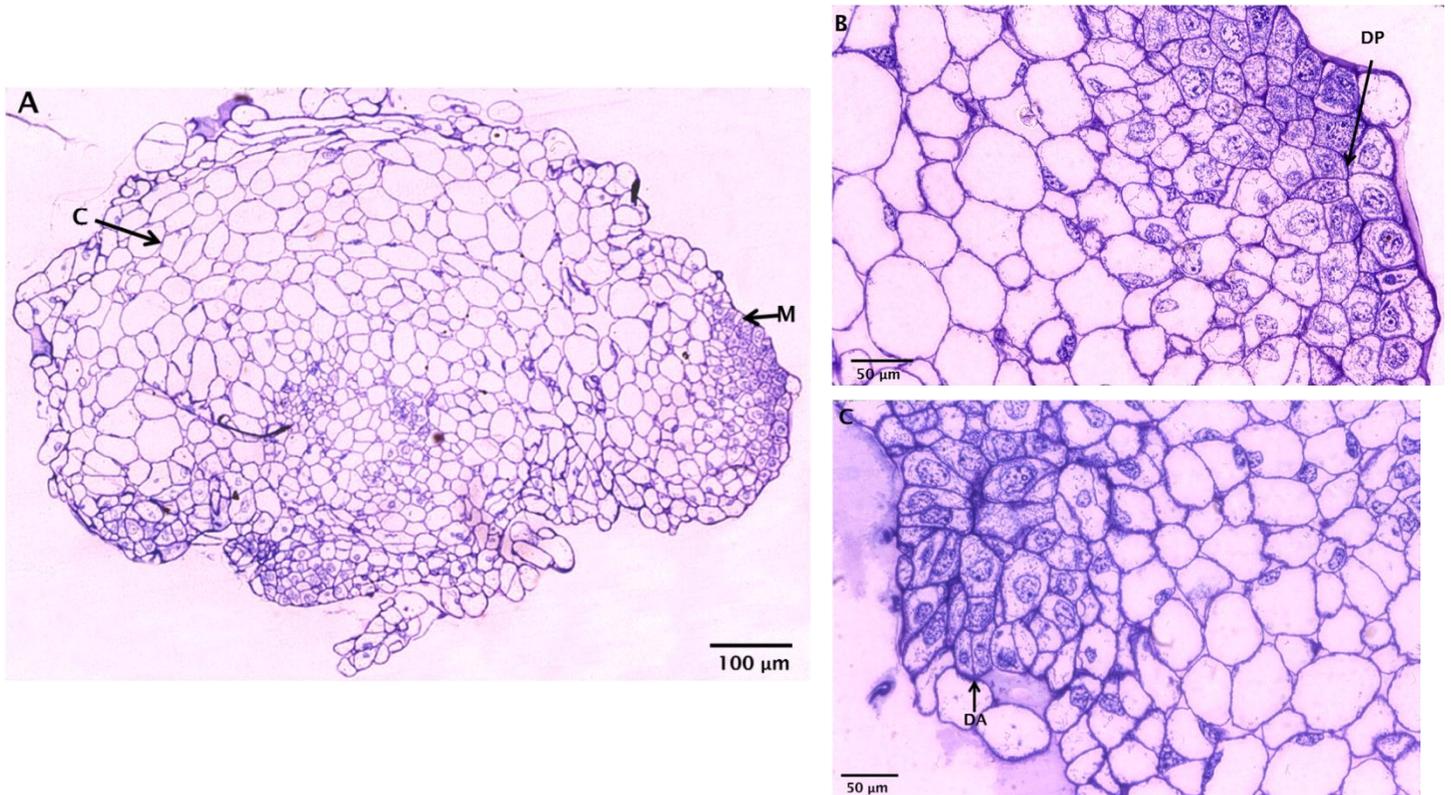


Figura 79. a) Corte longitudinal de callo embriogénico de *A. victoriae-reginae*, b) Divisiones periclinales en las células meristemáticas y c) Divisiones anticlinales de las células meristemáticas. (C) células de callo, (DA) divisiones anticlinales, (DP) divisiones periclinales y (M) meristemos.

En un corte longitudinal de callo se observó la formación de un proembrión somático (Figura 80a), con el embrión propiamente dicho y el suspensor (Figura 80b). Esta estructura corresponde al estado de ocho células (Von Arnold et al. 2002), en los embriones cigóticos la formación del embrión comienza a partir de una sola célula meristemática que se divide periclinamente; la célula basal da origen al suspensor y la apical al embrión propiamente dicho.

También, se aprecia una mitosis en la etapa de Anafase (Figura 80c) en donde se aprecian los cromosomas en proceso de separación, atraídos por los centrosomas en los extremos y el huso acromático cuya disposición indica una división perpendicular (Figura 80d).

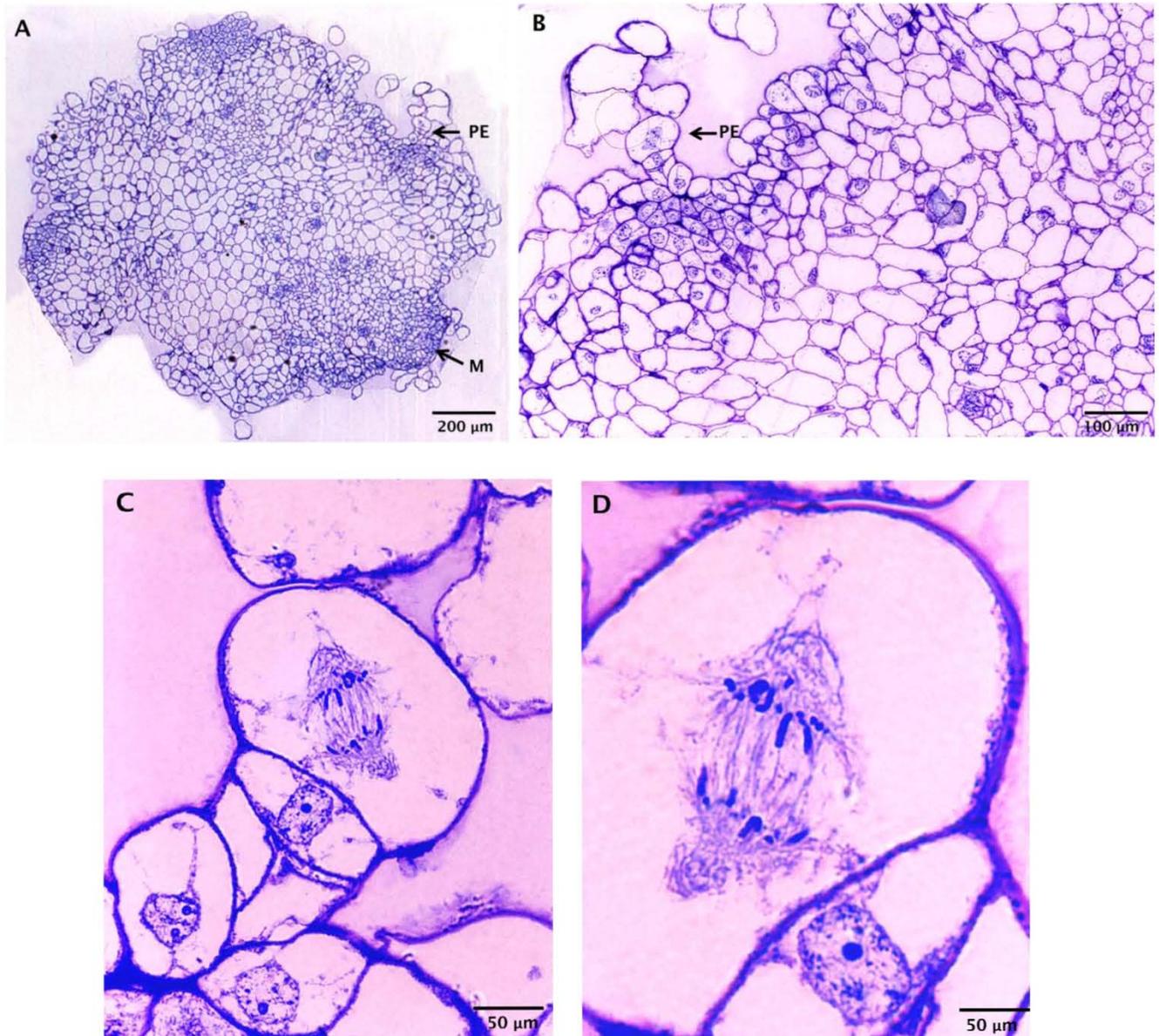


Figura 80. Callo proveniente de la base foliar de *A. victoriae-reginae*: **a)** Corte transversal de callo embriogénico, **b)** Región meristemática con proembrión somático, **c)** Proembrión somático en proceso de división celular y **d)** División celular (Anafase).

Se identificó un embrión somático en etapa globular con suspensor, el cual presenta continuidad con las células del callo (Figura 81a). Otra característica notable es la presencia de la protodermis (Figura 81b) en donde también se aprecia la diferenciación de los haces vasculares (Figura 81 c-d). Nikam et al. (2003), describió en *A. sisalana* la formación de embriones globulares, los cuales presentaron una conexión vascular a las células del callo. De la misma forma, Tejavathi et al. (2007) describió en *A. vera-cruz* la formación de embriones globulares y observó la conexión que existe entre el suspensor y las células del callo. En contraste, Portillo et al. (2007) determinó en *A. tequilana* que los embriones globulares no tenían una conexión vascular con el callo, lo cual concuerda con lo descrito por Haccius et al. (1978), acerca de la individualidad que presentan los embriones somáticos con respecto a las células del callo.

Se identificó el desarrollo de una raíz primaria (Figura 82a) con córtex, endodermis y el cilindro vascular (Figura 82b), en donde también se registró la formación endógena de una raíz secundaria (Figura 82c), la cual muestra el meristemo apical de raíz (Figura 82d).

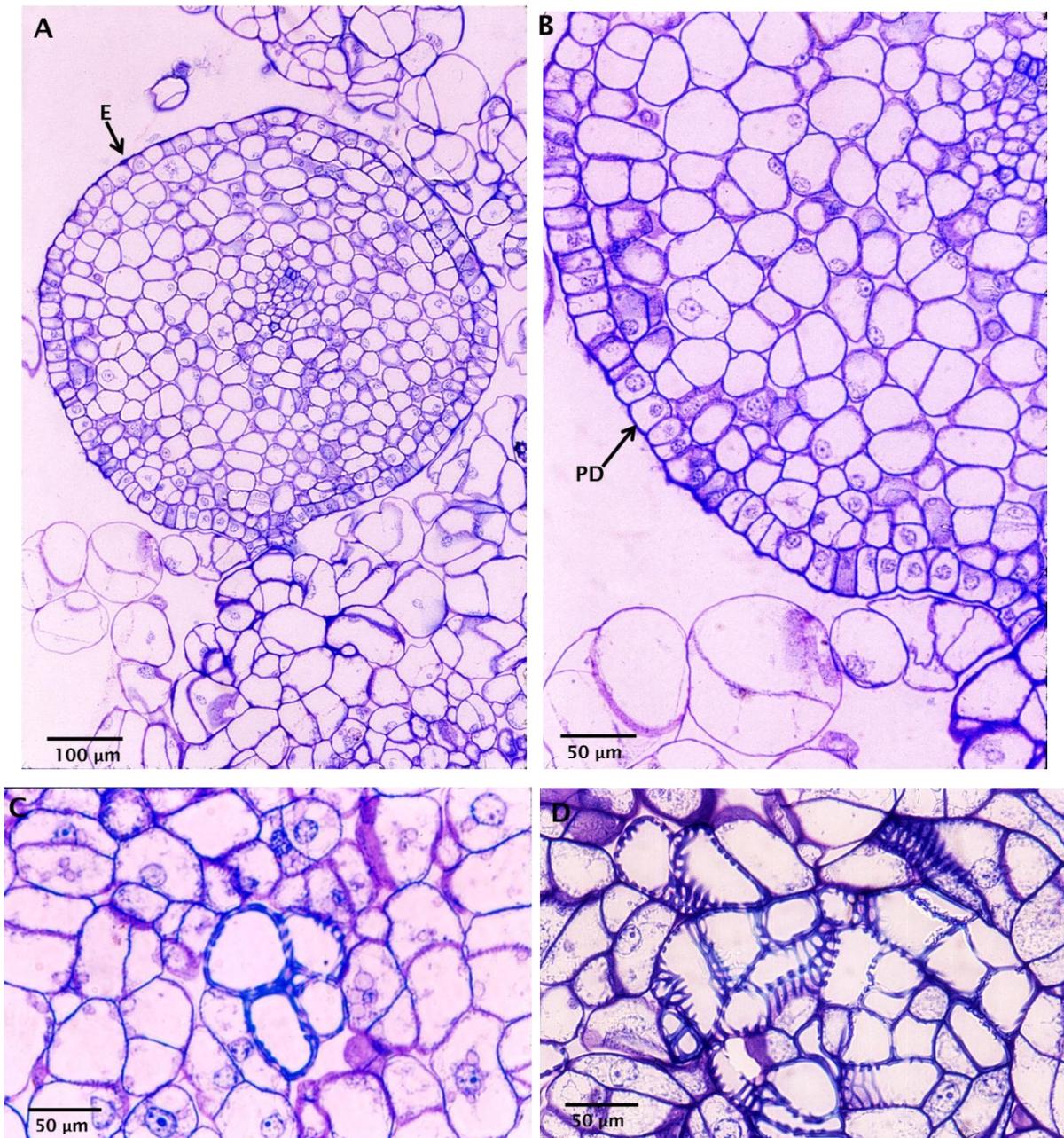


Figura 81. a) Corte longitudinal de un embrión somático en etapa globular, **b)** Protodermis rodeando al embrión somático, **c)** y **d)** Diferenciación de haces vasculares en el embrión somático. Embrión (E) y protodermis (PD).

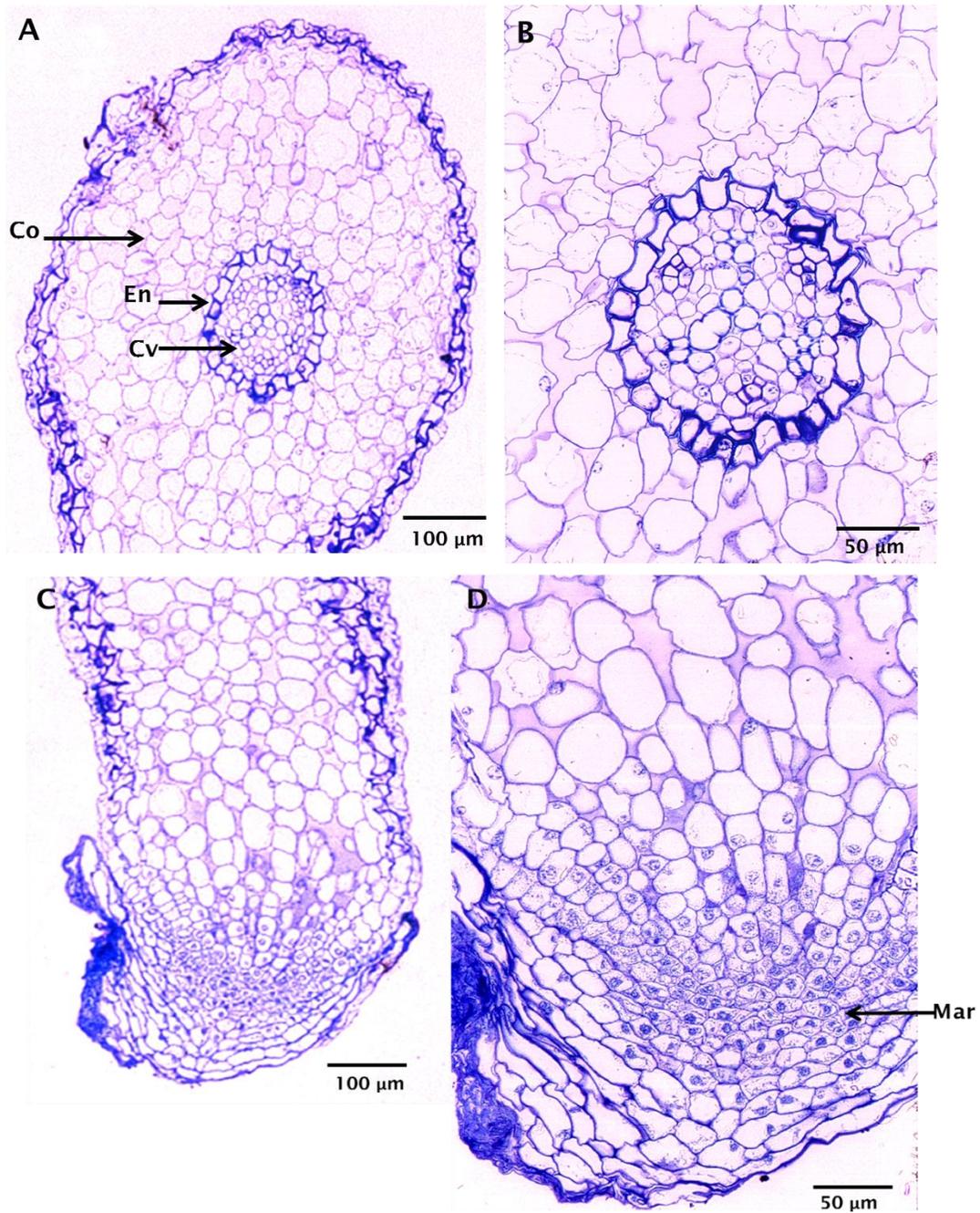


Figura 82. Formación de una raíz *in vitro*: **a)** Corte transversal de raíz, obtenida a partir de callo embriogénico, **b)** Mayor aumento del cilindro vascular, **c)** Corte longitudinal de raíz secundaria y **d)** Mayor aumento del meristemo apical de raíz. Córtez (Co), endodermis (En), cilindro vascular (Cv), meristemo apical de raíz (Mar).

En el análisis micromorfológico se observó la formación de un embrión globular (Figura 83a), en donde también se notan las hojas compuestas por células epidérmicas (Figura 83b) y además se formaron raíces laterales de manera endógena (Figura 83c) con pelos radiculares cubriendo la superficie (Figura 83d).

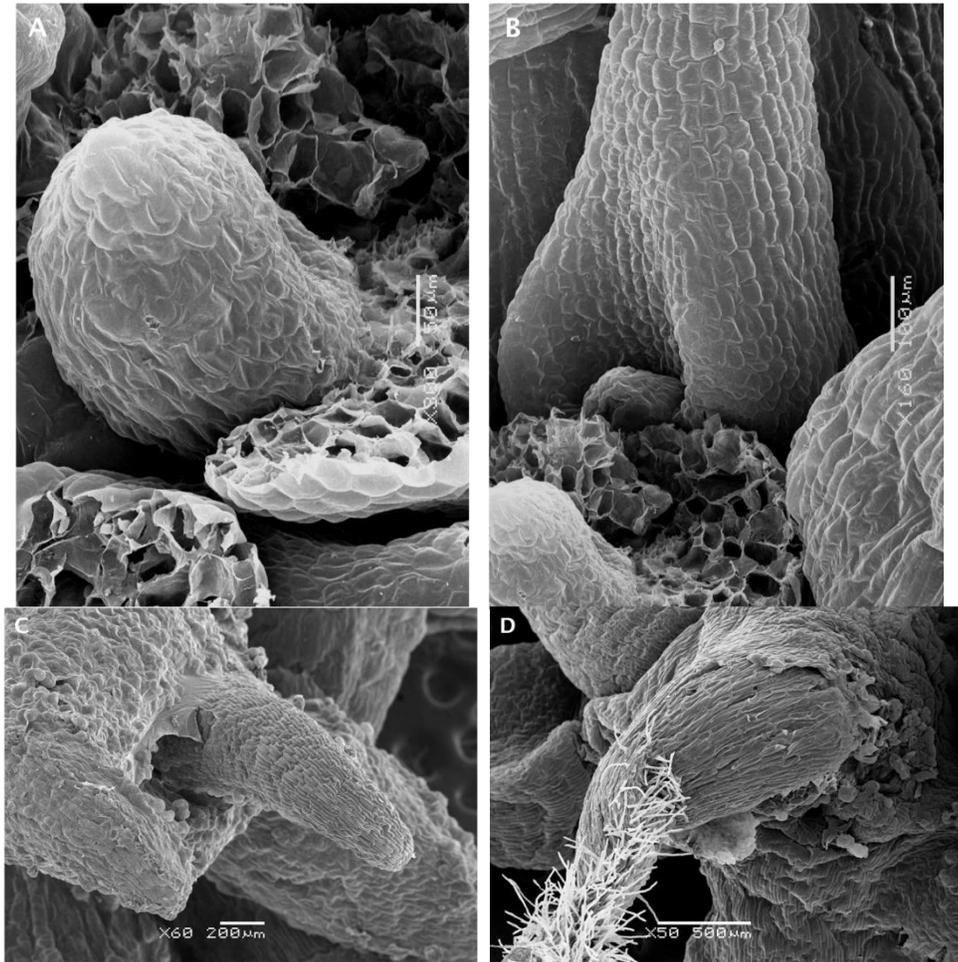


Figura 83. Micromorfología de estructuras presentes en el callo embriogénico: **a)** Embrión globular, **b)** Formación de hojas, **c)** Formación de raíz lateral (endógena) y **d)** Raíz lateral con pelos radiculares.

A través de las observaciones histológicas en este trabajo se confirmaron, las características distintivas de un embrión somático, como un individuo con estructura bipolar (formación de meristemo brote-raíz), con un sistema provascular cerrado y asilado del tejido parental (Williams y Maheswaran, 1986; Escalante et al. 1984; Schumann et al. 1995).

9. CONCLUSIONES

9.1 Contaminación

El proceso de desinfección empleado para los tres tipos de explantes permitió su establecimiento *in vitro* en condiciones asépticas.

La contaminación de los cultivos a partir de explantes de raíz presentó valores significativos, por lo que se recomienda un pre-tratamiento de desinfección en invernadero.

Los explantes de hoja y tallo no presentaron valores significativos de contaminación por lo cual se recomienda ampliamente este tipo de explantes para utilizarlos en métodos de micropropagación *in vitro* en especies de *Agave*.

9.2 Oxidación (carbón activado v/s PVP)

Todos los cultivos *in vitro* a partir de ápices foliares sembrados en MS 50% con PVP (2 g/L) presentaron oxidación incluso el grupo control.

El empleo de carbón activado (1 g/L) en los cultivos *in vitro* a partir de explantes de hoja, resultó más eficiente para controlar la oxidación.

El tratamiento 22 (BA 0.5/2 mg/L 2,4-D) de cultivos *in vitro* a partir de ápices foliares sembrados en MS 50% con carbón activado (1 g/L) fue el que presentó mayor oxidación.

Los tratamientos 2 (BA 0.5 mg/L), 11 (2,4-D 0.5 mg/L) y 22 (BA 0.5/2 mg/L 2,4-D) presentaron diferencias significativas entre el empleo de carbón activado o de PVP para los explantes de ápices foliares.

9.3 Cultivo a partir de ápices foliares

Todos los explantes de hoja, tanto ápices como bases sembrados en MS 50% adicionado con citocininas presentaron hasta 60% de hiperhidratación.

Los explantes que dieron lugar a una mayor cantidad de callo fueron aquellos con altas concentraciones de auxinas.

La coloración del callo en presencia de BA tuvo una coloración verde a diferencia del callo obtenido en altas o solo con 2,4-D, el cual presentó una coloración café.

9.4 Cultivos a partir de bases foliares

Para la formación de callo en los explantes de bases foliares sembrados en MS 50% con carbón activado (1 g/L) es necesaria la combinación de altas concentraciones de auxinas (2,4-D) y baja o intermedia concentración de citocininas (BA).

El tratamiento 12 (BA/2,4-D 0.5/0.5 mg/L) dio lugar a la formación de un mayor número de brotes (hasta 6) vía organogénesis indirecta en los cultivos *in vitro*.

Únicamente la adición de BA en altas concentraciones (2-3 mg/L) promovieron una respuesta vía organogénesis indirecta en cultivos *in vitro*.

El tratamiento 23 (BA/2,4-D 1/2 mg/L) formó un mayor número de embriones somáticos.

9.5 Cultivos a partir de segmentos de tallo

Los cultivos de tallo en presencia de altas concentraciones de citocininas dieron lugar a la formación de órganos vía organogénesis directa.

Los tratamientos 4 (BA 2 mg/L) y 5 (BA 3 mg/L) promovieron una mayor formación de brotes.

Los tratamientos 26 (3 mg/L 2,4-D), 31 (4 mg/L 2,4-D) y 33 (BA 1 mg/L en combinación con 4 mg/L 2,4-D), promovieron la formación de callo embriogénico.

La proliferación vía organogénesis directa en total generó más de 800 brotes.

El mayor número de regenerantes se logró en el tratamiento 4 (BA 2 mg/L) con aproximadamente 70 brotes. Después de tres meses en medio basal sin RCV, los embriones somáticos germinaron y se podían observar hasta 60 individuos por frasco. Los explantes de hoja (ápices y bases), así como los tallos cultivados *in vitro* de *A. victoriae-reginae* fueron capaces de regenerar plantas completas.

9.6 Cultivos a partir de segmentos de raíces

Los tratamientos 21 (2 mg/L 2,4-D) P, 26 (3 mg/L 2,4-D) y 31 (4 mg/L 2,4-D) promovieron la formación de callo embriogénico.

A los 50 días iniciado se observó la formación de embriones somáticos en el tratamiento 28 (BA/2,4-D 1/3 mg/L).

Los cultivos *in vitro* de los cuatro tipos de explantes (ápices y bases foliares, tallos y raíces) respondieron de mejor manera después de subcultivarlos a MS 50% sin RCV con carbón activado (1 g/L).

Los cuatro tipos de explantes utilizados (ápices y bases foliares, tallos y raíces) promovieron la formación de callo embriogénico. Sin embargo, los segmentos de hoja mostraron un mayor potencial de regeneración vía embriogénesis somática.

9.7 Individualización y enraizamiento de los brotes regenerados

El tratamiento con sacarosa al 25% incrementó la longitud de las hojas de la roseta en los cultivos de *A. victoriae-reginae*.

La sacarosa al 25% (7.5 g/L) indujo la formación de una mayor cantidad de raíces, el número de éstas aumentó conforme transcurrieron los días, pero inhibió su ramificación.

Se obtuvo un mayor número de hojas en el medio de cultivo adicionado con 50% de sacarosa (15 g/L).

Los brotes cultivados en MS 50% con 100% de sacarosa (30 g/L) crecieron hiperhidratados pero también promovieron la formación de embriones somáticos.

No es necesaria la adición de RCV para promover la proliferación de brotes y plántulas *in vitro* de *A. victoriae-reginae*, se recomienda únicamente utilizar MS 50% con carbón activado (1 g/L).

Las plántulas de *A. victoriae-reginae* no requirieron RCV para su enraizamiento.

9.8 Aclimatización

Se obtuvo el 86% de supervivencia de plantas aclimatizadas de *A. victoriae-reginae*.

Se recomienda utilizar sustrato no esterilizado para la aclimatización de plantas de *A. victoriae-reginae* y *A. comiteco*.

9.9 Histología y morfología

El análisis anatómico reveló la formación de callo embriogénico, proembriones y embriones somáticos en el tratamiento 23 (BA/2,4-D 1/2 mg/L) a partir de explantes de base foliar de *A. victoriae-reginae* sembrados en MS 50% con carbón activado (1 g/L).

Los análisis histológicos documentaron la presencia del proceso de embriogénesis somática en los callos de explantes de bases foliares de *A. victoriae-reginae*.

Mediante observaciones histológicas se pueden dilucidar el posible origen y desarrollo ontogénico de embriones somáticos, brotes y raíces de *A. victoriae-reginae*. Se logró establecer un protocolo eficiente para la regeneración de *A. victoriae-reginae*, especie endémica de México que se encuentra actualmente en peligro de extinción, los resultados vislumbran una opción para el estudio, la conservación y el aprovechamiento sostenible de ésta y otras especies de agaves en las que la obtención de semillas se dificulte y la única herramienta útil para propagación sea a través de explantes de hoja, tallo y raíz.

10. PERSPECTIVAS

En la presente investigación se representa la obtención de un método eficiente de micropropagación *in vitro* de *A. victoriae-reginae*. Para ampliar futuros trabajos de conservación *ex situ* en *A. victoriae-reginae* se formulan las siguientes recomendaciones:

- ✿ Promover el flujo de semillas y plantas a través de una red de Jardines Botánicos, Institutos, Escuelas y Facultades, a través de un intercambio genético entre los individuos donados con el único fin de preservar la flora mexicana.
- ✿ Proponer a las autoridades que actualicen la Norma Oficial Mexicana (NOM-059-SEMARNAT-2010) ya que tiene más de cuatro años que fue decretada y que desgraciadamente muchas especies podrían encontrarse en peligro crítico o ya extintas en vida silvestre. La falta de conocimiento acerca de la flora mexicana es un factor detonante de la rápida desaparición de especies prioritarias.
- ✿ Se recomienda explorar más el potencial de las raíces como fuente de material vegetal para el establecimiento de cultivos *in vitro*.
- ✿ Explorar y aplicar nuevas técnicas para mantener un banco de embriones encapsulados con fines de conservación.
- ✿ Encontrar un método alternativo que permita el aumento en la supervivencia de las plantas durante el proceso de aclimatización, esto optimizará el proceso de micropropagación como herramienta de conservación en Colecciones Botánicas, Jardines Botánicos e instituciones afines.
- ✿ Explorar las respuestas morfogénicas a través de cortes histológicos, microscopía electrónica y de barrido, y con la fortuna de poder observar estructuras que lleguen a aclarar las rutas morfogénicas que se llevan a cabo *in vitro*.

Se sugiere el Cultivo de Tejidos Vegetales en combinación con las técnicas histológicas como base importante para la conservación y uso sostenible de *A. victoriae-reginae*. Sin embargo, es importante realizar estudios genéticos y ecológicos antes de considerar reintroducir plantas propagadas vía CTV a vida silvestre.

11. APÉNDICES

Apéndice 1

Tabla 20. Medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS), 1962.

N°	Componentes	MS 100% (g/l)	MS 50% (g/l)
1	MACRONUTRIENTES		
	(NH ₄)NO ₃	1.65	0.825
	KNO ₃	1.9	0.950
	MgSO ₄ * 7H ₂ O	0.37	0.185
	KH ₂ PO ₄	0.17	0.085
2	CALCIO		
	CaCl ₂ * 2H ₂ O	0.44	0.220
3	MICRONUTRIENTES		
	MnSO ₄ * H ₂ O	0.01689	0.0084445
	ZnSO ₄ * 7H ₂ O	0.0086	0.0043
	H ₃ BO ₃	0.0062	0.0031
	KI	0.00083	0.000415
	Na ₂ MoO ₄ * 2H ₂ O	0.00025	0.000125
	CuSO ₄ * 5H ₂ O	0.000025	0.0000125
	CoCl ₂ * 6H ₂ O	0.000025	0.0139
4	FIERRO		
	FeSO ₄ 7H ₂ O	0.0278	0.0139
	Na ₂ EDTA	0.0373	0.01865
5	VITAMINAS		
	Tiamina * HCl	0.0001	0.00005
	Ácido Nicotínico	0.0005	0.00025
	Piridoxina * HCl	0.0005	0.00025
6	INOSITOL	0.10	0.5
7	GLICINA	0.002	0.001
8	CARBOHIDRATOS (Sacarosa)	30.0	
9	GELIFICANTE (Gellangum y Gellrite)	3.5	

pH = 5.7

Apéndice 2

Tabla 21. Preparación del Fijador Navashin (Sandoval et al. 2005)

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

✿ **Nota.** Deben mezclarse cantidad iguales de las soluciones (A y B) justo antes de fijar el material.

Tabla 23. Prueba estadística Tukey para ápices foliares sembrados en MS 50% con CA para la formación de callo con citocininas (BA). Prueba estadística ANOVA ($P = 0.0001$)

	0.0	0.5	1.0	2.0	3.0
0.0	-				
0.5	0.005	-			
1.0	NS	NS	-		
2.0	NS	0.000	0.002	-	
3.0	NS	0.000	0.011	NS	-

Tabla 24. Prueba estadística Tukey para ápices foliares sembrados en MS 50% con CA para la formación de callo con auxinas (2,4-D). Prueba estadística ANOVA ($P = 0.0001$)

	0.0	0.1	0.5	1.0	2.0	3.0	4.0
0.0	-						
0.1	NS	-					
0.5	NS	NS	-				
1.0	NS	NS	NS	-			
2.0	0.006	0.001	0.000	NS	-		
3.0	0.014	0.002	0.000	NS	NS	-	
4.0	NS	NS	0.002	NS	NS	NS	-

Tabla 25. Prueba estadística Tukey para bases foliares sembrados en MS 50% con CA para la formación de callo con las distintas concentraciones de RCV BA/2,4-D. Prueba estadística ANOVA ($P = 0.0001$)

BA	2,4D	0.0							0.5						
		0.0	0.1	0.5	1.0	2.0	3.0	4.0	0.0	0.1	0.5	1.0	2.0	3.0	4.0
0.0	0.0	-													
	0.1	NS	-												
	0.5	NS	NS	-											
	1.0	NS	NS	NS	-										
	2.0	NS	0.027	0.002	NS	-									
	3.0	0.027	0.002	0.000	NS	NS	-								
	4.0	0.027	0.002	0.000	NS	NS	NS	-							
0.5	0.0	0.027	0.002	0.000	NS	NS	NS	NS	-						
	0.1	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	-					
	0.5	NS	NS	0.027	NS	NS	NS	NS	NS	NS	-				
	1.0	0.027	0.002	0.000	NS	-									
	2.0	NS	0.027	0.002	NS	-									
	3.0	NS	NS	0.027	NS	-									
	4.0	NS	0.027	0.002	NS	-									

Tabla 26. Prueba estadística Tukey para bases foliares sembrados en MS 50% con CA para la formación de callo con citocininas (BA). Prueba estadística ANOVA ($P = 0.002$)

	0.0	0.5
0.0	-	
0.5	0.002	-

Tabla 27. Prueba estadística Tukey para bases foliares sembrados en MS 50% con CA para la formación de callo con auxinas (2,4-D). Prueba estadística ANOVA ($P = 0.001$)

	0.0	0.1	0.5	1.0	2.0	3.0	4.0
0.0	-						
0.1	NS	-					
0.5	NS	NS	-				
1.0	NS	NS	NS	-			
2.0	NS	0.043	0.043	NS	-		
3.0	NS	0.043	0.043	NS	NS	-	
4.0	NS	0.012	0.012	NS	NS	NS	-

Tabla 28. Prueba estadística Tukey para bases foliares sembrados en MS 50% con CA para la obtención de brotes vía organogénesis indirecta con las distintas concentraciones de RCV BA/2,4-D. Prueba estadística ANOVA ($P = 0.004$)

BA	2,4D	0.0							0.5							
		0.0	0.1	0.5	1.0	2.0	3.0	4.0	0.0	0.1	0.5	1.0	2.0	3.0	4.0	
0.0	0.0	-														
	0.1	NS	-													
	0.5	NS	NS	-												
	1.0	NS	NS	NS	-											
	2.0	NS	NS	NS	NS	-										
	3.0	NS	NS	NS	NS	NS	-									
	4.0	NS	NS	NS	NS	NS	NS	-								
0.5	0.0	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	-							
	0.1	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	-						
	0.5	0.012	0.012	0.012	0.012	NS	0.012	0.012	0.012	NS	-					
	1.0	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0.012	-				
	2.0	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0.012	NS	-			
	3.0	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0.012	NS	NS	-		
	4.0	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0.012	NS	NS	NS	-	

Tabla 29. Prueba estadística Tukey para bases foliares sembrados en MS 50% con CA para la formación de callo con citocininas (BA). Prueba estadística ANOVA (***P* = 0.013**)

	0.0	0.5	1.0	2.0	3.0
0.0	-				
0.5	NS	-			
1.0	NS	NS	-		
2.0	NS	NS	0.018	-	
3.0	NS	NS	0.018	NS	-

Tabla 31. Prueba estadística Tukey para explantes de Tallo sembrados en MS 50% con CA para la inducción a callo con citocininas (BA). Prueba estadística ANOVA ($P=0.001$)

	0.0	0.1	0.5	1.0	2.0	3.0	4.0
0.0	-						
0.1	NS	-					
0.5	NS	NS	-				
1.0	NS	NS	NS	-			
2.0	0.039	NS	NS	NS	-		
3.0	0.039	NS	NS	NS	NS	-	

Tabla 32. Prueba estadística Tukey para explantes de Tallo sembrados en MS 50% con CA durante la inducción con auxinas (2,4-D). Prueba estadística ANOVA ($P = 0.001$)

	0.0	0.1	0.5	1.0	2.0	3.0	4.0
0.0	-						
0.1	NS	-					
0.5	NS	NS	-				
1.0	NS	NS	NS	-			
2.0	0.010	NS	NS	NS	-		
3.0	0.015	NS	NS	NS	NS	-	
4.0	0.003	NS	NS	NS	NS	NS	-

Tabla 33. Prueba estadística Tukey para explantes de raíz en MS 50% con CA para la formación de callo embriogénico con auxinas (2,4-D). Prueba estadística ANOVA ($P = 0.0001$)

	0.0	0.1	0.5	1.0	2.0	3.0	4.0
0.0	-						
0.1	NS	-					
0.5	NS	NS	-				
1.0	NS	NS	NS	-			
2.0	0.000	0.000	NS	NS	-		
3.0	0.001	0.001	NS	NS	NS	-	
4.0	0.004	0.004	NS	NS	NS	NS	-

12. BIBLIOGRAFÍA

- ❖ **Ackerman, J. D.** 1998. Evolutionary potential in or orchids: patterns and strategies for conservation. *Selbyana* 19(1):8-14.
- ❖ **Acosta, E., Sánchez, B y Bañón, M.** 2000. Auxinas. En: Azcón, J. y Bieto, M. (eds). *Fundamentos de fisiología vegetal*. Primera edición. McGrawHill/Interamericana de España. Universidad de Barcelona. 305-323 pp.
- ❖ **Al-Bahrany, A. M.** 1994. Influence of salinity on free proline accumulation total RNA content and some minerals (K, Na, Mg, Ca and N) in pepper (*Capsicum annum* L.) *Annals Of Agricultural Science* 39: 699-707.
- ❖ **Al-Khayri, J. M. and Al-Bahrany, A. M.** 2002. Callus growth and proline accumulation in response to sorbitol and sucrose induced osmotic stressing rice. *Biology Plant* 45:609-611.
- ❖ **Alvarado, S. J.** 2011. Regeneración *in vitro* de *Prosthechea chacaoensis* (Rchb.f) W.E. Higgins. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. 125 pp.
- ❖ **Álvarez, A.** 1987. Sistemática y filogenia de la familia Agavácea Endlicher Ph.D. dissertation. Facultad de Biología, Jardín Botánico Nacional. Universidad de la Habana, Cuba.
- ❖ **Álvarez-Zayas, A.** 1995. Los Agaves de las Antillas. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* (57):37-48.
- ❖ **Anon.** 1980. Ann Rep. And Accounts, British Petroleum Co. Ltd. 1979.
- ❖ **Anonymus.** 1994. Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-1994, que determina las especies de flora y fauna silvestres terrestres y acuáticas en peligro de extinción, amenazadas, raras y las sujetas a protección especial, y que establece especificaciones para su protección. Diario Oficial, Lunes 16 de mayo de 1994.
- ❖ **Arzate-Fernández, A. M. y Mejía-Franco, R.** 2011. Embryogenic capacity of induced calli on zygotic embryonic axis of *Agave angustifolia* Haw. *Revista Fitotecnica Mexicana* 34 (2):101-106.
- ❖ **Ávila, S.** Ilustradora y artista de arte visual.
<https://www.facebook.com/theparadoxspiral?pnref=story>

- ❖ **Ayala, L. M.** 2010. Inducción de embriogénesis somática en cultivo *in vitro* de *Agave atrovirens* Karw. Ex Salm- Dyck. Tesis de Maestría. IPN. 83 pp.
- ❖ **Bairu, M. W., Jain, N., Stirk, W. A., Dolezal y Van Staden, J.** 2009. Solving the problema of shoot-tip necrosis in *Harpagophytum procumbens* by changing the cytokinin types, calcium and boron concentrations in the medium. *South African Journal of Botany* 75 (1): 122-127.
- ❖ **Berger, A.** 1915. Die Agaven. Beitrâge zuiner monographie. Jena.
- ❖ **Baynes, M., Newcombe, G., Dixon, L, Castlebury, L. & O'Donnell, K.** 2011. A novel plant-fungal mutualism associated with fire. *Fungal Biology* 3:1-12.
- ❖ **Bergmann, L.** 1967. Wachstum gruner Suspensionskulturen von *Nicotiana tabacum* Var. "Samsun" mit CO₂ als Kohlenstoffquelle *Planta* 74. 243-249.
- ❖ **Berger, A.** 1915. Die Agaven. Beitrâge zuiner monographie. Jena.
- ❖ **Binh, L. T., Muoi, L. T., Oanh, H. T., Thang, T. D y Pong, D. T.** 1990. Rapid propagation of *Agave* by *in vitro* tissue culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* (23):67-70.
- ❖ **Caballero, J. y Cortés, L.** 2012. Lista de las especies presentes en las colecciones de plantas vivas de los jardines, miembros de la Asociación Mexicana de Jardines Botánicos A.C. En: Caballero, J. Jardines Botánicos contribución a la conservación vegetal de México. CONABIO. México.
- ❖ **Campbell, C. L. & Madden, L. V.** 1990. *Introduction to Plant Disease Epidemiology*. Editorial John Wiley & Son. New York, USA. 560 p.
- ❖ **Capital Natural de México.** 2009.
www.biodiversidad.gob.mx/pais/pdf/CapNatMex (Consulta electrónica realizada en abril 2012).
- ❖ **Casson, S. A & Lindsey, K.** 2003. Genes and signaling in root development. *New Phytologist*. University of Durham, South Road, Durham. UK.
- ❖ **Chandler, M. T., Tandeau de Marsac N. & Kouchkovsky, Y.** 1972. Photosynthetic growth of tobacco cells in liquid suspensions. *Canadian Journal of Botany* 50: 2265-2270.
- ❖ **Chávez, A. V. M.** 1993. Embriogénesis somática a partir de foliolos jóvenes de plantas maduras de *Ceratozamia mexicana* var. *robusta* (Miq.) Dyer (Zamiaceae) especie en peligro de extinción. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México. 148 pp.

- ❖ **CITES.** 1995, 2003. Appendices I, II and III to the convention on International trade in endangered species of wild fauna and flora. *US Fish and Wildlife Service*. Washington, DC.
- ❖ **CONABIO.** 2008. *Capital Natural de México volumen 1 Conocimiento Actual de la Biodiversidad*. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México.
- ❖ **CONABIO.** 2013. ¿Qué es un país megadiverso? <http://www.biodiversidad.gob.mx/pais/quees.html> (Consulta 20 de mayo de 2013).
- ❖ **CONABIO.** 2014. Cartel México Tierra de Magueyes. <http://www.biodiversidad.gob.mx/Difusion/carteles/carteles.html> (Consulta 20 de mayo de 2014).
- ❖ **Cui, M. y Nobel, P. S.** 1992. Nutrient status, water uptake and gas Exchange for three desert succulents infected with mycorrhizal fungi. *New Phytologist*. 122(4): 643-649.
- ❖ **Dahlgreen, R.** 1983. "General aspects of angiosperm evolution and macrosystematics". *Nordic Journal of Botany* (3):119-149.
- ❖ **Das, T.** 1992. Micropropagation of *Agave sisalana*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* (31):253-255.
- ❖ **Davies, P. J.** 1995. *Plant hormones: physiology, biochemistry, and molecular biology*. Second edition. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands. 833 pp.
- ❖ **Davies, P. J.** 2007. *Plant Hormones, biosynthesis, signal transduction, Action!* 3^{ed}. Springer, Netherlands. 750 pp.
- ❖ **Debergh, P. C. and Zimmerman, R. H.** 1992. *Micropropagation. Technology and application*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands. 1-13 pp.
- ❖ **Domínguez, R. M., Alpuche, A., Vasco, N y Pérez, M.** 2008. Efecto de citocininas en la propagación *in vitro* de agaves mexicanos. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 31(4):317-322.
- ❖ **Eguiarte, L. E., Souza, V. y Silva-Montellano, A.** 2000. Evolución de la Familia Agavaceae: Filogenia, Biología Reproductiva y Genética de poblaciones. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* (66):131-150.

- ❖ **Eguiarte, L. E. y González, A.** 2007. De genes y magueyes, el estudio y conservación de los recursos genéticos del tequila y el mezcal. *Ciencias* (87):28-35.
- ❖ **Enríquez del Valle, J. R., Carrillo-Castañeda, G., y Rodríguez de la O, J.** 2005. Sales inorgánicas y ácido indolbutírico en el enraizamiento *in vitro* de brotes de *Agave angustifolia*. *Revista Fitotecnica Mexicana* (28):175-178.
- ❖ **Epstein, E. y Ludwig- Müller, J.** 1993. Indole-3-butyric acid in plants: occurrence, synthesis, metabolism and transport. *Physiologia Plantarum* (88): 382-389.
- ❖ **Epstein, E., Rush, J. D., Kingsbury, R. W., Kelley, D. B., Cinnigham, G. A and Wrono, A. F.** 1980. Saline culture of crops: a genetic approach. *Science* 28: 89-121.
- ❖ **Falk, D. A. y Holsinger, K. E.** 1991. *Genetics and conservation of rare plants*. Oxford University Press. Nueva York. 238 pp.
- ❖ **Flores-Abreu, N. I.** 2007. Coevolución entre *Agave sensu lato* y sus murciélagos polinizadores (Phyllostomidae). Tesis Maestría, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México. 79 pp.
- ❖ **Flores, O. y Gerez, P.** 1994. *Biodiversidad y conservación en México: vertebrados, vegetación y uso de suelo*. CONABIO, U.N.A.M., México. 439 pp.
- ❖ **Franco, P.** 1995. Las Euforbiaceas de la Región de Araracuara Bogotá, Colombia. (3):5-9.
- ❖ **Gaspar, T., Kevers, C., Rampant, F., Chèvecoeur, M., Penel, C., Greppin, H. and Dommes, J.** 1996. Changing concepts in plant hormone action. *In Vitro Cellular & Developmental Biology* 39(2): 85-106.
- ❖ **García-Mendoza, A.** 1993. Distribución del género *Echeveria* (Crassulacea) en el estado de Oaxaca. *XII Congreso Mexicano de Botánica*. Mérida, Yucatán. 107 pp.
- ❖ **García-Mendoza A. y Galván V. R.,** 1995. Riqueza de las familias *Agavaceae* y *Nolinaceae* en México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*.

- ❖ **García-Mendoza A.** 1998. Con sabor a Maguey. Guía de la Colección. Nacional. de *Agavaceae*. y *Nolinaceae*. del Jardín Botánico Instituto de Biología, U.N.A.M. 114 pp.
- ❖ **García-Mendoza A.** 2002. Distribution of *Agave* (*Agavaceae*) in Mexico. *Cactus and Succulent Journal* (74):177-188.
- ❖ **García-Mendoza A.** 2004. Agaváceas, En: García-Mendoza, A. J., Ordóñez M. J. y Briones-Salas M. 2004. *Biodiversidad de Oaxaca*. Instituto de Biología, U.N.A.M. Fondo Oaxaqueño para la Conservación de la Naturaleza- World Wildlife Fund, México.159-169 pp.
- ❖ **García-Mendoza A.** 2007. Los Agaves de México, *Ciencias* (87): 14.23
- ❖ **Garnica, R. L y Pérez, E.** 2003. Cultivo y propagación *in vitro* de Cactáceas, Agaváceas, Nolináceas y especies forestales. Depto. de Química, Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes.
- ❖ **Geetha, S. and Shetty, A.** 2000. *In vitro* propagation of *Vanilla planifolia*, a tropical orchid. *Current Science* 79(6): 886-889.
- ❖ **Gentry, S.** 1972. *The Agave Family of Sonora*. USA
- ❖ **Gentry, S.** 1978. *The Agaves of Baja California*. California Academy of Sciences.
- ❖ **Gentry, S.** 1982. *Agaves of continental North America*. The University of Arizona Press E.U.A. 670 pp.
- ❖ **George, E. F., Hall, M. A. y Klerk, G. J.** 2008. *Plant propagation by tissue culture*. 3ra Ed. Springer. Dordrecht. 501 pp.
- ❖ **George, E. F. and Sherrington, P. D.** 1984. *Plant propagation by tissue culture*. Handbook and directory of commercial laboratories. Exegetics Ltd. Eversley, Basingstone, England. 709 pp.
- ❖ **Goldhaber, P. G. D.** 2008. Inducción de cultivos *in vitro* de *Ligusticum porteri* Coulter & Rose (Apiaceae) para la obtención de Z-ligustílida. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. 205 pp.
- ❖ **Gómez, M. H. A.** 2009. Cultivo *in vitro* de *Laelia gouldiana* Rchb.f. (Orchidaceae), especie endémica de México, extinta en la naturaleza. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. 133 pp.
- ❖ **Gómez, P. R. M del C.** 2010. Inducción morfogénica de las Palmas (*Chamaedorea elegans* Mart. y *Chamaedorea sartorii* Liebm.) y el *Agave*

salmiana Otto. Mediante cultivo *in vitro*. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. 118 pp.

- ❖ **Gómez, R. K.** 1998. Embriogénesis somática. En: Ponce, J. N. (ed.). Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Vol. 1. Instituto de biotecnología de las plantas. Santa Clara, Cuba. 57-77 pp.
- ❖ **González, G. S., Alemán, R., Trujillo, M., Keb, M., Abreu, F., Barredo, M. L., Robert, R. y Cornides, M. T.** 2004. El cultivo *in vitro* como alternativa de la recuperación henequenera (*Agave fourcroydes*). *Biotecnología Aplicada* 21 (1): 44-48.
- ❖ **Good-Avila S., Souza V., Gaut B. S. y Eguiarte L. E.** 2006. Timing and rate of speciation in *Agave* (Agavaceae). *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103(24):9124-9129.
- ❖ **Groenewald, E. G., Wessels, D. C. J. and Koeleman.** 1977. A. Callus formation and subsequent plant regeneration from seed tissue of an *Agave* species (Agavaceae). *Z Pflanzenphysiol* 21: (4) 369-373.
- ❖ **Haccius, B.** 1978. Question of unicellular origin of non-zygotic embryos in callus cultures. *Phytomorphology* 28:74-81.
- ❖ **Hancock, J. T., Desikan, R. and Neil, S. J.** 2001. Role of reactive oxygen species in cell signalling pathways. *Biochemical Society Transactions* 29: 345-350.
- ❖ **Hazra, S. K., Sudripta, D. y Das, A. K.** 2002. Sisal regeneration via organogenesis. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* (70):235-240.
- ❖ **Hernández, M. H y Godínez, A. H.** 1994. Contribución al conocimiento de las cactáceas mexicanas amenazadas. *Acta Botánica Mexicana.* (26):33-52.
- ❖ **Hu, C. y Wang, P. J.** 1983. Meristem, Shoot Tip, and Bud Cultures. En: Evans D. F., Sharp, W. R., Ammirato, P. V. y Yamada, Y. (eds). Basic Techniques of Plant Cell Culture. Vol 1. Techniques for Propagation and Breeding. 177-227 pp.
- ❖ **Hurtado, D. y Merino, M. E.** 1987. *Cultivo de Tejidos Vegetales*. Trillas. México. 229 pp.
- ❖ **Irwin-Smith, C., Pellmyr, O., Althoff, D. M., Balcázar-Lara, M., Leebens-Mack, J. y Segraves, K. A.** 2008. Pattern and timing of diversification in

- Yucca* (Agavaceae): Specialized pollination does not escalate rates of diversification. *Proceedings of the Royal Society* (275):249-258.
- ❖ **Farrukh, J. & Sumaira, I.** Effect of sucrose induced osmotic stress on callus growth and biochemical aspects of two wheat genotypes. 2008. *Pakistan Journal of Botany* 40(4): 1487-1495.
 - ❖ **Jankiewics, L.** 1999. Desarrollo vegetal. Sustancias Reguladoras. Universidad Autónoma de Chapingo, Texcoco, México. 121 pp.
 - ❖ **Jiménez, E. G.** 1998. Cultivo de ápices y meristemas. In: Ponce, J. N. (ed). Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Vol. 1. Instituto de biotecnología de las plantas. Santa Clara, Cuba. 45-56 pp.
 - ❖ **Jones, D. L. y Dransfield, J.** 1999. Palmas del mundo. Ediciones Omega, Barcelona, España. 410 pp.
 - ❖ **Koch, K. E.** 1996. Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47: 509-540.
 - ❖ **Körbes, A. P. & Droste, A.** 2005. Carbon sources and polyethylene glycol on soybean somatic embryo conversion. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 40(3):211-216.
 - ❖ **Kozai, T.** 1991a. Photoautotrophic micropropagation. *In Vitro Cellular Developmental Biology- Plant* 27, 47-51.
 - ❖ **Khuri, S. and Moorby, J.** 1995. Investigations into the roles of sucrose in potato cv. Estima microtuber production *in vitro*. *Annals of Botany* 75:295-303.
 - ❖ **Lara, M. L.** 2010. Micropropagación de *Aporocactus flagelliformis* (L.) Lem. (Cactaceae), especie endémica de México: propuesta para su conservación y aprovechamiento. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. 98 pp.
 - ❖ **Larosa, P. C., Hasegawa, P. M. & Bressan, R. A.** 1981. Initiation of photoautotrophic potato cells. *Horticultural Science* (16) 433.
 - ❖ **Leifert, C. and Waites, W. M.** 1994. Dealing with microbial contaminants in plant tissue and cell culture: hazard analysis and critical control points. *In Physiology, Growth and Development of Plants in Culture*. P. J. Lumsden, J.

- R. Nichocolar and W. J. Davies, eds. Kluwer Academic Publishers Netherlands. 363-378 pp.
- ❖ **Leifert, C. and Cassells, A. C.** (2001) Microbial Hazards in Plant Tissue and Cell Cultures. *In Vitro Cellular Developmental Biology Plant* (37):133-138.
 - ❖ **Linneo, C.** 1753. *Species Plantarum*.
 - ❖ **Llorente-Bousquets, J. y Ocegueda, S.** 2008. Estado del conocimiento de la biota, en capital natural de México, vol. I: *Conocimiento actual de la biodiversidad*. CONABIO. México. 283-322 pp.
 - ❖ **López-Curto, M., Márquez-Guzmán, J y Murguía, S. G.** 2005. *Técnicas para el estudio del desarrollo de Angiospermas*. Libro de Laboratorio. Coordinación de Servicios Editoriales de la Facultad de Ciencias, U.N.A.M. México. 116 pp.
 - ❖ **Loyola-Vargas, V. M. and Vázquez-Flota, F.** 2006. An introduction to plant cell culture: Back to the future. *Methods in Molecular Biology* 318: 3-8.
 - ❖ **Madrigal, L. R., Dorantes, G. M. y Rodríguez, O. J.** 1981. Propagación *in vitro* de henequén (*Agave fourcroydes* Lemaire). In: Primer simposio del Agave (p 11). CORDAMEX SA de CV Mérida, Yucatán, México.
 - ❖ **Madrigal, L. R., Pineda-Estrada, F. y Rodríguez, O. J.** 1989. *Agave* In: Ammirato, P. V., Evans, D. A. y Sharp, W. R. *Handbook of Plant Cell Culture*. McGraw Hill. 5:206-227.
 - ❖ **Marshall, C. J. y Liebherr, J. K.** 2000. Cladistic biogeography of the Mexican Transition Zone. *Journal of Biogeography* (27): 203- 216.
 - ❖ **Martínez, G. M.** 2011. Producción *in vitro* de taxanos de *Taxus globosa* Schlecht bajo diferentes condiciones de cultivo. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. 74 pp.
 - ❖ **Martínez-Palacios, A.** 1998. Evaluación genética y demográfica de *Agave victoriae-reginae* T. Moore y aplicación del cultivo de tejidos para su conservación. Tesis de doctorado. UNAM.
 - ❖ **Martínez-Palacios, A., Eguiarte, L. E. and Furnier, G. R.** 1999. Genetic Diversity of the endangered endemic *Agave victoriae-reginae* (AGAVACEAE) in the Chihuahuan Desert. *American Journal of Botany* 86(8):1093-1098.
 - ❖ **Martínez-Palacios, A., Ortega, L, Chávez, V. and Bye, R.** 2003. Somatic embryogenesis and Organogenesis of *Agave victoriae-reginae*:

considerations for its conservation. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. (74): 135-142.

- ❖ **Mata, R. M.** 2000. Morfogénesis en *Picea chihuahuana* Martínez, a partir del cultivo de tejidos de estructuras inmaduras. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México. 123 pp.
- ❖ **Meza, A.** 2014. Ilustrador y artista de arte visual. <http://ilustrationandcoffe.blogspot.mx/>
- ❖ **Mittler, R.** 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 7(9):405-10.
- ❖ **Mittler, R., Lam E., Shulaev V and Cohen, M.** 1999. Signals controlling the expression of cytosolic ascorbate peroxidase during pathogen-induced programmed cell death in tobacco. *Plant Molecular Biology* 39(5):1025-35.
- ❖ **Mittermeier, R. y Goettsch, C.** 1992. La importancia de la diversidad biológica de México. En: Sarukhán, J. Y R. Dirzo (comps.). *México ante los retos de la biodiversidad*. CONABIO. México.
- ❖ **Mok, M. C.** 1994. Cytokinins and plant development-an overview. Mok, D. W. S.; Mok, M. C. *Cytokinins-Chemistry, activity, and function*. Boca Raton, FL: CRC Press. 155-166.
- ❖ **Monja-Mio, M. K. and Robert, M. L.** 2013. Direct somatic embryogenesis of *Agave fourcroydes* Lem. Through thin cell layer culture. *In Vitro Cellular & Developmental Biology- Plant* 49:541-549.
- ❖ **Murashige, T. and Skoog, F.** 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plant*. 15:473-497.
- ❖ **Murthy, H and Pyati, A.** 2001. Micropropagation of *Aerides maculosum* Lind. (Orchidaceae). *In Vitro Cellular Developmental Biology Plant* 37:223-226.
- ❖ **Neill, S. J., Desikan, R., Clarke, A., Hurst, R. D and Hancock, J. T.** 2002. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. *Journal of Experimental Botany* 53(372) 1237-1247.
- ❖ **Nikam, T. D.** 1997. High frequency shoots regeneration in *Agave sisalana*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* (51):225-228.

- ❖ **Nikam, T. D., Bansude, G. M. Y. and Kumar, A.** 2003. Somatic embryogenesis in sisal (*Agave sisalana* Perr. Ex. Engelm). *Plant Cell Reports* (22):188-194.
- ❖ **Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010.** Protección ambiental de especies nativas de México de flora y fauna silvestres. Categorías de riesgo específicas para su inclusión, exclusión o cambio-lista de especies en riesgo. *Diario Oficial de la Federación*. Segunda Sección (jueves 30 de diciembre de 2010). México. 1-78 pp.
- ❖ **Orcutt, D. M. y Nilsen, E. T.** 2000. The physiology of plants under stress: soil and biotic factors. John Wiley and Sons. New York. 684 pp.
- ❖ **Palma, F.** 1991. El género *Agave* L. y su distribución en el estado de Oaxaca. Tesis de Licenciatura. Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala. U.N.A.M.
- ❖ **Palma, F.** 1998. Los agaves de Oaxaca (*Agave*, Agavaceae), recurso actual y potencial. *Sociedad y Naturaleza en Oaxaca* (2):61-70.
- ❖ **Papaplotzi, S. I.** 2008. Regeneración *in vitro* de *Agave salmiana* y determinación de azúcares totales. Tesis de Licenciatura. Instituto Tecnológico del Altiplano de Tlaxcala. SEP. 81 pp.
- ❖ **Pasternak, T., Potters, G., Caubergs, R. and Jansen, M. A.** 2005. Complementary interactions between oxidative stress and auxins control plant growth responses at plant, organ, and cellular level. *Journal of Experimental Botany*. 56(418): 1991-2001.
- ❖ **Pérez, H. F.** 2015. Propagación *in vitro* de *Mammillaria hernandezii*, cactácea endémica de México. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. 68 pp.
- ❖ **Pérez, Molphe-Balch, E. M., Ramírez, M. R., Núñez, P. H.G y Ochoa, A. N.** 1999. Introducción al Cultivo de Tejidos Vegetales. Universidad Autónoma de Aguascalientes. México. 179 pp.
- ❖ **Pospišilová, J., Tichá, I., Kadlecek, P., Haisel, D. and Plzáková, S.** 1999. Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions. *Biologia Plantarum* 42 (4): 481-497.
- ❖ **Portillo, L.** 2007. Somatic embryogenesis in *Agave tequilana* Weber cultivar azul. *In Vitro Cellular & Development Biology Plant* (43): 569-575.

- ❖ **Powers, D. E., Backhaus, R. A.** 1989. *In vitro* propagation of *Agave arizonica* Gentry & Weber. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 16:57-60.
- ❖ **Quint, M. & Gray, W. M.** 2006. Auxin signaling. *Current Opinion in Plant Biology* 9(5):448-453.
- ❖ **Ramírez, L. A.** 1936. Contribución al conocimiento de los Agaves del Valle de Actopan, Hgo. *Anales del Instituto de Biología Universidad Nacional Autónoma de México* (7):235-240
- ❖ **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):37-48.
- ❖ **Rahman, M. H., Islam, R., Hossain, R. and Islam, M. S.** 2010. Role of sucrose, glucose and maltose on conventional potato micropropagation. *Journal of Agricultural Technology* 6(4): 733-739.
- ❖ **Roca, W. M y Mroginski, L. A.** (eds). 1991. *Cultivo de Tejidos en la Agricultura, Fundamentos y Aplicaciones*. Centro Internacional de Agricultura Tropical, Colombia. 970 pp.
- ❖ **Roca, W. M. y Mroginski, L. A.** 1993. Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Colombia. 19-40 pp.
- ❖ **Rocha-Munive, M. G.** 2005. Ecología Evolutiva Comparada de 5 especies de *Agave*. Tesis Doctorado, Instituto de Ecología, U.N.A.M. 64 pp.
- ❖ **Rocha-Munive, M., Good, A. S., Molina, F., Arita, H. T., Castillo, A., García, M. A. y Silva, M. A.** 2006. Pollination Biology and adaptive radiation of Agavaceae, with special emphasis on the genus *Agave*. *Aliso* (22):329-344.
- ❖ **Rodríguez-Garay B, Gutiérrez-Mora A y Acosta-Dueñas B.** 1996. Somatic embryogenesis of *Agave victoriae-reginae* Moore. *Plant Cell Tissue and Organ culture* (48):85-87.
- ❖ **Rojas, B. J. F.** 2007. Regeneración *in vitro* de *Vanilla planifolia* G. Jackson, en Andrews (Orchidaceae), especie endémica mexicana. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. 79 pp.
- ❖ **Romberger, J. A. and Tabor, C. A.** 1971. The *Picea adies* shoot apical meristem in culture. I. Agar and autoclaving effects. *American Journal of Botany*. 58: 131-140.

- ❖ **Ronquillo, V. N.** 2009. Regeneración *in vitro* y conservación *ex situ* de *Mammillaria theresae* Cutak. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. 114 pp.
- ❖ **Ruiz-Lozano, J. M., Azcón, R and Gómez, M.** 1995. Effects of arbuscular-mycorrhizal *Glomus* species on drought tolerance: Physiological and nutritional plant responses. *Applied and Environmental Microbiology*. 61: 456-460.
- ❖ **Ruvalcaba, J. M.** 1983. El maguey manso: Historia y presente de Epazoyucan. México: Dirección de Difusión Cultural. Departamento de industrias agrícolas. Universidad Autónoma de Chapingo.
- ❖ **Ruzin, S.** 1999. *Plant microtechnique and microscopy*. Oxford University Press. Oxford.
- ❖ **Safir, G. R.** 1990. Micorrizas arbúsculo-vesicular y la productividad agrícola. In: Carlson, P. S. (ed). *Biología de la productividad de cultivos*. AGT Editor, S. A. México, D. F. 201-222 pp.
- ❖ **Salazar, E., González, P y Hernández, C.** 2009. Multiplicación *in vitro* de *Agave cocui* Trelease a través de yemas axilares. *Trópicos de Agronomía*. 59(2):129-135.
- ❖ **Sánchez, E. A. C.** 2001. Comparación de la respuesta morfogénica *in vitro* de cuatro diferentes poblaciones de *Picea chihuahuana* Martínez, especie mexicana endémica en peligro de extinción. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. 85 pp.
- ❖ **Sánchez-Cuevas, M. C. y Salaverría, J. L.** 2004. Control de la oxidación y la contaminación en el cultivo *in vitro* de fresa (*Fragaria X ananassa* Duch.). Revista UDO Agrícola 4(1):21-26.
- ❖ **Santacruz, R. F., Gutiérrez, P. H. y Rodríguez- Garay, B.** 1999. Efficient *in vitro* propagation of *Agave parrasana* Berger. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* (56):163-167.
- ❖ **Saucedo, G. S.** 2006. Regeneración *in vitro* de *Cephalocereus apicicephalum* y *Echinocereus pentalophus*, cactáceas nativas de México. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. 154 pp.
- ❖ **Schneider, E. y Wightman, F.** 1974. Metabolism of auxin in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology* (25):487-513.

- ❖ **SEMARNAT.** 2012. Informe de la Situación del Medio Ambiente en México. Compendio de Estadísticas Ambientales. Indicadores Clave y de Desempeño Ambiental. México.
- ❖ **Shankhadar, D., Shankhadar, S. C., Mani, S. C. and Wen, R. C.** 2000. *In vitro* selection for salt tolerance in rice. *Biology Plant* 43:477-480.
- ❖ **Shu, H. L., Chang, K., Yau, C. H. Hong, C. H. and Wen, C. H.** 2004. Osmotic sucrose enhancements of single cell embryogenesis and transformation efficiency in *Oncidium*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 81:183-192.
- ❖ **Smith, R.** 2000. *Plant Tissue Culture, techniques and experiments*. 2da Ed. Academic Press, California. 231 p.
- ❖ **Soberón, J. y Llorente-Bousquets, J.** 1993. The use of species accumulation functions for the prediction of species richness. *Conservation Biology* 7(3):480-488.
- ❖ **Sri Andrijany, V., Indrayanto, G. y Adi Soehono, L.** 1999. Simultaneous effect of calcium, magnesium, copper and cobalt ions on sapogenin steroids content in callus cultures of *Agave amaniensis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* (55):103-108.
- ❖ **Starling, R. J y Dodds, J. H.** 1983. Tissue culture propagation of cacti and other succulent. *Bradleya* (1):84-90.
- ❖ **Starr, G.** 2012. *Agaves. Living sculptures for landscapes and containers*. Timber Press. Portland, Oregon. 342 pp.
- ❖ **Suárez, Q. I.** 2006. Regeneración *in vitro* de *Euchile mariae* (Ames) Withner, (Orchidaceae), especie endémica de México. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. 144 pp.
- ❖ **Syros, T., Yupsanis, T., Zafiriadis, H. & Economou, A.** 2004. Activity and isoforms of peroxidases, lignin and anatomy, during adventitious rooting in cuttings of *Ebenus cretica* L. *Journal of Plant Physiology* (161):69-77.
- ❖ **Taiz, L and Zeiger, E.** 2006. *Plant Physiology*. 4th Edition. Sinauer Associates, Inc. Massachusetts, USA. 764 pp.
- ❖ **Tandeau De Marsac, N. & Peaud-Lenoel, C.** 1972a. Cultures photosynthétique de lignes clonales de cellules de Tobacco. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences Paris* 274D, 1800-1802.

- ❖ **Tandeau De Marsac, N. & Peaud-Lenoel, C.** 1972b. Exchanges d'oxygène et assimilation de gaz carbonique de tissus de tabac en culture photosynthétique. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences* 274D, 2310-2313.
- ❖ **Tejavathi, D. H.** 2007. Induction of somatic embryos from cultures of *Agave vera-cruz* Mill. *In Vitro Cellular & Development Biology-Plant* (43): 423-428.
- ❖ **Thorpe, T. A. and Stasolla, C.** 2000. Somatic Embryogenesis. In: Bhojwani, S. S. and Soh, W. Y. (eds). *Current Trends in the Embriology of Angiosperms*. Kluwer Academic Publishers. London. 279-336 pp.
- ❖ **Thorpe, T. A.** 2007. History of plant tissue culture. *Molecular Biotechnology* 37(2): 169-180
- ❖ **Tisserat, B. y Jones, D.** 1999. *Plant Cell Culture Protocols*. En: *Methods in molecular biology*. Robert D. Hall (eds). Humana Press. Totoma, New Jersey (111):127-133.
- ❖ **Toledo, V. M.** 1987. Vacas, cerdos, pollos y ecosistemas: ecología y ganadería de en México. *Ecol. Poli. Cult* (3):36-49.
 ___ 1988. La diversidad biológica de México. *Ciencia y Desarrollo* (81): 17-30.
- ❖ **Thorpe, T. A. & Stasolla, C.** 2000. Somatic Embryogenesis. In: Bhojwani, S. S. and Soh, W. Y. (eds.). *Current Trends in the Embriology of Angiosperms*. Kluwer Academic Publishers. London. 279-336 pp.
- ❖ **Thorpe, T. A.** 2007. History of plant tissue culture. *Molecular Biotechnology* 37(2):169-180.
- ❖ **Trelease, W.** 1920. In Standley, P. C. *Trees and shrubs of Mexico. Cactaceae. Cactus family*.
- ❖ **Valdés, V. A. I.** 2010. *Regeneración in vitro de Dahlia brevis Sorensen y Dalia tenuicaulis Sorensen, especies endémicas de México*. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. 203 pp.
- ❖ **Valenzuela-Sánchez, K., Juárez-Hernández, R., Cruz-Hernández, A., Olalde-Portugal, V., Valverde, M. E. and Paredes-López, O.** 2006. Plant regeneration of *Agave tequilana* by indirect organogenesis. *In Vitro Cellular & Developmental Biology- Plant* 42:336-340.

- ❖ **Vargas, L. M. L.** 1988. Establecimiento del cultivo *in vitro* en palmas mexicanas en peligro de extinción. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. 56 pp.
- ❖ **Villalobos, V. V., Mejía, M. J. y Escobar, A. H.** 1991. Micropropagación de Opuntias y Agaves. En: Roca, W. M. Y Mroginski, L. A. Cultivo de Tejidos en Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia.
- ❖ **Voet, D., Voet, J. G & Pratt, C. W.** 1999. *Fundamentals of Biochemistry*. John Wiley & Sons, New York.
- ❖ **Von Aderkas, P. & Bonga, J. M,** 2000. Influencing micropropagation and somatic embryogenesis in mature trees by manipulation of phase change, stress and culture environment. *Tree Physiology* (20):921-928.
- ❖ **Von Arnold, S., Sabala, I., Bozhkov, P., Dyachok, J. and Filonova, L.** 2002. Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 69: 233-249.
- ❖ **Vranova E., Atichartpongkul S., Villarroel, R., Van Montagu, M., Inze, D and Van Camp, W.** 2002. Comprehensive analysis of gene expression in *Nicotiana tabacum* leaves acclimated to oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 10870-10875.
- ❖ **West, M. A. L. & Harada, J.** 1993. Embryogenesis in Higher Plants: An Overview. *The Plant Cell* (5):1361-1369.
- ❖ **Wightman, F. & Thimann, K.** 1980. Hormonal factors controlling the initiation and development of lateral roots. *Physiology Plant* (49):13-20.
- ❖ **Woodward, A. W. and Bartel, B.** 2005. Auxin: Regulation, Action and Interaction. *Annals of Botany*. 95: 707-735
- ❖ **Zaid, A.** 1987. *In vitro* browning of tissues and media with special emphasis to date palm cultures- A review. En: *In vitro* problems related to mass propagation. *Acta Horticulturae* 212: 561-564.