



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

Micropropagación de *Agave tequilana* Weber variedad azul

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGO

PRESENTA

AVILA CONTRERAS HUGO BRANDON

Director: Dr. Juan Gerardo Ortiz Montiel

Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales

Los Reyes Iztacala, Edo. De México, 2017.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A LA UNAM

Por el privilegio de ser universitario, por darme la oportunidad de llenarme de un sinfín de conocimientos y por cumplir mi sueño desde niño estudiar en la máxima casa de estudios de México.

AL DOCTOR JUAN GERARDO ORTIZ MONTIEL

Por haber orientado siempre mis ideas y por brindarme siempre sus conocimientos para concluir con éxito este trabajo, además de todo su apoyo académico y personal.

AL MAESTRO EN CIENCIAS MIGUEL ANGEL VERASTEGUI VIDAL

Por su valiosa aportación de conocimientos para la realización de este trabajo

AL HONORABLE JURADO

Por su importante colaboración para la realización de este trabajo.

DEDICATORIAS

A MIS PADRES

Con mucho cariño y agradecimiento ya que sin su apoyo esto no habria sido posible

A MI PADRE HUGO

Por apoyarme en todo momento, por enseñarme con el ejemplo que llegar a la cima de la montaña cuesta mucho trabajo sin embargo la vista desde allí vale la pena, gracias a ti nunca me he dado por vencido, pues entendí bien tu frase “Sin sacrificio no hay victoria”.

A MI MADRE JOSEFINA

Por hacer de mí un hombre de bien, por todo tu amor y cariño, por enseñarme a leer, escribir y sumar. Gracias por tus regaños y consejos pues han sido muy útiles para progresar a lo largo de mi vida.

A MIS HERMANOS MIGUEL, BERENICE Y DIANA

Por su apoyo incondicional, por tantas alegrías juntos.

A MI ESPOSA VIRIDIANA

Por ser parte de mi vida y por apoyarme en momentos difíciles a lo largo de la licenciatura.

A MI HIJA CAROLINA

Por toda la felicidad que me brinda día con día. Por enseñarme lo bonita que es la vida.

A MI ABUELA ROSARIO

Quien nos cuida desde el cielo, por su cariño amor y todos los bellos momentos que pase a su lado.

INDICE

Micropropagación de <i>Agave tequilana</i> Weber variedad azul.....	1
1.0 RESUMEN.....	1
2.0 INTRODUCCIÓN.....	1
3.0 REVISIÓN DE LITERATURA.....	2
3.1 Características del género agave.....	2
3.2 Características morfológicas.....	4
Raíz.....	4
Hojas.....	4
Flores.....	4
Fruto.....	4
Inflorescencia.....	4
Fotosíntesis.....	4
3.3 Descripción de la especie <i>Agave tequilana</i> Weber var azul.....	5
3.4 Clasificación taxonómica.....	5
3.5 Importancia de los agaves.....	6
3.5.1 Importancia ambiental.....	6
3.6 PROGRAMAS DE CONSERVACIÓN DEL GÉNERO AGAVE.....	7
3.7 EL <i>Agave tequilana</i> Weber var. azul.....	8
3.8 EL CULTIVO <i>IN VITRO</i>	9
3.9 ELEMENTOS DEL PROCESO DE PROPAGACIÓN MEDIANTE CULTIVO <i>IN VITRO</i>	10
Medio de cultivo.....	10
Factores que influyen en el crecimiento y desarrollo del cultivo.....	10
La humedad del medio.....	10
La luz.....	10
La temperatura.....	11
3.9.1 TIPOS DE CULTIVO.....	11

Cultivo de tejidos diferenciados	11
Cultivos de tejidos indiferenciados	11
3.9.2 MÉTODO DE CULTIVO.....	12
Desinfestación del material vegetal	12
Morfogénesis.....	12
4.0 ETAPAS DE LA MORFOGÉNESIS.....	12
Desdiferenciación.....	12
Inducción.....	12
Morfogénesis.....	12
Inoculación.....	12
Aclimatación.....	13
5.0 ANTECEDENTES.....	13
6.0 OBJETIVO GENERAL	14
7.0 OBJETIVOS PARTICULARES.....	15
9.0 HIPÓTESIS.....	15
10.0 MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
10.1 Material vegetal	16
10.2 Medios de cultivo.....	17
10.3 Inoculación en medio MS	18
10.4 Enraizamiento	19
10.5 Transferencia a suelo.....	19
11.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	19
12.0 CONCLUSIONES	27
13.0 LITERATURA CITADA.....	27

Micropropagación de *Agave tequilana* Weber variedad azul

1.0 RESUMEN.

Para la obtención de plántulas completas de *Agave tequilana* Weber var azul se evaluaron 16 tratamientos de 2,4 D y BA en combinación y por separadas en distintas concentraciones, utilizando como fuente de explante hojas de plántulas colocadas in vitro anteriormente, en donde los tratamientos que se encuentran las dos fitohormonas en combinación resultaron con un mayor número de plantas regeneradas, también se evaluó la capacidad de adaptación al medio exterior a través de la medición de la conductancia foliar de los agaves.

Palabras clave: Explante, 2,4 D, BA, In vitro, Conductancia.

2.0 INTRODUCCIÓN

El género agave es endémico del continente americano y su distribución va desde el sur de los Estados Unidos hasta Colombia y Venezuela, siendo México el centro de diversificación de este género, el cual tiene una amplia distribución debido a que está presente en tres cuartas partes del país, sin embargo su distribución no es homogénea debido a que existen zonas en donde se encuentra en mayor proporción que en otras. Existe un alto grado de diversificación en zonas áridas y semiáridas del territorio centro y norte, sin embargo, hacia el sur su presencia es nula como en los estados de Tabasco, Campeche y Quintana Roo (García-Mendoza, 2007).

Los agaves se desarrollan en una gran cantidad de hábitats sin embargo la mayoría se desarrollan mejor en un rango entre 1000 a 2000 msnm, aunque también algunas especies tienen la capacidad de crecer desde el nivel del mar hasta 3400 msnm, son abundantes en las planicies y bases de las montañas de zonas áridas y semiáridas de México, algunas zonas son la península de Baja California, el altiplano Mexicano (Chihuahua, Coahuila Guanajuato y Querétaro), la planicie

Tamaulipeca, el Valle de Tehuacán-Cuicatlan y la cuenca del río Balsas (García-Mendoza, 2007).

Debido al largo ciclo de vida de la planta, en plantaciones comerciales realizan la reproducción a través de hijuelos, ya que ésta es más rápida. Mediante este tipo de reproducción el material genético se mantiene constante ya que se trata de reproducción vegetativa, lo que implica que los propágulos sean clones de la planta madre, aunque este tipo de propagación reduzca la diversidad genética de estos agaves por la falta de recombinación genética.

El uso de la micropropagación, que aunque también reproduce clones, se inicia ya como parte de las estrategias de reproducción de esta planta. En la que, podemos utilizar plántulas *in vitro* obtenidas a partir de semillas, para permitir la participación de una proporción de variación genética, de forma que los agaves sean más resistentes a las enfermedades y a los cambios ambientales. Ya que mediante estas técnicas se puede obtener un gran número de plantas en tiempos relativamente cortos es necesario crear protocolos de propagación de *Agave tequilana* a través de plántulas obtenidas de semillas germinadas *in vitro*. (Eguiarte y Gonzales, 2007).

3.0 REVISIÓN DE LITERATURA

3.1 Características del género agave

El género agave en México, está constituido por 136 especies, 26 subespecies, 29 variedades y 7 formas. Los agaves son plantas perennes que se caracterizan por tener hojas dispuestas en espiral en forma de roseta, poseen un tallo grueso y corto, sus hojas en la mayoría de los casos son suculentas y fibrosas, el peso varía desde 20 gramos hasta 30 kg en el caso de los agaves pulqueros, en el margen de las hojas posee espinas así como en la parte terminal apical de la hoja, el color de los agaves va desde tonos de verde y glauco o amarillos, rojizos o violetas (Rulfo, 2007).

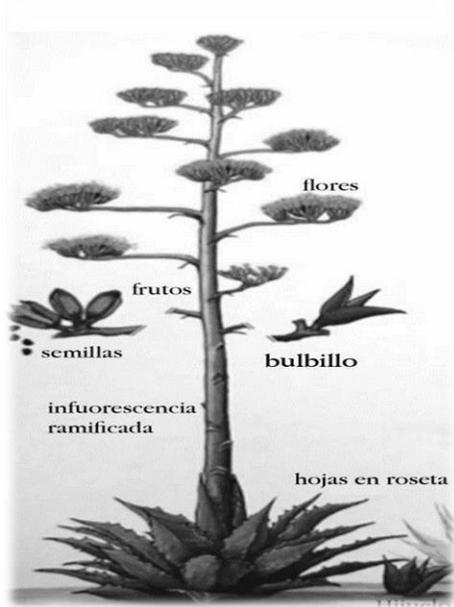


Figura 1. Esquema general del agave.

En los agaves, la reproducción sexual se produce mediante la polinización que se efectúa en mayor medida por murciélagos nectarívoros, en una menor proporción por insectos diurnos y nocturnos como abejas y abejorros, además de aves como los colibríes, en este tipo de reproducción existe recombinación genética y por lo tanto una mayor variabilidad de sus características físicas (García-Mendoza, 2007).

La reproducción asexual se puede realizar con la formación de bulbillos que se originan a partir de meristemos axilares de la inflorescencia de la planta madre con la desventaja de que solo se obtienen después de la floración. En *Agave tequilana*, por ejemplo, la obtención de bulbillos debe ser en plantas para reproducción de 7 a 8 años, ya que el escapo floral se retira al aparecer en las plantas de producción por la disminución de carbohidratos. Otra opción de reproducción asexual se realiza mediante los rizomas, que son tallos subterráneos, que normalmente crecen en el plano horizontal paralelo a la superficie del terreno y generan hijuelos en plantas de 3 a 5 años, logrando unos 15 hijuelos por planta durante todo su crecimiento, este es el método más utilizado comercialmente para reproducirlo, aun cuando ambos tipos de propágulos son clones de la planta madre (García-Mendoza, 2007).

3.2 Características morfológicas.

Raíz. Poseen un sistema radicular superficial, debido al hábitat en el que se desarrollan, por lo que le permite a la planta absorber el agua de lluvia, que solo humedece la superficie, con el único objetivo de asegurar su supervivencia (García-Mendoza, 2007).

Hojas. Tienen la característica de ser suculentas con el objetivo de almacenar agua durante épocas de sequía y de esta manera aumentar la probabilidad de subsistencia, además también posee fibras que sirven como sostén dándole rigidez durante los periodos de sequía, asegurando de esta manera que sus hojas no se deformen, otra modificación importante es la presencia de una cutícula gruesa en la epidermis de la hoja, además de la presencia de cera en su superficie (García-Mendoza, 2007).

Flores. Poseen diferentes grados de suculencia además que tienen ovario ínfero, son bisexuales, tienen seis tépalos y seis estambres muy largos. Las flores son protándricas lo que significa que los estambres se desarrollan y maduran antes que los carpelos (García-Mendoza, 2007).

Fruto. Es una capsula seca y negra al madurar, posee tres lóculos, de color verde al ser inmadura contiene semillas aplanadas y negras (García-Mendoza, 2007).

Inflorescencia. Existen dos tipos de inflorescencia, en el subgénero *Littaea* es espigada mientras que en el subgénero *Agave* es una panícula con ramificaciones, los tallos florales tienen una longitud desde dos metros en los más pequeños hasta 10 metros en los más grandes. (Verduzco-Martínez et al, 2008).

Fotosíntesis. Los agaves presentan metabolismo ácido crasuláceo (CAM) este tipo de metabolismo en el que abren sus estomas durante la noche, fijan el carbono en ácidos orgánicos principalmente en ácido málico en la vacuola, durante el día este ácido se descarboxila y el dióxido de carbono se utiliza por la enzima Rubisco para formar carbohidratos. Este metabolismo le permite a la planta obtener carbono con una pérdida mínima de agua (García-Mendoza, 2007).

3.3 Descripción de la especie *Agave tequilana* Weber var azul

El *Agave tequilana* es una planta suculenta que se extiende radicalmente de 1.2 a 1.8 m de longitud, su tallo es grueso y corto que mide de 30 a 50 cm al madurar, se caracteriza por tener hojas lanceoladas que miden de 90 a 120 cm generalmente de color glauco azulado o verde grisáceo. Se encuentra distribuido entre los 5° y 25° de latitud norte y se adapta a regiones subtropicales semiáridas (Weber, 1902), caracterizado por que solo se reproduce una vez en su vida, es decir una vez que origina semillas muere (semelparo).

Distribución. Selva baja de Jalisco, Michoacán, Nayarit, Guanajuato y Tamaulipas.

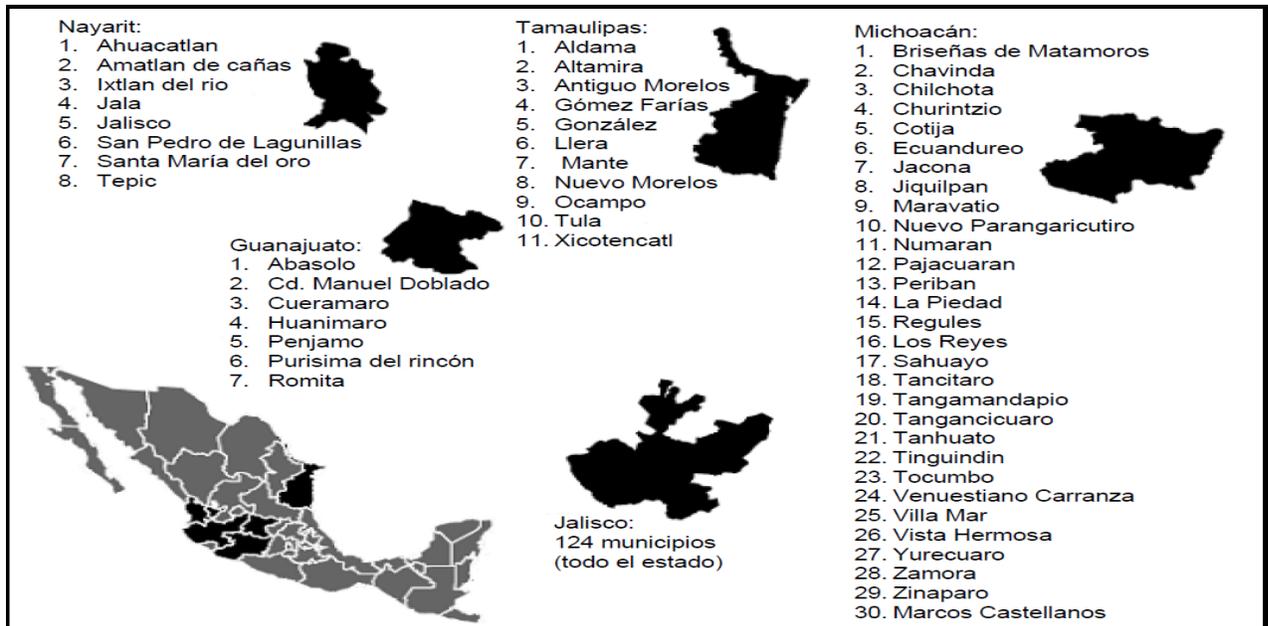


Figura 2. Zona protegida por la denominación de origen de tequila (Modificado de Valenzuela, 2007).

3.4 Clasificación taxonómica

Reino Plantae

Phylum Magnoliophyta

Clase Liliopsida

Orden Liliales

Familia Agavaceae

Género Agave

Epíteto específico tequilana

Nombre Científico *Agave tequilana* F.A.C. Weber

<http://unibio.unam.mx/collections/specimens/urn/IBUNAM:MEXU:AGA1027485>

Clasificación taxonómica de *Agave tequilana* weber var. Azul consultado 21/07/17

3.5 Importancia de los agaves

Los agaves en México son parte de nuestra cultura, tradición y como una fuente comercial muy importante ya que desde la época prehispánica han sido utilizados de diferentes maneras como alimento, ornato, medicina y como materia prima para la elaboración de bebidas alcohólicas reconocidas a nivel nacional e internacional (Espinoza, 2015).

3.5.1 Importancia ambiental

Los agaves tienen la característica de producir biomasa en áreas limitantes de agua, provee una gran cantidad de servicios ambientales como el mantenimiento del suelo y el mantenimiento de poblaciones de mamíferos polinizadores como los murciélagos (García-Mendoza, 2007).

Se tiene documentado que existen aproximadamente 74 especies que han sido utilizados por los grupos humanos nativos de México como alimento, bebidas fermentadas, bebidas destiladas como forraje y fibra (Colunga et al. 2007).

El uso de los agaves en México como materia prima para la elaboración de bebidas alcohólicas ha ido en aumento en los últimos años, teniendo la denominación de origen del tequila y el mezcal. Por otro lado, la fabricación de miel a partir de esta planta, está teniendo una gran relevancia en la industria alimenticia por sus propiedades nutricionales y finalmente el empleo de sus fibras para la industria en donde se busca remplazar el uso de materiales derivados del petróleo (Colunga et al, 2007).

3.6 PROGRAMAS DE CONSERVACIÓN DEL GÉNERO AGAVE.

Con el motivo de conservar la variabilidad genética de especies de interés económico y cultural como el *Agave tequilana* Weber var. azul se ha creado el Depositario Nacional de Agaves, dentro de las instalaciones de la Universidad de Guanajuato con dos modalidades de cultivo: mediante su preservación en el campo en un Agavatum el cual mide 10 Ha donde se realizan actividades de deshierbe mecánico y la eliminación de hojas viejas con el fin de conservar en buenas condiciones los agaves cultivados y por cultivo *in vitro* donde las plántulas se mantienen en medios asépticos con diferentes balances hormonales.

(<http://snics.sagarpa.gob.mx/prensa/boletines/Paginas/2015-B009.aspx>).

El método más utilizado para la conservación del *Agave tequilana* Weber var. azul es el mantenimiento de plantas *in vitro* para la multiplicación de estas cuando sean requeridas, en donde las investigaciones son financiadas principalmente por el sector privado.

3.7 EL *Agave tequilana* Weber var. azul

Entre estas diferentes especies de Agaves, *Agave tequilana weber* variedad azul es la materia prima para la elaboración del tequila, que es una bebida alcohólica característica de México, en los últimos años esta bebida ha tenido un fuerte aumento en su consumo, lo que ha resultado en un incremento en la demanda de la materia prima para su producción (Ruiz et al., 2007).

La investigación que se ha llevado a cabo en *Agave tequilana* Weber, variedad azul (tequilero), se ha enfocado principalmente en los aspectos de nutrición, manejo y establecimiento de las plantaciones, además de algunos problemas fitosanitarios tales como insectos plaga, hongos y bacterias; (Vicente y Del-Real, 2007). Sin embargo en los aspectos de mejoramiento genético, crecimiento, reproducción y micropropagación, se puede considerar que no hay estudios suficientes al respecto (CRT, 2005).

Lo anterior, se debe principalmente al largo ciclo de vida de la planta, por ello las plantaciones comerciales realizan la reproducción a través de hijuelos, ya que ésta es más rápida. Mediante este tipo de reproducción el material genético se mantiene constante ya que se trata de reproducción vegetativa, lo que implica que los propágulos sean clones de la planta madre, aunque este tipo de propagación reduzca la diversidad genética de estos agaves por la falta de recombinación genética. El uso de la micropropagación, que aunque también reproduce clones, se inicia ya como parte de las estrategias de reproducción de esta planta. En la que, sin embargo, podemos utilizar plántulas *in vitro* obtenidas a partir de semillas, para permitir la participación de una proporción de variación genética, de forma que los agaves sean más resistentes a las enfermedades y a los cambios ambientales. Ya que mediante estas técnicas se puede obtener un gran número de plantas en tiempos relativamente cortos es necesario crear protocolos de propagación de *Agave tequilana* a través de plántulas obtenidas de semillas germinadas *in vitro* (Eguiarte y Gonzales, 2007).

3.8 EL CULTIVO *IN VITRO*

Es un conjunto de técnicas conocidas también como: micropropagación ó cultivo de tejidos vegetales, que permiten la propagación de una planta en forma controlada, utilizando secciones de esta para multiplicar células, tejidos u órganos vegetales *in vitro*, bajo condiciones asépticas, libres de microorganismos y dentro de un medio de cultivo, el cual contiene la cantidad ideal de nutrimentos además de reguladores del crecimiento, con el fin de proporcionar a la planta las condiciones necesarias para multiplicarse en tiempos relativamente cortos (Street 1977, Calva y Ríos 1999).

El cultivo de tejidos vegetales se basa en el principio de totipotencialidad, el cual indica que teóricamente cualquier célula vegetal tiene la capacidad de generar una nueva planta debido a que contiene una copia de material genético completo e independientemente de la función que realice o posición en la que se encuentre, sin embargo en la práctica, los tejidos inmaduros, meristemas y embriones han resultado con mayor potencial regenerativo que otras partes de la planta, estando implicados varios factores tanto internos como externos por ejemplo bioquímicos fisiológicos y genéticos (Fert y Paul, 2000).

Las principales aplicaciones de la micropropagación es la obtención de plantas libres de enfermedades y patógenos, la preservación de germoplasma y mejoramiento genético, cuyo fin es la obtención de plantas resistentes a enfermedades y condiciones ambientales adversas (Fowler 1987, Carpita y McCann 2000).

Actualmente el uso del cultivo *in vitro* está teniendo un incremento por la importancia económica que implica pues está siendo muy utilizada para la propagación de plantas comerciales como muchas ornamentales y plantas de uso agrícola como los agaves, que han sido utilizados desde la época prehispánica como alimento, medicina, ornato, abono y bebidas alcohólicas, siendo esta última la actividad económica más importante asociada al cultivo del agave (García-Mendoza A, 2002).

3.9 ELEMENTOS DEL PROCESO DE PROPAGACIÓN MEDIANTE CULTIVO *IN VITRO*

El proceso de propagación mediante cultivo de tejidos se desarrolla de acuerdo a una serie de condiciones y requisitos entre los que están:

Medio de cultivo.

Uno de los medios más utilizados es el medio Murashige y Skoog (1962) ó (MS62), está constituido por sales inorgánicas divididas en macroelementos o elementos necesarios en mayor proporción y microelementos a los que se adiciona una fuente de carbono como la sacarosa, adicionado de una fuente de vitaminas, factores de crecimiento como el inositol, un pH entre 5.7 y 5.9, y agar o gel rite, para dar sostén a la planta en caso de ser un medio semisólido y hormonas vegetales para estimular la división y el crecimiento de las células de la planta (George, 1987).

Factores que influyen en el crecimiento y desarrollo del cultivo.

El óptimo crecimiento y desarrollo de la planta depende de la forma física del medio es decir si es líquido o semisólido ya que cada uno tiene distintas características, el primero tiene los nutrientes y fitohormonas más disponibles ya que está en constante agitación sin embargo presenta problemas como hipoxia, rompimiento de órganos además requiere el empleo de equipo complejo. Mientras que en medio semisólido el crecimiento es más lento debido a que los nutrientes no están tan fácilmente disponibles debido a que el explante se mantiene estático y no necesita aireación pues la mayor parte sobresale del medio (George, 2008)

La humedad del medio. Es de gran importancia debido a que la planta absorbe los nutrientes a través de una solución por ello si el medio se deshidrata, las raíces tendrán que hacer un esfuerzo mayor para absorberlo, depende de la temperatura de la cámara de incubación (George, 1987).

La luz. El comportamiento del cultivo de plantas *in vitro* depende de la cantidad calidad y fotoperiodo de luz que reciban, por ello en micropropagación se utiliza luz blanca con un fotoperiodo de 16 horas luz, 8 de oscuridad además que la intensidad lumínica varía entre 50 a 150 $\mu\text{moles m}^2\text{s}$ (Marín, 1993).

La temperatura. El crecimiento y desarrollo de las plantas está influenciado en gran medida por la temperatura ya que un cambio puede reducir el metabolismo y con ello detener el crecimiento y multiplicación de las plantas *in vitro*, ya sea porque está por debajo de la temperatura óptima o muy por encima de la misma en donde la plántula o tejido puede hasta morir, el rango de temperatura óptima para el desarrollo depende de cada especie y esta es en donde la planta crece y se multiplica a una velocidad máxima (Salisbury y Ross ,1994).

3.9.1 TIPOS DE CULTIVO

Existen dos tipos de cultivo *in vitro* el de tejidos diferenciados y el de tejidos indiferenciados.

Cultivo de tejidos diferenciados

En este tipo de cultivo se induce la formación de embriones somáticos, que se obtienen por la proliferación de un callo o por células aisladas, caracterizado por la ausencia de unión de gametos, este embrión tiene la capacidad de formar una planta completa, además que no tiene conexión con el tejido vascular de la planta madre (Radice, 2004). Otro, proceso que consiste en la obtención de un primordio unipolar a partir de meristemas, yemas axilares o adventicias y ápices y el desarrollo de ese primordio en brotes vegetativos, los cuales pueden formarse directamente en el explante (organogénesis directa) o a través de callo (organogénesis indirecta). Se caracteriza por que mantiene conexión con el sistema vascular del explante del cual se originó (Woodward, 1997).

Cultivos de tejidos indiferenciados

Se obtienen a partir de órganos o tejidos organizados que son cultivados en medio adicionado con auxinas para la formación de un callo o bien la formación de células libres o agregadas en suspensión, este tipo de cultivo tiene la característica de tener una gran variabilidad estructural, genética y metabólica a la de la planta madre (Sharry et al. 2015).

3.9.2 MÉTODO DE CULTIVO.

Desinfestación del material vegetal

Consiste en la desinfestación superficial de la planta o la semilla con una serie de lavados en agua corriente, seguida de lavados con sustancias químicas como el hipoclorito de calcio (CaClO_2), peróxido de hidrogeno (H_2O_2), etanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) e hipoclorito de sodio (NaClO) a diferentes concentraciones, durante diferentes tiempos dependiendo de la especie de la planta, sin embargo este último es más utilizado debido a la facilidad con la que se puede obtener, además de su gran efectividad (Borges et al. 2009).

Morfogénesis. Se refiere a los cambios morfológicos que ocurren como resultado de una reestructuración y reorganización durante el desarrollo de un organismo.

4.0 ETAPAS DE LA MORFOGÉNESIS

Desdiferenciación.

Es el proceso por el cual una célula adulta que ha alcanzado su especialización y su estabilidad fisiológica puede volver a obtener actividad meristemática con la correcta estimulación con el uso de fitohormonas también llamada reembrionalización según Strasburger (1994).

Inducción. Es la fase en donde las células reciben el estímulo mediante el uso apropiado de combinaciones de auxinas y citocininas. (Radice, 2004)

Morfogénesis. Es cuando las células del tejido usado como explante comienzan a multiplicarse por división celular para la formación de un nuevo órgano o embrión somático. (De Klerk, 1997)

Inoculación.

El proceso consiste en tomar el explante bajo medidas de asepsia para no contaminar el cultivo y colocarlo dentro del medio de cultivo hundiéndolo ligeramente.

Aclimatación

Esta etapa es de gran importancia ya que es la etapa final de la micropropagación, en esta etapa la planta se extrae del medio de cultivo y tiene que adaptarse y activar ciertas funciones como ser fotosintéticamente activa, regular la apertura de sus estomas es decir activar su metabolismo para posteriormente ser trasplantada y vivir en condiciones ambientales no controladas es decir en el medio externo. (Sharry et al. 2015)

5.0 ANTECEDENTES

Mediante estas metodologías, se micropropagó maguey bruto (*Agave inaequidens Koch*), utilizando secciones de tallo y yemas axilares obteniendo una brotación directa sin la formación de callo, en donde las secciones de tallo formaron hasta 72 brotes en 8 semanas; en cuanto a las concentraciones la de 3.0 mg L⁻¹ de Benciladenina (BA), produjo una mayor longitud y número de brotes (Aureoles et al. 2007).

Domínguez et al. (2008), evaluaron el efecto de 5 citocininas en la propagación *in vitro* de explantes de plántulas generadas a partir de semillas de 5 agaves mexicanos, donde los mejores tratamientos fueron 1.5 mg L⁻¹ de BA y 2.0 mg L⁻¹ de 2iP con un promedio de 10.5 y 10 brotes por explante respectivamente.

Ángeles-Espino et al. (2012), micropropagaron *Agave tequilana weber* variedad azul a través de explantes de yemas axilares a partir de hijuelos, utilizando, ácido indol butírico y cinetina, en donde el promedio de brotes fue de 3.67 ± 1.24 ; mientras que el número de hojas tuvo un comportamiento similar con 4.43 ± 1.14 en el mismo lapso, sin embargo el desarrollo foliar fue superior al de los brotes en 18%.

Silos et al. (2010), micropropagaron a través de meristemas de tallo *Agave salmiana Gentry* utilizando como medio de cultivo MS62 además analizaron algunos componentes de valor alimentario-forrajero, en donde la mejor respuesta se originó

con 2.0 mg L⁻¹ de BAP y 0.25 mg L⁻¹ de AIA con 20.3 brotes por explante, además todos los brotes presentaron mayor vigor y tamaño.

Portillo y Santacruz (2006), obtuvieron embriones de *Agave tequilana weber* a partir de explantes de raíz y de hoja utilizando 4 genotipos diferentes, 2 propagados sexualmente y dos asexualmente por medio de hijuelos, en donde la generación de callo se formó primero en los explantes provenientes de hoja que aquellos de raíz, pero luego de 20 d ambos tipos de explantes mostraron callo, aunque en menor cantidad en los explantes de raíz.

Juarez et al. (2005), evaluaron el efecto de 12 tratamientos para establecer un sistema de cultivo de callos organogénicos de *Agave tequilana weber* variedad azul empleando diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento, 2 auxinas y una citocininas, en donde la mejor respuesta fue obtenida con aquellos tratamientos que incluían citocinina, siendo el sistema DB1(2,4-D 0.125 mgL, 5 mg/l BAP) el que mayor crecimiento y capacidad de regeneración mostró, los tratamientos que sólo emplearon 2,4-D sin citocinina tuvieron limitadas características en los explantes y baja capacidad de brotación.

Toribio (2005), realizó un estudio en donde analizó el comportamiento de explantes de agave pulquero (*Agave atrovirens*) en la interacción de dos reguladores crecimiento auxinas y citocininas, en donde las concentraciones en donde obtuvieron la formación de callos en un 75% fue 1/1.5 auxina/citocinina, al igual que en concentraciones de 1/1 donde el porcentaje fue de 80%.

La propagación masiva de *Agave tequilana* Weaber, var. Azul mediante cultivo de tejidos vegetales es una forma importante de reproducción donde se debe considerar como esencial para la obtención de respuesta morfogénica a los reguladores aplicados en cada protocolo de investigación

6.0 OBJETIVO GENERAL

Micropropagar *Agave tequilana* Weber var azul a partir de tejido meristemático ubicado en la base de las hojas de plántulas germinadas *in vitro*

7.0 OBJETIVOS PARTICULARES

Obtener plántulas *in vitro* a través de la germinación de semillas de *Agave tequilana* Weber var azul.

Determinar el método de desinfestación más efectivo para semillas de *Agave tequilana* Weber var. azul

Evaluar la respuesta morfogénica de hojas de plántulas obtenidas, usadas como explantes en medio Murashige y Skoog (1962) semisólido, con combinaciones de 2,4 D y BA.

Seleccionar el medio adecuado para la propagación y establecer el cultivo en fase de multiplicación de *A. tequilana*.

Inducir el enraizamiento *in vitro* de *A. tequilana* y caracterizar su transferencia y aclimatización a suelo con y sin raíz, mediante la evaluación de la regulación de la transpiración.

9.0 HIPÓTESIS

Para la obtención de respuesta morfogénica en el medio de cultivo, la aplicación de diferentes concentraciones y combinaciones de ácido diclorofenoxiacético y bencilaminopurina, permitirá la regeneración de plántulas a partir de tejidos meristemáticos presentes en la base de la hoja de plántulas de *Agave tequilana* weber var. Azul.

10.0 MATERIALES Y MÉTODOS.

Material biológico.

10.1 Material vegetal

Semillas.

Se colectaron 200 semillas procedentes de frutos de un ejemplar de *Agave tequilana* weber var. Azul colectado en San Luis de la Paz, Guanajuato, México y localizado en el jardín botánico de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala localizada en N 19° 31' 27.4", WO 99° 11' 16.2" con la aprobación del Biólogo Marcial García Pineda encargado del mismo. Una vez extraídas las semillas del fruto, se dejaron secar por un mes para su uso posterior.

Métodos de desinfestación

Se utilizaron tres métodos de desinfestación de semillas de *Agave tequilana* weber var. Azul.

1. Se lavaron las semillas de *Agave tequilana* Weber con jabón y agua corriente después se colocaron en alcohol al 70% durante 3 min, posteriormente se colocaron en hipoclorito de sodio al 15% a partir de cloro comercial durante 15 min por último se enjuagaron 3 veces con agua estéril.
2. Se lavaron las semillas de *Agave tequilana* Weber con jabón y agua corriente después se colocaron en alcohol al 70% durante 3 min, posteriormente se colocaron en hipoclorito de sodio al 15% a partir de cloro comercial durante 15 min, por último se enjuagaron 3 veces con agua estéril la cual tenía 1 g/l del fungicida benlate® 50 WP.
3. Se lavaron las semillas de *Agave tequilana* Weber con jabón y agua corriente después se colocaron en hipoclorito de sodio al 100% (a partir de cloro comercial 6%), durante 1 min, por último se enjuagaron 3 veces con agua estéril.

Se utilizaron 30 semillas por cada método de desinfestación, se sembraron en medio MS62 semisólido con agar, sin reguladores de crecimiento adicionado con 30 g/L de sacarosa, 50 mg/L de mioinositol, 0.2 mg/L de Tiamina con un pH de 5.7 y 8 g/L, esterilizado durante 15 min a una presión de 1.05 kg/cm² o 15 Lb a 121° C, siendo la unidad experimental 5 semillas por cada frasco con 6 frascos por método,

durante 30 días se estuvo monitoreando para determinar los ejemplares contaminados.

Después de estandarizar un método efectivo de desinfestación se procedió a utilizarlo, para evaluar el porcentaje de germinación se sembraron 125 semillas, en donde la unidad experimental fueron 5 semillas por frasco, utilizando solo agrolita como sustrato para mantener la humedad.

Las semillas sembradas en agrolita se estuvieron monitoreando durante 60 días, empezando a germinar desde el día 14 hasta 39 días después de la siembra teniendo un total de 17 plántulas las cuales se pasaron a medio MS62 adicionado con 0.90 μM de 2,4 D con 8.88 μM de BA, debido a que esta reportado que la combinación de estas dos fitohormonas producen buenos resultados para su multiplicación. Una vez que se obtuvieron plántulas nuevas, se extrajeron sus hojas y se resembraron en medio MS62 adicionado con las mismas concentraciones de fitohormonas para seguir con la multiplicación. Todas las semillas y plántulas que fueron sembradas se mantuvieron dentro de la cámara de cultivo a una temperatura de 25 ± 1 °C bajo fotoperiodo de 16 horas luz, 8 de oscuridad.

Una vez obtenida la cantidad necesaria de plántulas se procedió a realizar el experimento en donde se evaluaron 16 tratamientos.

10.2 Medios de cultivo

Se utilizó medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962), semisólido adicionado con 30 g/L^{-1} de sacarosa, pH de 5.7 y 8 g/L^{-1} de agar los cuales contenían adicionalmente los siguientes tratamientos:

Tabla 1. Tratamientos evaluados para la micropropagación de *Agave tequilana*

TRATAMIENTOS	2,4D μM	BA μM
A1	CONTROL	
A2	0.90	
A3	1.8	
A4	2.7	

B1		8.88
B2	0.90	8.88
B3	1.8	8.88
B4	2.7	8.88
C1		17.76
C2	0.90	17.76
C3	1.8	17.76
C4	2.7	17.76
D1		26.64
D2	0.90	26.64
D3	1.8	26.64
D4	2.7	26.64

10.3 Inoculación en medio MS

En condiciones de asepsia las plántulas obtenidas por germinación de semillas se sembraron en el medio de cultivo MS62, utilizando pinzas de disección, las cuales fueron esterilizadas por técnica de flameo, todo el proceso de sembrado se realizó dentro de una campana de flujo laminar.

Los cultivos se mantuvieron a 25 ± 1 °C bajo fotoperiodo de 16 horas luz 8 de oscuridad, hasta tener plántulas de 2 a 6 cm de altura. A partir de estas plántulas se tomaron las hojas como explantes para el experimento, inoculándolas en medio MS adicionado con Bencil amino purina (BA) y Acido diclorofenoxiacético (2,4, D) en diferentes concentraciones con el fin de determinar el fitoregulador más eficiente para estimular la generación de brotes en los explantes.

10.4 Enraizamiento

Parte de los brotes generados en los tratamientos se separaron del explante original y se transfirieron a MS62 adicionado con 4.92 μM de IBA de ácido indol butírico, para promover la formación del sistema radical.

10.5 Transferencia a suelo.

Las plantas completas es decir que tuvieran raíces tallos y hojas bien desarrollados se sacaron de los frascos, se les removieron los restos de medio MS62 con una servilleta de papel y se midió la transpiración como conductancia estomática mediante un porómetro de hoja, marca Decagon Devices, Modelo SC-1, posteriormente se enjuagaron con agua corriente y se sumergieron en una solución de Benlate® 50 WP a una concentración de 3.44 μM , después se pasaron a macetas con tierra de la marca Miracle Gro®, una vez sembrados todos los agaves se colocó una tapa de plástico en la superficie de la maceta para evitar la pérdida de humedad, gradualmente se perforaron las tapas de plástico hasta quitarla por completo al final de 3 días, todos los Agaves se mantuvieron en invernadero para su aclimatización.

Evaluación de la conductancia y temperatura de la planta

Se midió la conductancia de la planta con un porómetro de hoja marca Decagon® cada 3 días durante 2 semanas a las 5 pm, para evaluar la conductancia de las hojas, así como la temperatura.

11.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El mejor método de desinfestación fue el 3 el cual tuvo el porcentaje más bajo de contaminación con 16.6%, mientras que en el tratamiento 1 se obtuvo el porcentaje más alto de contaminación con 83.3% mientras que en el tratamiento 2 se obtuvo un porcentaje de 66.6, los resultados del método 1 y 2 no coinciden con lo reportado por Domínguez y colaboradores en el 2008 ya que utilizando un método de desinfestación para semillas similar con 45 segundos en alcohol al 70% y 25 min

en hipoclorito de sodio al 15% obtuvieron un porcentaje de contaminación inferior al 20%.

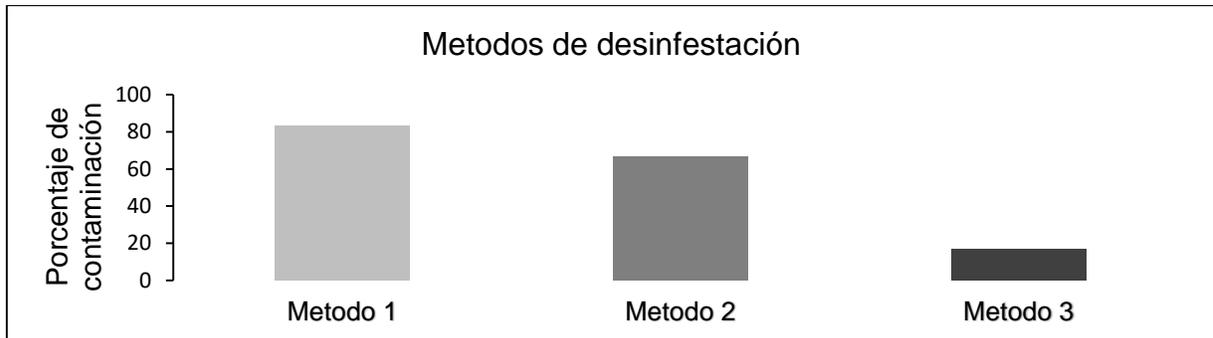


FIG. 3. Comparación de los métodos de desinfestación. Método 1 lavado con jabon y agua corriente, seguido de 15 min en hipoclorito de sodio al 15% y enjuagado con agua esteril, al metodo 2 solo se le agrego benlate cuando se enjuago con agua esteril, al metodo 3 solo se le agrego 1 min de hipoclorito de sodio al 100%.despues se enjuagó con agua destilada esteril

En cuanto a la eficacia del método 3 coincide con lo reportado por Medel Et al en el 2001 quienes evaluaron 9 tratamientos de desinfestación de semillas de falso peyote (*Ariocarpus fissuratus* var. *Fissuratus*), reportando que a mayor proporción de hipoclorito de sodio menor es el índice de contaminación por hongos y bacterias, sin embargo también reportan que la oxidación es mayor.

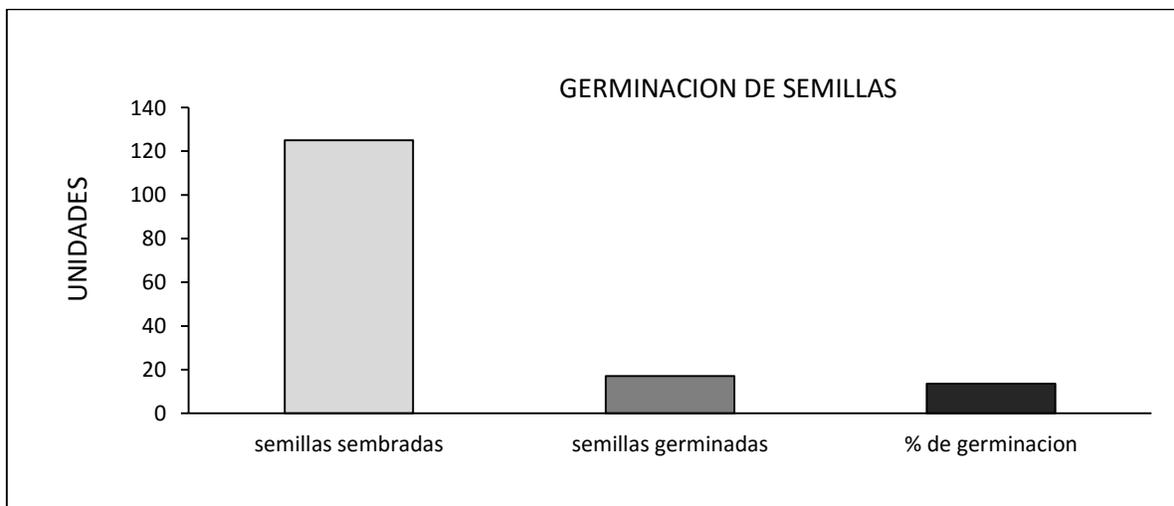


FIG 4. Porcentaje de germinacion de semillas de *Agave tequilana* Weber var. Azul durante 40 dias.

Mientras que el porcentaje de germinación fue de 13.6%, muy bajo comparado con lo que reporta Cen Et al 2015, quienes obtuvieron entre 90-95% debido a que seleccionaron las semillas en base a la presencia de una protuberancia en la parte central de esta, además que hicieron un corte longitudinal en la testa cuidando de no dañar el embrión, también pudieron haber influido otros factores como la presencia de sustancias inhibidoras, la impermeabilidad de la testa o la inmadurez del embrión

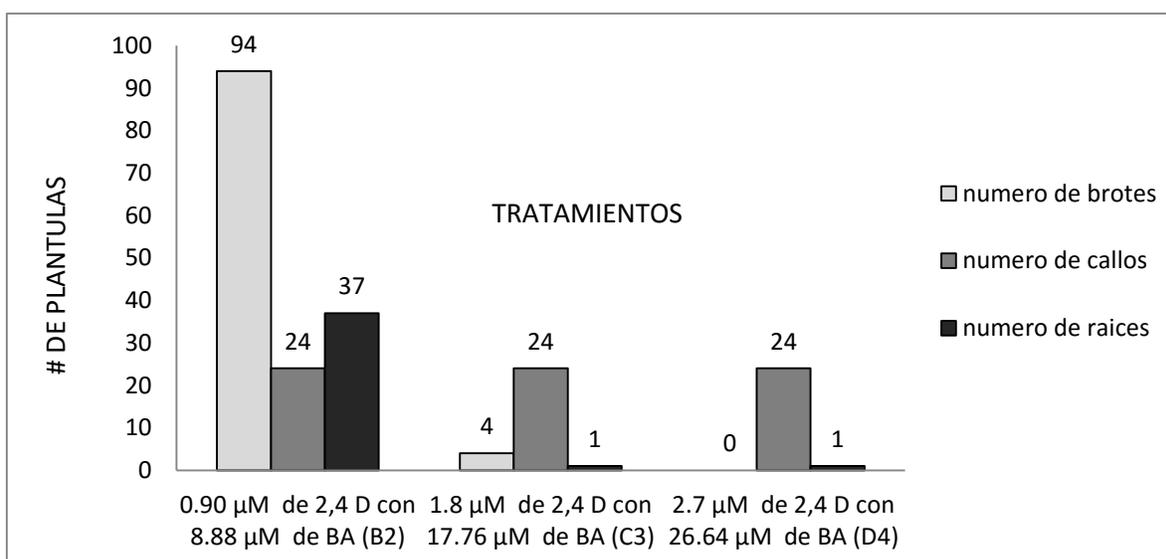


FIG 5. Comparación entre tratamientos con respuesta notable en cuanto al número (unidades) de brotes, callos y raíces producidos entre los diferentes tratamientos.

Los tratamientos con mejores resultados en cuanto al número de callos producidos fueron las combinaciones de 2,4D y BA debido a que se desarrolló callo en todos los explantes sembrados, estos resultados fueron previamente reportados por Valenzuela y colaboradores (2006), en donde sus resultados muestran que el desarrollo del callo fue mayor cuando el 2,4 D y BA estaban en combinación.

Tabla 2. Comparación de la capacidad de formación de brotes (CFB)

TRATAMIENTOS	[2,4D μM]	[BA μM]	CFB
--------------	-----------	---------	-----

CONTROL			-
A2	0.90		-
A3	1.8		-
A4	2.7		-
B1		8.88	-
B2	0.90	8.88	3.7534
B3	1.8	8.88	0.0034
B4	2.7	8.88	0.0034
C1		17.76	-
C2	0.90	17.76	-
C3	1.8	17.76	0.0069
C4	2.7	17.76	0.0052
D1		26.64	-
D2	0.90	26.64	0.0034
D3	1.8	26.64	0.0069
D4	2.7	26.64	-

LA Capacidad de Formacion de Brotes se define como la relación que existe entre el número de brotes por explante y el porcentaje de explantes con brote, utilizado para una mejor determinación de la eficacia de los tratamientos calculados de acuerdo a lo reportado por Martínez-Pulido y col. (1992):

$$CFB = (\text{Número promedio de brotes por explante}) \times (\% \text{ de explantes con brotes}) / 100$$

El tratamiento con mejor resultado en cuanto al número de brotes producido fue el 0.90 μM de 2,4 D con 8.88 μM de BA (B2), pues se obtuvo una capacidad de formación de brotes de 3.75 con 94 plántulas estos datos coinciden con lo reportado por Valenzuela y colaboradores en el 2005, quienes obtuvieron una CFB de 3.12 utilizando concentraciones de 22 μM de BA y 1.1 μM de 2,4 D, sin embargo reportaron que el mejor tratamiento para la formación de brotes fue la concentración más baja de 2,4 D con 0.11 μM en combinación con la concentración más alta de

BA con 44 μM , obteniendo una CFB de 14.5, en otras investigaciones Juárez y colaboradores en el 2007, reportan como mejor tratamiento la combinación de 0.56 μM de 2,4 D con 22.2 μM de BA ya que mostro mayor crecimiento y capacidad de regeneración de los brotes sin embargo estos resultados no coinciden con el tratamiento 0.90 μM de 2,4D con 26.64 μM de BA (D2) pues siendo concentraciones muy similares el tratamiento D2 mostró una nula capacidad de regeneración de brotes a pesar de que se formó callo en todos los explantes, esto demuestra que la concentración hormonal es un factor muy importante para la formación de brotes, así como la combinación de 2,4 D con BA ya que en los tratamientos en donde estas dos hormonas estaban separadas la capacidad de formación de callo y brotes fue nula debido a que la interacción de hormonas a nivel fisiológico crea las condiciones necesarias para que el tejido utilizado se desdiferencie y exprese su totipotencialidad para la regeneración de plántulas (Jiménez, et al, 2009).

En esta investigación el medio del tratamiento B2 fue renovado cada 15 días para evitar la oxidación, en cuanto a la formación de callo los 3 tratamientos mostraron buenos resultados pues todas las hojas utilizadas como explantes desarrollaron callo debido a la presencia de 2,4D sin embargo la capacidad de brotación en el tratamiento 1.8 μM (0.4mgL) de 2,4D con 17.76 μM (4mgL) de BA fue muy baja ya que solo se obtuvieron 4 brotes con una CFB de 0.0069 lo cual no coincide con lo reportado por Valenzuela ya que con un tratamiento de concentraciones hormonales similares obtuvieron una CFB de 2.08 mientras que en el tratamiento 2.7 μM (2.71 μM) de 2,4D con 26.64 μM (26.64 μM) de BA no se obtuvieron brotes lo cual se puede atribuir a las altas concentraciones de hormonas pues Nikam y colaboradores en el 2003 reportaron que al utilizar una combinación de ANA con kinetina en concentraciones de 0.25-0.5 mgL y 1-2 mgL respectivamente inducían la formación de callos en *A. sisalana* pero que concentraciones más altas de la auxina y de la citocinina no lo hacía.

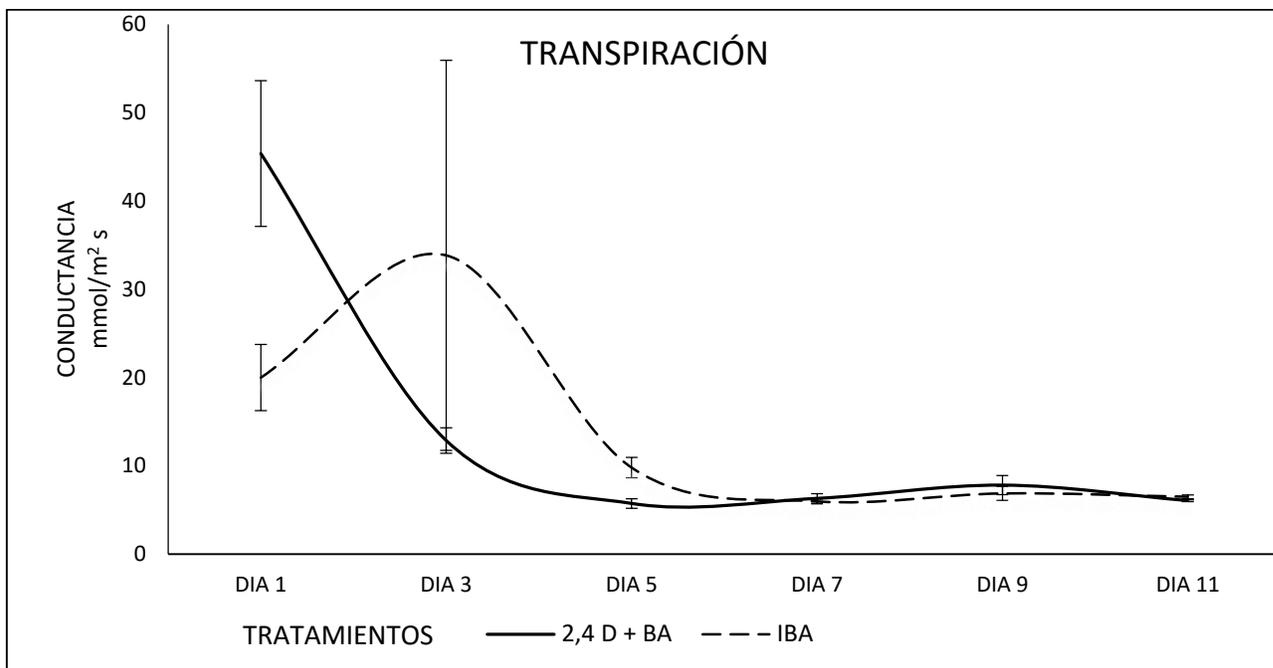


FIG 6. Conductancia media de tratamiento para enraizar (IBA) y mejor tratamiento para generar plantas completas (2,4D+BA) en la transpiración durante el periodo de aclimatización.

En cuanto a la conductancia del tratamiento $0.90 \mu\text{M}$ de 2,4 D con $8.88 \mu\text{M}$ de BA existen diferencias estadísticas significativas en los valores de las plantas aclimatizadas entre el día 1 y los demás días, pues el promedio de los valores durante el primer día fueron de $45.3 \text{ mmol/m}^2\text{s}$, las cuales durante el transcurso del tiempo fueron disminuyendo de forma gradual hasta $6.07 \text{ mmol/m}^2\text{s}$, esto quiere decir que los primeros 3 días son de gran importancia para el éxito de la aclimatización, pues en estos días las plantas transpiran una gran cantidad de agua provocando su desecación. En cuanto al tratamiento para enraizar de $4.92 \mu\text{M}$ de IBA no existen diferencias significativas en cuanto a los días es decir los valores de conductancia se mantuvieron constantes estadísticamente sin embargo la conductancia más elevada fue la del segundo día lo cual puede ser atribuido a un error de medición en una de las plantas, ya que la transpiración aumenta en función de la temperatura la cual fue menor que la del primer día, es importante mencionar que después del segundo día las conductancias disminuyen y se mantienen entre $9.8 \text{ mmol/m}^2\text{s}$ y $6.5 \text{ mmol/m}^2\text{s}$ valores similares a los obtenidos en el primer

tratamiento, estos resultados coinciden con lo reportado por Santamaría y colaboradores (1995), quienes evalúan la conductancia de las hojas de brotes de *Agave tequilana* después de haber salido a condiciones *ex vitro* con un valor de 60 mmol/m²s, ellos concluyeron que durante los primeros 60 minutos después de haber expuesto a las plántulas al medio exterior estas pierden agua a velocidades altas, comparadas con plantas *ex vitro*, sin embargo también reportan que durante las siguientes 7 horas las plantas pierden agua a velocidades similares al final del experimento reportan que ambas plantas perdieron únicamente alrededor del 5 % de su peso original.

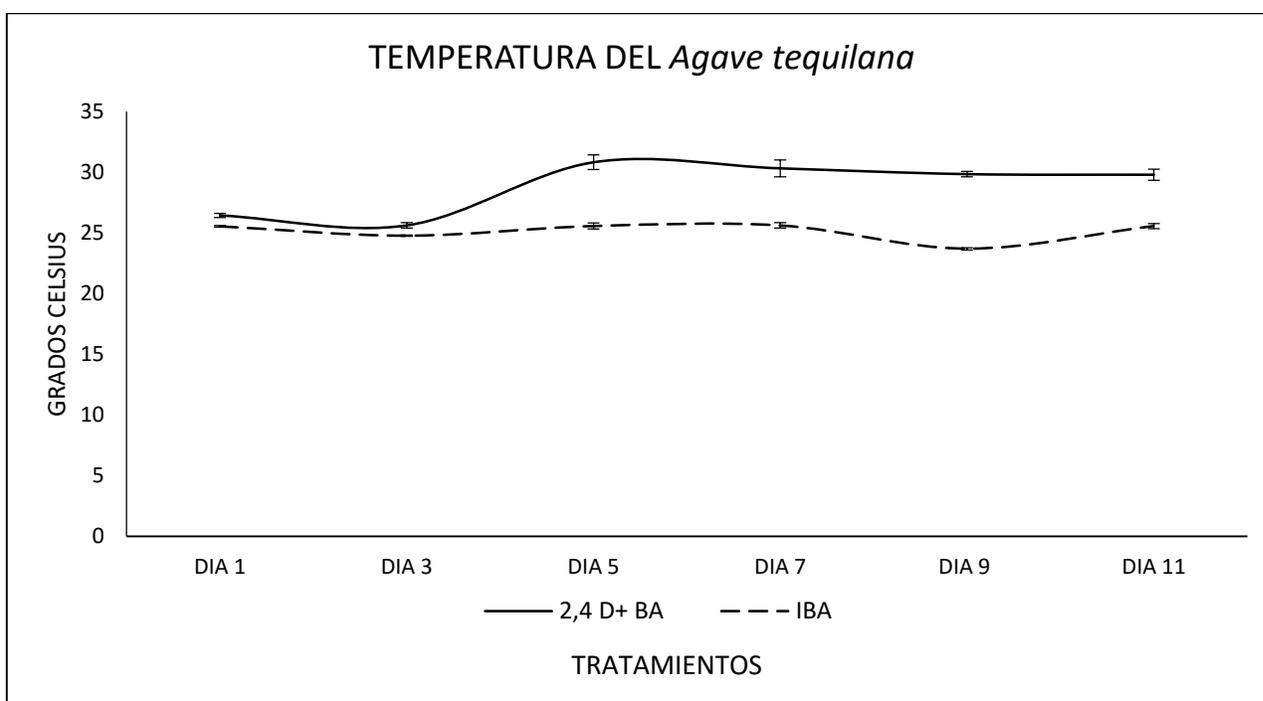


FIG 7. Temperatura media de las plantas durante el periodo de aclimatización

El tratamiento para enraizamiento con 4.92 µM de AIB resultó muy eficiente pues el porcentaje de plantas enraizadas fue del 85% con una longitud promedio de 1.55 cm lo cual coincide con lo reportado por Enríquez y colaboradores en el 2005 quienes utilizaron la misma concentración de AIB en el enraizamiento de brotes de *Agave angustifolia* concluyendo que la presencia de esta auxina estimula el crecimiento de una mayor cantidad de raíces en menor tiempo en comparación con brotes cultivados en medio sin AIB coincidiendo también con Miguel y colaboradores

(2013), quienes reportan que al mantener medio con AIB en una concentración de 2.46 o 4.92 μM se estimula en los brotes la formación de raíces que en los medios que no tienen esta hormona. Mientras que la supervivencia de las plantas trasplantadas a suelo fue del 100% lo cual coincide con lo reportado por Aureoles y colaboradores quienes propagaron *Agave inaequidens* Koch, sin embargo la longitud de sus raíces fue de 2.5 cm en promedio mientras que las raíces de las plántulas de *Agave tequilana* fueron de 1.5 cm.

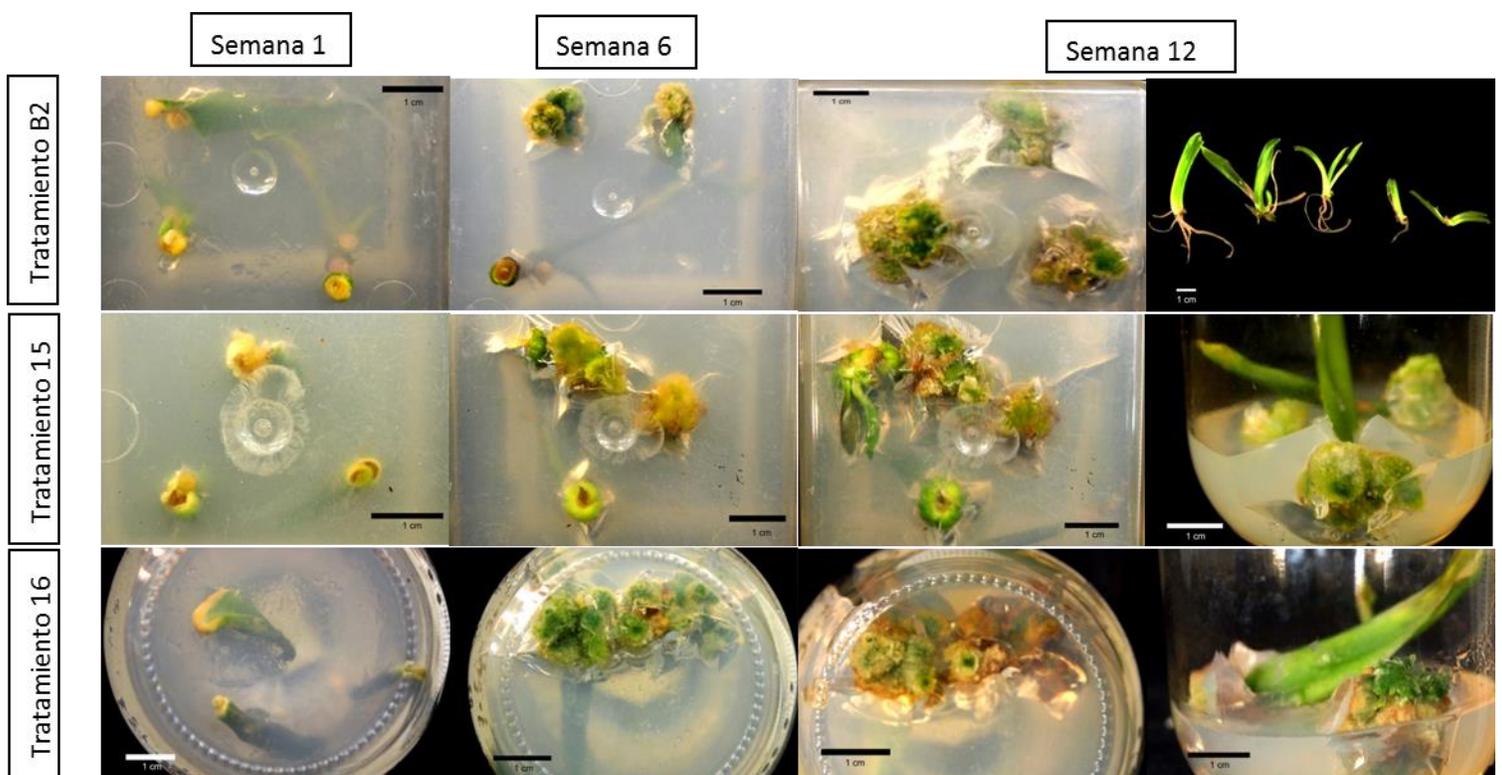


FIG 8. Cambios morfológicos de *Agave tequilana* Weber var azul en 3 tratamientos durante 12 semanas.



Agave tequilana enraizado con 1 mgL de IBA



Trasplante de *Agave tequilana* a suelo.

12.0 CONCLUSIONES

El mejor tratamiento para generar plántulas completas de *Agave tequilana* es 0.90 μM de 2,4 D con 8.88 μM de BA, mientras que el tratamiento de 1mgL de AIB demostró ser muy eficaz en la formación de raíces.

Durante la multiplicación y establecimiento se debe cambiar el medio cada 15 días para evitar oxidación de las plántulas.

Los tratamientos más exitosos en producir plántulas de *Agave tequilana* son las combinaciones de BA con 2,4D.

Se pueden obtener plántulas completas de *Agave tequilana* en 16 semanas.

El método de desinfección más efectivo es con hipoclorito de sodio al 100% durante 1 minuto.

El porcentaje de germinación de las semillas de *Agave tequilana* es muy baja (13.6%).

El tratamiento B2 (0.90 μM de 2,4 D con 8.88 μM de BA) también demostró generar raíces sin embargo en una proporción baja comparada con 1mgL de AIB.

Las plántulas generadas en condiciones in vitro se adaptaron muy bien al medio exterior.

13.0 LITERATURA CITADA

Angeles, E. A., Valencia, A. J., Virgen, G., Ramirez, C., Paredes, L. y Hurtado, S. (2012). Micropropagacion de agave (*Agave tequilana* Weber. Var. Azul) a través de yemas axilares. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 15:693-698.

Aureoles, R. F., Rodríguez, J. L., Legaria, J. P., Sahagún, J. y Peña, M. G. (2008). Propagacion *in vitro* del “maguey bruto” (*Agave inaequidens* Koch), una especie amenazada de interés económico. *Revista Chapingo Serie Horticultura*. 14: 253-269.

Borges, G. M., Estrada, A. E., Perez, R. I. y Meneses, R. S. (2009). Uso de distintos tratamientos de desinfección en el cultivo *in vitro* de *Dioscorea alata* L. clone. *Rev. Colomb. Biotecnol.* 11(2):127-135.

Calva, C. G., y Ríos, L. E. (1999). Cultivo de callos y acumulación de metabolitos secundarios. En: Rodríguez V. R., Calva C. G., Ramos R. E. G., Salazar M. A. (Eds.) Aspectos aplicados de la biotecnología. P.P. 267-301.

Carpita, N., y Mc, Cann. M. (2000). The cell wall. En: BUCHANAN B., GRUISSEM W., JONES R. (Eds.) *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. USA: American Society of Plant Physiologists, P.P. 52-108.

Cen, E. R., Gómez, F., y Martínez, A. (2015). Tolerancia de *Agave tequilana* a altas concentraciones de cationes metálicos divalentes. *Polibotánica*, (40),163-182.

Colunga, P., Larque, S. A., Eguiarte, L. E. y Zizumbo, D. (2007) .En lo ancestral hay futuro: del tequila, los mezcales y otros agaves. Centro de investigación científica de Yucatan.

Consejo Regulador del Tequila (CRT). (2005). Plagas y Enfermedades del *Agave tequilana* Weber var. Azul. Reporte del Comité Técnico Agronómico. Guadalajara, Jalisco. México.

Domínguez, R. S., Alpuche, S. G., Vasco, M. L. y Perez, M. E. (2008). Efecto de citocininas en la propagación in vitro de Agaves mexicanos. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 31: 317-322

De Klerk, G., Brugge J. T y Marinova S. (1997). Effectiveness of IAA, IBA and NAA during adventitious root formation in vitro in Malus Jork 9. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 49: 39-44.

Eguiarte, F. E., y Gonzales, G. A., (2007). De genes y magueyes estudio y conservación de los recursos genéticos del tequila y el mezcal, *ciencias* 87. P.P. 28-35.

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

Espinoza L. (2015). Generalidades e importancia de los agaves en México. Centro de investigación científica de Yucatán, P.P. 161-164.

Ferl, R., y Paul A. L. (2000). Genome organization and expression. En: Buchanan B., Gruissem W., Jones R. (eds.) *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. USA: American Society of Plant Physiologists, P.P. 312-357

Fowler, M. W. (1987). Products from plant cells. En: Bu'lock J., Kristiansen B. (Eds.) *Basic Biotechnology*. Academic Press, M., London, England. P.P. 525-544.

Garcia, M. A. (2002). Distribution of de genus agave (Agavaceae) and its endemic species in Mexico” en *cactus and succulent journal (us)* 74:177-187.

García, A. J. (2007). Los agaves de México. *Ciencias* 87, 14-23.

George, E. F.(1987). Factors affecting groeth and morphogenesis. I. Genetype and the physical environment. In: *Plant Propagation by Tissue Culture. Part I: The Techonology* (E. George, ed.), P.P. 183-230. 2nEd. Exegetics. Edington. UK.

George, E., y Debergh, P. (2008). Micropropagation: Uses and Methods. IN: Plant Propagation by Tissue Culture. Editado por Edwin George, Michael Hall y Geert-Jan Klerck. 3era Edición. Países Bajos, Springer. p. 29-64. En línea <http://link.springer.com/book/10.1007%2F978-1-4020-5005-3> consultado 17/11/2016

Gómez, R. (1998). Selección in vitro a enfermedades. En Pérez-Ponce J (Ed.) Propagación y Mejora Genética por Biotecnología. Instituto de Biotecnología de Plantas. Santa Clara, Cuba. P.P. 327-353.

Hartmann, H. T. y Kesters, D. E. (2011). Propagación de plantas, principios y prácticas. 8va edición. Ed Pearson.

<http://snics.sagarpa.gob.mx/prensa/boletines/Paginas/2015-B009.aspx> programa de Conservación Nacional del Agave consultado 17/10/2016

<https://www.google.com/patents/WO2003039244A1?cl=es> patente regeneración de plantas de *Agave tequilana* weber var. Azul mediante embriogénesis somática indirecta.

<http://www.helmmexico.com/es/productos/proteccion-de-cultivos/productos/detalle/product/benlate-1/informacion> del fungicida Benlate® 50WP consultado 29/08/17

https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=505876#null Clasificación taxonómica de *Agave tequilana* weber var azul consultado 10/11/16

Jiménez, E. (1998). Generalidades del cultivo in vitro. En: Perez-Ponce J. (ed.) Propagación y Mejora Genética de plantas por Biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Cuba. P.P.13-24.

Juárez, R. E., Valenzuela, K. K., Sosa, M. E y Paredes, O. (2007). Una alternativa biotecnológica para industria del tequila cultivo de callos de *Agave tequilana weber*

variedad azul. VII Congreso Nacional de Ciencia de los Alimentos y III Foro de Ciencia y Tecnología de Alimentos Guanajuato, Gto.

Jimenez, J., Chaparro, A., Blanco, J. (2009). Evaluación de diferentes combinaciones fitohormonales en la regeneración de *Solanum tuberosum* (Solanaceae) Var. Pastusa Suprema a partir de explantes internodales., Rev. Colomb. Biotecnol. 11(2):66-74.

Marín, J. A. (1993). Micropropagación de especies frutales. HortoFrutic. 1: 56-62.

Martínez, C., Harry, S. y Thorpe, A. 1992. Optimization of bud induction in cotyledonary explants of *Pinus canariensis*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 29:247-255

Medel, A., Flores, A., Armendariz, S. y Santamaria, E. (2001). Tecnicas de desinfestación y siembra in vitro de embriones maduros de falso peyote (*Ariocarpus fissuratus* var. *Fissuratus* (Eng.) *Shumann*), (Cactaceae). Revista Chapingo Serie Zonas Aridas 2(1):53-59.

Miguel, M., Enriquez, J., Velazco, V., Aparicio, Y., Carrillo, J., Rodriguez, G. (2013). Composicion del medio de cultivo y la incubacion para enraizar brotes de Agave. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas Pub. Esp. 6 (14):1151-1159

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

Nikam, T. (2003). Somatic embryogenesis in sisal (*Agave sisalana* Perr. ex. Engelm). Plant and Cell Reports 22:188-194.

Portillo, L. y Santacruz, F. (2006). Obtencion de embroides de *Agave tequilana* Weber a partir de explantes de raíz. Zonas Áridas 10(10):1

Radice S. (2004). Morfogénesis in vitro. En: Biotecnología y mejoramiento vegetal. Ediciones Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria Editores:Gabriela Levitus, Dra. Viviana Echenique, Dra. Clara Rubinstein, Esteban Hopp y Luis Mroginski. Parte II, Capitulo I.pp 26-33

Ramirez, M., Parra, L., Armenta, F., Borodanenko, J. y Barrera, J. (2000). Germinación de semillas y cultivo in Vitro de brotes de Agave Tequilana weber, Var. Azul. Inc. Memorias del XVIII Congreso nacional de fitogenética. Irapuato, Gto. Mex. P.P. 344.

Ruiz, J. A. (2007). Requerimientos agroecológicos y potencial productivo del agave *Agave tequilana* Weber en México. (P.P. 11-36) In Rulfo V., F. O. et al. (ed.). Conocimiento y prácticas agronómicas para la producción de *Agave tequilana* Weber en la zona de denominación de origen del tequila. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional del Pacífico Centro.

Rulfo V., (2007). En: Conocimiento y prácticas agronómicas para la producción de *Agave tequilana* Weber en la zona de denominación de origen del tequila. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional del Pacífico Centro.

Silos, H., Tovar, C. L., Gonzales, N., Mendez, S. J. y Rossel, D. (2011). Estudio Integral del Maguey (agave salmiana) Propagacion y valor nutricional. RESPYN "Revista Salud Publica y Nutricion" edición especial 5: 75-82.

Salisbury, F. B., Ross C.W. (1994). Fisiología Vegetal. México. Grupo Editorial Iberoamerica. P.P.54-93

Santamaria, J., Herrera, J., Robert, M., Stomatal physiology of a micropropagated CAM plant; *Agave tequilana* (Weber). *Plant Growth Regulation* 16:211-214,1995.

Sharry, S., Cedres, G., Adema, M., Abedini, Walter(2015). Plantas de probeta: Manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos in vitro. Universidad Nacional de la Plata. Libro digital, PDF. PP 92-100 y 114-115.

Strasburguer, E., Noll, F., Schenck, H. y Schimper, A. (1994). Tratado de botánica. Ediciones Omega, S.A. 1068 P.P.

Street, H. E. (1977). Cell (suspension) cultures techniques. En: Street H. E. (Ed). Plant tissue and cell culture. Blackwell Scientific Publishing. Oxford., England. P.P. 61-102.

Toribio, R. H., (2005). Comportamiento de explantes de agave pulquero (*Agave atrovirens*) en la interacción de dos reguladores de crecimiento. Tesis de maestría. Instituto politécnico nacional. Centro de investigación en biotecnología aplicada.

Valenzuela, S, K., Juarez, H. R., Cruz, H. A., Olalde, P. V., Valverde. M., Paredes. L. O. (2006). Plant regeneration of *Agave tequilana* by indirect organogénesis. In vitro cell dev. 42: 336-340.

Verduzco, J., Predo, C.I., y Mercado, H. (2009). Caracterización e identificación taxonomica del maguey. Revista Salud Publica y Nutricion Edicion Especial No 2. P. P.75-99.

Woodward, B. (1997). Micropropagation. En: Advanced tissue culture course. UNESCO/BAC BETCEN, Biotechnology Division ACR- Roodeplaat. Pretoria.186. P.P.

BENLATE® 50 WP, es un fungicida sistémico de amplio espectro de traslocación acropétala para el control de enfermedades en tratamiento foliar, su ingrediente activo Benomyl perteneciente al grupo químico de los benzimidazoles tiene un amplio campo de acción sobre hongos que afectan a los cultivos. BENLATE® 50 WP, es absorbido por las hojas y la raíz y controla un amplio rango de enfermedades de origen fungoso en cereales, hortalizas, frutales y ornamentales. En presencia de humedad se descompone lentamente. BENLATE 50 WP no causa fitotoxicidad si se usa en las dosis y condiciones recomendadas.