



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA APLICADA

MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA APLICADA

“INDUCCIÓN DE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN CULTIVO *in vitro* DE *Agave atrovirens* KARW. EX SALM- DYCK”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA APLICADA

PRESENTA:

BIOL. AGROP. LUIS MARIO AYALA GUERRERO

DIRECTORA DE TESIS:

M. EN C. ANGÉLICA DEL CARMEN RUÍZ FONT

COMITÉ TUTORIAL:

DR. SERGIO RUBÉN TREJO ESTRADA

DR. MIGUEL ANGEL VILLALOBOS LÓPEZ

M. EN C. MARIBEL FLORES GONZÁLEZ

M. EN C. LILIA TAPIA LÓPEZ



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

SIP-14

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Lardizabal, Tlaxcala siendo las 10:00 horas del día 21 del mes de Octubre del 2010 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIBA TLAXCALA para examinar la tesis de titulada:
INDUCCIÓN DE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN CULTIVO *in vitro* DE *Agave atrovirens*
KARW. EX SALM-DYCK

Presentada por el alumno:

AYALA

Apellido paterno

GUERRERO

Apellido materno

LUIS MARIO

Nombre(s)

Con registro:

B	0	7	1	1	3	5
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA APLICADA

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Director de tesis

M. EN C. ANGÉLICA DEL CARMEN RUIZ FONT

M. EN C. MARIBEL FLORES GONZÁLEZ

M. EN C. LILIA TAPIA LÓPEZ

DR. SERGIO RUBÉN TREJO ESTRADA

DR. MIGUEL ÁNGEL VILLALBA LÓPEZ

EL PRESIDENTE DEL COLEGIO

DRA. ALMA LETICIA MARTÍNEZ AYALA



Centro de Investigación
 en Biotecnología
 Aplicada



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de TLAXCALA el día 24 del mes SEPTIEMBRE del año 2010, el (la) que suscribe Biol. LUIS MARIO AYALA GUERRERO alumno (a) del Programa de MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA APLICADA con número de registro B071135, adscrito a POSGRADO EN BIOTECNOLOGÍA APLICADA, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de M. EN C. ANGÉLICA DEL CARMEN RUÍZ FONT y cede los derechos del trabajo intitulado INDUCCIÓN DE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN CULTIVO *in vitro* DE *Agave atrovirens* KARW. EX SALM-DYCK, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección C. VICENTE GUERRERO No. 2, COLONIA CENTRO, SAN FELIPE IXTACUIXTLA DE MARIANO MATAMOROS, C.P. 90120, TEL. 2481167597. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Biol. LUIS MARIO AYALA GUERRERO

Nombre y firma

ÍNDICE

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTOS

ÍNDICE DE FIGURAS	3
ÍNDICE DE TABLAS.....	6
ABREVIATURAS.....	8
I. RESUMEN.....	9
II. ABSTRAC.....	10
1. INTRODUCCIÓN.....	11
2. ANTECEDENTES.....	13
2.1. El agave.....	13
2.2. Características taxonómicas del género <i>Agave</i>	14
2.3. Distribución de la familia <i>Agavaceae</i>	15
2.4. Clasificación y descripción del <i>Agave atrovirens</i>	16
2.5. Formas de propagación convencional de agaves.....	16
2.6. Descripción de la zona de estudio.....	18
3. MARCO TEÓRICO.....	19
3.1. Micropropagación.....	19
3.1.1. El explante.....	20
3.1.2. Reguladores de crecimiento vegetal.....	21
3.1.3. Métodos de micropropagación.....	24
3.1.3.1. Organogénesis.....	24
3.1.3.2. Organogénesis directa.....	25
3.1.3.3. Organogénesis indirecta.....	25
3.1.4. Micropropagación de agaves.....	26
3.1.5. Embriogénesis somática.....	31
3.1.6 Embriogénesis directa e indirecta.....	34
4. JUSTIFICACIÓN.....	36
5. HIPÓTESIS.....	37
6. OBJETIVO GENERAL.....	38
6.1. Objetivos Específicos.....	38

7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	39
7.1. Recolección de semillas y plantas.....	40
7.2. Germinación <i>in vitro</i> de semillas colectadas y preparación del explante...	40
7.3. Aislamiento y potencial de embriones cigóticos como explante.....	41
7.4. Potencial de hojas como fuente de explante.....	42
7.5. Inducción de respuestas específicas.....	43
7.5.1. Inducción de embriogénesis somática directa.....	43
7.5.2. Inducción de calogénesis.....	44
7.5.3. Inducción de embriogénesis somática indirecta.....	44
7.6 Optimización de la inducción de embriogénesis somática.....	45
7.7. Análisis estadístico.....	46
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	47
8.1 Germinación <i>in vitro</i> de semillas colectadas y preparación del explante.....	47
8.2. Aislamiento y viabilidad de embriones cigóticos como fuente de explante.....	49
8.3. Potencial de hojas como fuente de explante.....	50
8.4. Inducción de respuestas específicas.....	51
8.4.1 Inducción de embriogénesis somática directa en medio MS en fotoperiodo.....	51
8.4.2 Inducción de embriogénesis somática directa en medio MS en oscuridad.....	56
8.4.3 Inducción de calogénesis.....	59
8.4.4 Inducción de embriogénesis somática indirecta en medio MS.....	61
8.4.5 Inducción de embriogénesis somática directa en medio AE.....	62
8.5 Optimización de la inducción de embriogénesis somática.....	68
9. CONCLUSIONES.....	70
10. PERSPECTIVAS.....	71
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72
III. ANEXOS.....	82

DEDICATORIA

Este trabajo lo dedico especialmente a mi hija Kenia Jaqueline que fue la fuerza que me permitió salir adelante en este logro en mi vida, a mi compañera de vida Yazmin por su paciencia, comprensión y apoyo incondicional.

A mis padres, Mario Ayala Islas y María De Los Ángeles Guerrero Hernández por su apoyo incondicional en todo momento y su ejemplo de superación constante.

A mis hermanos Javier, Eric, Iván y Aldahir por su apoyo y cariño que me han brindado siempre.

AGRADECIMIENTOS

A la Maestra Angélica del Carmen Ruíz Font, por su excelente dirección, inagotable apoyo y constante motivación durante la elaboración de este trabajo.

A la Maestra Lilia Tapia López por su profesionalismo que me permitió sacar adelante este trabajo, ya que sin su valioso apoyo no hubiera sido posible.

A la Maestra Maribel Flores Gómez, el Dr. Sergio Rubén Trejo Estrada y el Dr. Miguel Ángel Villalobos López, por su valiosa orientación académica brindada a lo largo de mi formación profesional y en el desarrollo del presente escrito.

A mis profesores, el Lic. Víctor Oswaldo Rodríguez Arreola, la Dra. Analilia Arroyo Becerra, la Dra. Alma Leticia Martínez Ayala y la Dra. Diana Cortés, por compartir sus conocimientos y ser parte importante en mi formación como Maestro.

A mis amigos Euriel^t, VORA, Aarón, Lupita, Elda, Laura, María Luisa, Miriam, Edith, Gabriel, Sinaí, Violeta, Eloy, Janet, José Luis y Carlos de Jesús, por su amistad y apoyo en todo momento.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Morfología del agave (Arizaga y Ezcurra, 2002).

Figura 2. Distribución de la familia Agavaceae (García y Galvan, 1995).

Figura 3. Ubicación de la zona de estudio.

Figura 4. Principales auxinas utilizadas en el cultivo de tejidos vegetales.

Figura 5. Principales citocininas utilizadas en el cultivo de tejidos vegetales.

Figura 6. Diagrama de materiales y métodos para la inducción de embriogénesis somática en *Agave atrovirens*.

Figura 7. Germinación acumulada por día de semillas de *Agave atrovirens* en los tratamientos testigo.

Figura 8. Germinación acumulada por día de semillas de *Agave atrovirens* en los tratamientos I (24 hrs. a 4°C).

Figura 9. Germinación acumulada por día de semillas de *Agave atrovirens* en los tratamientos IV (96 hrs. a 4°C).

Figura 10. Porcentajes de respuesta inducida de explantes base de hoja y hoja en medio de cultivo MS y en condiciones de fotoperiodo (16 h. luz / 8 h. oscuridad) a 25±2°C.

Figura 11. Efecto de las citocininas en la síntesis de clorofila en callos de base de hoja en medio MS y fotoperiodo. a) Callo de 30 días en medio MS, en condiciones de fotoperiodo y con una concentración de 0.25 mg/l de 2,4-D y 1.5 mg/l de BAP. b) Callo de 30 días en medio MS, en condiciones de fotoperiodo y con una concentración de 1 mg/l de 2,4-D.

Figura 12. Inducción de respuesta callogénica y embriogénica. a) Inducción de respuesta callogénica en base de hoja como explante en medio MS adicionado con 2 mg/l de 2,4-D en condiciones de fotoperiodo. b) Inducción de respuesta

embriogénica en base de hoja como explante en medio MS adicionado con 0.25 mg/l de 2,4-D en condiciones de fotoperíodo.

Figura 13. Formación de embriones somáticos. a) Base de hoja de 25 semanas en medio MS adicionado con 0.25 mg/l de 2,4-D en condiciones de fotoperíodo. b) Hoja de 20 semanas en medio MS adicionado con 0.25 mg/l de 2,4-D en condiciones de fotoperíodo. Estructuras proembriogénicas en diferentes fases de maduración (EP) y Embriones somáticos en estado cotiledonal (ES).

Figura 14. Desarrollo de embriones somáticos en base de hoja cultivada en medio MS adicionado con 0.25 mg/l de 2,4-D en condiciones de fotoperíodo. a) Inducción de la respuesta embriogénica a las 10 semanas b) Crecimiento y desarrollo de la masa embriogénica a las 15 semanas. c) Desarrollo de los proembriones pasando por las fases: globular, corazón y torpedo a las 20 semanas y d) Embriones desarrollados en la fase cotiledonal a las 25 semanas. Callo embriogénico (CA), estructuras proembriogénicas en diferentes fases de maduración (EP) y embriones somáticos en estado cotiledonal (ES).

Figura 15. Porcentajes de respuesta inducida de explantes base de hoja y hoja en medio de cultivo MS y en condiciones oscuridad a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$.

Figura 16. Inducción y desarrollo de la respuesta callogénica en: a) Hojas de plántulas germinadas *in vitro* en medio MS, concentración 1.0 mg/l de 2,4-D y 1.0 mg/l de 6-BAP, en condiciones de fotoperíodo a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ y b) Hojas inmaduras de plántulas colectadas en campo en medio MS, concentración 1.0 mg/l de 2,4-D y 1.0 mg/l de 6-BAP, en condiciones de oscuridad a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$.

Figura 17. Oxidación y necrosis de callos trasplantados para la inducción de embriogénesis somática indirecta. Concentración 0.25 mg/l de ANA y 1.5 mg/l de KIN, en medio MS en condiciones de fotoperíodo (16 h. luz / 8 h. oscuridad) a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$. a) Día 5 de cultivo posterior al trasplante. b) Día 10 posterior al trasplante.

Figura 18. Porcentajes de respuesta inducida de explantes base de hoja y hoja en medio de cultivo AE y en condiciones de fotoperiodo (16 h. luz / 8 h. oscuridad) a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$.

Figura 19. Callos producidos a partir de base de hoja de *Agave atrovirens* como fuente de explante en medio AE. a) 1 mg/l 2,4-D y 1 mg/l BAP, en condiciones de fotoperiodo (16 h. luz / 8 h. oscuridad) a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$. b) 1 mg/l 2,4-D y 1 mg/l BAP, en condiciones de oscuridad a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$

Figura 20. Porcentajes de respuesta inducida de explantes base de hoja y hoja en medio de cultivo AE y en condiciones de oscuridad a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Usos del maguey (Abundis-Vagas, 2007).

Tabla 2. Fitohormonas empleadas en cultivo de tejidos vegetales y sus efectos.

Tabla 3. Tratamientos aplicados para la inducción de embriogénesis somática directa en los medios de cultivo MS y AE en condiciones de fotoperiodo (16 h. luz / 8 h. oscuridad) y oscuridad.

Tabla 4. Tratamientos aplicados para la inducción callogénica en los medios de cultivo MS y AE en condiciones de fotoperiodo (16 h. luz / 8 h. oscuridad) y oscuridad.

Tabla 5. Tratamientos aplicados para la inducción de embriogénesis somática indirecta en los medios de cultivo MS y AE en condiciones de fotoperiodo (16 h. luz / 8 h. oscuridad) y oscuridad.

Tabla 6. Tratamientos aplicados para la optimización de la inducción de embriogénesis somática en medio de cultivo MS en condiciones de fotoperiodo (16 h. luz / 8 h. oscuridad).

Tabla 7. Inducción y velocidad de respuesta callogénica en explantes de *Agave atrovirens* en medio de cultivo MS y en condiciones de fotoperiodo y oscuridad.

Tabla 8. Efecto del medio de cultivo y condiciones de luz en la respuesta callogénica en explantes de *Agave atrovirens*.

Tabla 9. Porcentajes de establecimiento, respuesta callogénica y embriogénica de explantes cultivados en medio Murashige & Skoog adicionado con reguladores de crecimiento vegetal, vitaminas L2 y 3% de sacarosa.

Tabla 10. Porcentajes de respuesta para la inducción de callo para la embriogénesis somática indirecta en medio de cultivo MS en condiciones de fotoperiodo (16 h. luz / 8 h. oscuridad) y oscuridad.

Tabla 11. Efecto del medio de cultivo y condiciones de luz en la respuesta callogénica en explantes de *Agave atrovirens*.

Tabla 12. Porcentajes de establecimiento, respuesta callogénica y embriogénica de explantes cultivados en medio Arnold & Eriksson adicionado con reguladores de crecimiento vegetal, vitaminas L2 y 3% de sacarosa.

Tabla 13. Tratamientos aplicados para la inducción de embriogénesis somática en medio de cultivo MS (1962) y en condiciones de fotoperiodo (16 h. luz y 8 h. oscuridad).

ABREVIATURAS

AE.	Medio de cultivo Arnold & Eriksson.
AIA.	Ácido 3-indolacético.
AIB.	Ácido indolbutírico.
ANA.	Ácido naftalenoacético.
BA	Bencil adenina.
BAP	6-bencil aminopurina.
CTV.	Cultivo de tejidos vegetales.
h.	Horas
KIN.	6-furfuril aminopurina o Cinetina.
LS	Medio de cultivo Linsmaier y Skoog.
mM	Milimolar.
mg/l	Miligramos/litro.
MS.	Medio de cultivo de Murashige & Skoog.
μm	Micromolar.
pH.	Potencial de Hidrógeno.
SH	Medio de cultivo Shenk & Hildebrandt.
TDZ.	Thidiazurón.
v/v	Volumen sobre volumen.
2,4-D.	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético.

RESUMEN

El agave o maguey pulquero (*Agave atrovirens* Karw. Ex Salm-Dyck) es un importante cultivo en México. La savia de agave, conocida como aguamiel se obtiene al raspar la médula de agave en el tallo. Esta savia es fermentada para la producción de bebidas alcohólicas tradicionales ligeramente ácidas. La planta también se puede utilizar para la reforestación de suelos deteriorados y áridos, ya que crece óptimamente en suelos secos y arenosos. La tasa de multiplicación de esta planta es muy baja, por lo general produce entre 8 y 10 plántulas hijas durante su ciclo de vida sexual y la propagación por semilla requiere un periodo de 12 a 15 años, lo que hace poco factible cualquier programa acelerado para la reproducción. En cambio, un protocolo de cultivo de tejidos vegetales es necesario por dos razones: Un sistema eficiente de propagación y la mejora genética. Este estudio establece un conjunto de protocolos que pueden llegar a permitir una rápida y barata propagación de agave pulquero. Explantes (hojas y semillas) fueron evaluados para la producción de callo embriogénico y formación de embriones somáticos. Para cada tratamiento se utilizaron reguladores de crecimiento vegetal (2,4-D, ANA, AIA, KIN, 6-BAP y TDZ) en medio MS. El cultivo de callo se inició con la mezcla de 0.5 mg/l y 1.5 mg/l de 6-BAP además de 2 mg/l y 0.5 mg/l de 2,4-D, los resultados mostraron una excelente respuesta callogénica (100% de formación de callo). La formación de embriones se indujo en el medio basal MS con 0.125 mg/l, 0.25 mg/l y 0.5 mg/l de 2,4-D, vitaminas L2 y en condiciones de fotoperiodo, siendo estas condiciones las más eficientes obteniendo una respuesta embriogénica del 34%. La micropropagación del *Agave atrovirens* puede abastecer la demanda comercial de plantas, aunque es importante realizar estudios moleculares para establecer cambios en el material genético.

ABSTRACT

Maguey or agave pulquero (*Agave atrovirens* and *A. salmiana*) is an important crop in Mexico. The sap of the agave, known as aguamiel is obtained by scratching the medulla in the agave stem. The sap is fermented for the production of alcoholic and slightly acidic traditional beverage. The plant can also be used for reforestation of deteriorate soil and barren lands because it grows well on dry and sandy soil. The multiplication rate of this plant is very low, it usually generates between 8 and 10 daughter plantlets during its life cycle and the sexual propagation by seed, involves a period of 12 to 15 years, which makes unfeasible any program for accelerated reproduction. In contrast, tissue culture protocol is necessary for two reasons: efficient propagation system and genetic improvement process. This study establishes a set of protocols that can get to enable rapid and cheap propagation of Agave. Explants (seeds and leaves) were tested for the production of callus and somatic embryos forming. For each treatment were used plant growth regulators (2,4-D, NAA, IAA, KIN, 6-BAP and TDZ) in MS medium. The callus cultures were initiated with mix of 0.5 mg/l, 1.5 mg/l of 6-BAP and 2 mg/l, 0.5 mg/l of 2,4-D, this experiments show an excellent callogenesis (100% callus formation). Somatic embryos formation was successfully induced in the basal medium with 0.125 mg/l, 0.25 mg/l and 0.5 mg/l of 2,4-D, L2 vitamins and photoperiod conditions, these being the most conditions obtaining embryogenic response of 34%. *Agave atrovirens* micropropagation could supply the commercial plant demand, although it is important to conduct molecular studies to establish changes in the genetic material.

1. INTRODUCCIÓN

Por varias décadas el mejoramiento y la propagación convencional han contribuido significativamente en el mejoramiento genético de plantas, sin embargo, actualmente uno de los principales retos que se tienen, es la necesidad de incrementar la productividad por un lado y por otro el disminuir los costos de producción, por lo tanto en éste sentido el uso de herramientas biotecnológicas es una alternativa viable para resolver estos retos (Mondal *et al.*, 2004).

La propagación de plantas es una ocupación básica de la humanidad y está dada en gran parte sobre la habilidad del hombre para propagar y cultivar clases específicas de plantas que puedan ser usadas para proporcionarle protección, alimento, vestido, recreo y satisfacciones estéticas (Hartmann y Kester, 1975). Se puede decir que se trata de un tipo de reproducción de plantas controlada por el hombre para perpetuar individuos escogidos o grupos de plantas que tienen para él un valor específico.

Una planta de gran importancia, tanto económica como ecológica es el agave, que históricamente ha tenido un papel fundamental en el desarrollo de las comunidades ubicadas en las zonas áridas y semiáridas de México. Desde tiempos anteriores a la conquista y hasta nuestros días, el agave ha sido considerado “el árbol de las maravillas”, debido a los diferentes usos que se les puede dar. Las partes más comúnmente utilizadas del agave como fuente de alimento son los tallos y las bases de las hojas, las cuales son ricas en carbohidratos, de ellas es extraído un liquido rico en azúcares principalmente fructosa, con el cual se producen diferentes bebidas como “el aguamiel” que es consumido directamente en fresco sin llevarse a cabo proceso alguno de transformación microbiana, a diferencia del pulque, que es producto de la fermentación del aguamiel, además se producen algunos otros destilados como lo son el “bacanora”, “el mezcal” y “el tequila” (Arizaga y Ezcurra, 2002). Así mismo se obtienen fibras resistentes a partir de las hojas de agaves, siendo los principales el henequén y el sisal que son muy utilizadas en la industria textil.

Las hojas de algunas especies de agaves son desprovistas de sus espinas y picadas para ser suministradas como forraje al ganado. Además como se muestra en la tabla 1 son utilizadas diferentes partes de estas plantas, tanto en la medicina tradicional como en la fabricación de artículos domésticos, de ornato entre otros (Abundis-Vargas, 2007).

Tabla 1. Usos del maguey.

Alimento	Bebidas:		
	-Aguamiel	-Vinagre	
	-Miel	-Atole	
	-Jugo dulce	-Aguardiente	
	-Jarabe	-Tequila	
	-Pulque	-Mezcal	
	Comida:		
	-Gusanos rojos	-Gusanos blancos	
	-Sal de gusano	-Azúcar	
	-Saborizante para tamales y pan	-Mixiotes	
	-Levadura	-Tortillas	
Medicina	-Dolores de articulaciones	-Sanar heridas	
	-Prevenir el escorbuto	-Falta de movimiento de los miembros	
Tejido y vestimenta	-Hilos	-Tejidos y cordeles	-Telas
	-Bolsas	-Mantas	-Morrales
	-Tapetes	-Sandalias	-Sogas
	-Hamacas	-Reatas	
Construcción	-Vigas	-Garrochas y pilotes	
	-Cercas para delimitar terrenos		
	-Techos a modo de tejado		
Doméstico	-Jabón para ropa	-Cepillos y escobas	
	-Canastas	-Clavos	
	-Recipientes para comida	-Estropajos	
	-Combustible		
Ornato	-Adornos de navidad	-Fibras para arcos florales	
	-Adornos corporales	-Sonajas	
	-Juguetes para niños		

A pesar de la diversidad e importancia etnobotánica y económica de muchas especies de agaves, sólo especies como *Agave tequilana*, *A. fourcroydes* o *A. sisalana* se cultivan en forma extensiva, utilizando variedades seleccionadas que son casi exclusivamente mediante propagación vegetativa. Esto ha ocasionado una considerable pérdida de riqueza genética, favoreciendo así la susceptibilidad de los cultivos a riesgos fitosanitarios (Valenzuela, 1997).

2. ANTECEDENTES

2.1. El agave

Los agaves son plantas perennes, rizomatosas, frecuentemente propagadas por hijuelos, con raíces duras y fibrosas; además cuentan con un tallo grueso muy corto. Sus hojas son grandes, suculentas-fibrosas que terminan en una espina y que están dispuestas en roseta, los márgenes de las hojas presentan pequeñas espinas en forma de gancho o rectas. Las inflorescencias son bracteadas, escamosas y racemosas o paniculadas. Ocasionalmente presentan bulbillos en las inflorescencias. Las semillas son planas y negras (Figura 1). Los agaves son semélparos, esto es que solo tienen una floración durante su ciclo de vida, al cabo de la cual la planta muere (Guerrero *et al.*, 2006).

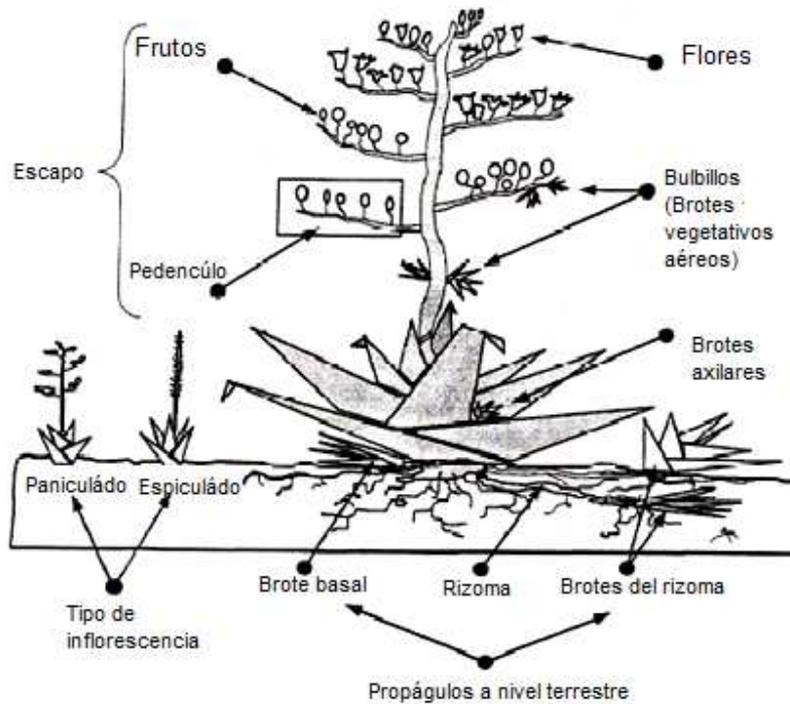


Figura 1. Morfología del agave (Arizaga y Ezcurra, 2002).

2.2. Características taxonómicas del género *Agave*

La planta del agave es originaria de América, específicamente de México, de donde fue introducido a otros países. El género *Agave* se encuentra ubicado dentro de la familia Agavaceae, la cual surgió aproximadamente hace 15 millones de años (Eguiarte *et al.*, 2000).

La familia Agavaceae tiene 8 géneros y aproximadamente 273 especies de las cuales 205 (75%) crecen en México y 151 (55%) son endémicas (García-Mendoza y Galván, 1995).

2.3. Distribución de la familia Agaveceae en América

García y Mendoza en 1995 mencionaron que la familia Agavaceae es de distribución americana, tiene su límite septentrional en Dakota del Norte, Estados Unidos y hacia el sur se extiende a través de Los Andes hasta Bolivia y Paraguay, incluyendo Centroamérica y las Antillas. Del mismo modo, asegura que el centro de mayor riqueza y biodiversidad para la familia se encuentra en México y áreas circunvecinas (Figura 2).



Figura 2. Distribución de la familia Agavaceae (García y Galvan, 1995)

En 1982 los agaves de Norteamérica fueron agrupados estableciendo que el subgénero *litteae* está integrado por 8 secciones con 54 especies, 4 subespecies, 6 variedades y 7 formas. El subgénero *Agave* lo integran 12 secciones con 82 especies, 21 subespecies y 23 variedades, en total 197 taxa (Good-Avila *et al.*, 2006).

Particularmente, el *Agave atrovirens* es considerado como una de las especies más vigorosas de las regiones semiáridas de México, siendo la producción de pulque el principal uso de esta planta (Cedeño, 1995).

2.4. Clasificación taxonómica y descripción del *Agave atrovirens*

Reino: Plantae

Subreino: Embryobionta

División: Manoliophyta

Clase: Liliopsida

Orden: Liliales

Familia: Agavaceae

Género: *Agave*

Especie: *atrovirens* Karw. Ex Salm-Dyck

El *Agave atrovirens* es una planta monocotiledónea, perenne y con flor monocárpica. Esta especie es originaria de la Sierra Madre del Sur en Oaxaca, México; se llegan a encontrar plantas silvestres o cultivadas en las crestas de las montañas entre los 2150 y 2500 msnm.

El *Agave atrovirens* se distingue por tener una espina terminal y una ranura lisa en la punta, las rosetas llegan a medir hasta 2 m de altura y 4 m de ancho, con 80 a 100 hojas mayores a 2 metros (Good-Avila *et al.*, 2006). Esta planta ha recibido nombres como “maguey de la cumbre” y “tapeme”. Comúnmente se utilizan dos formas de propagación de este agave, por medio de semilla y a través de hijuelos de dicha plantas (Ruvalcaba, 1983; Guerrero *et al.*, 2006).

2.5. Formas de propagación convencional de agaves

La propagación de plantas se puede llevar a cabo mediante dos formas: propagación vía sexual, utilizando la semilla y vía asexual a través de tejido somático. La reproducción sexual es la vía más común de propagación, ya que se efectúa de forma natural e involucra órganos y células especializadas para la unión de dos células sexuales o gametos. En el ciclo sexual, se obtienen nuevas plantas individuales con las características que presentan los genes propios de los

gametos masculino y femenino. En la producción por semillas puede que se presente cierta variación genética o segregación entre las plantas hijas (Oronoz *et al.*, 1983)

Propagar el agave mediante semillas ha presentado problemas, principalmente por la falta de disponibilidad de semillas, debido a que el ciclo de vida del *Agave atrovirens* es de aproximadamente ocho años y es hasta entonces cuando se producen semillas maduras, al igual que el caso de *Agave sisalana* y en otros como *A. victoriae-reginae* Moore, en donde el tiempo es de 20 a 30 años para producir semillas maduras (Das, 1992).

La reproducción asexual o vegetativa es aquella que no implica el proceso sexual, tanto las hojas como los tallos y las raíces pueden llevar a cabo la reproducción vegetativa en varios tipos de plantas. Los individuos obtenidos por este tipo de reproducción constituyen un clon, que a excepción de plantas con mutaciones naturales, son genéticamente idénticos a la planta madre (Oronoz *et al.*, 1983). Algunos de los procesos de reproducción asexual son la reproducción por bulbilos, rizomas (hijuelos), esquejes, acodos y mediante la micropropagación *in vitro*; siendo por bulbilos y por rizomas los más comúnmente usados. Los bulbilos son yemas adventicias a lo largo de los márgenes de las hojas, estas yemas después de un determinado tiempo caen desarrollando raíces y crecen formando una nueva planta (Conquist, 1981). Un fenómeno similar se presenta en algunas especies de agave, en las cuales se desarrollan bulbilos en meristemos axilares en la base de las flores (Binh *et al.*, 1990; Cedeño, 1995). Este método de propagación presenta algunas desventajas, ya que al desarrollarse estos bulbilos se pueden propagar las enfermedades que pudieran existir en la planta madre. Aunado a la propagación de enfermedades, el tiempo y costo es mayor que cuando se propaga por hijuelos rizomatosos (Gentry, 1982; Good-Avila *et al.*, 2006). Los rizomas crecen generalmente en un plano horizontal, paralelo a la superficie del terreno; a diferencia de las raíces, los rizomas poseen yemas en la cara superior de donde se originan ramas, hojas y flores aéreas y en la cara inferior generan raíces adventicias (Oronoz *et al.*, 1983). Al igual que por bulbilos, la propagación por

rizomas también es muy común en agaves, siendo ésta la más utilizada, no sólo por que conserva sus características genéticas, sino porque el desarrollo de las plantas es más rápido y vigoroso que con bulbilos (Binh *et al.*, 1990).

2.6 Descripción de la zona de estudio

El municipio de Ixtacamaxtitlán se encuentra en los paralelos $19^{\circ} 27' 18''$ y $19^{\circ} 44' 18''$ de longitud norte y los meridianos $97^{\circ} 42' 18''$ y $97^{\circ} 02' 54''$ de longitud occidental, presentando una temperatura media anual entre los 12 y 18 °C, con 500 mm. de precipitación media anual y con una vegetación de matorral-xerófilo.

Por otra parte, el municipio de Chignahuapan se encuentra en los paralelos $19^{\circ} 39' 42''$ y $19^{\circ} 58' 48''$ de latitud norte y los meridianos $97^{\circ} 57' 18''$ y $98^{\circ} 18' 06''$ de longitud accidental, presentando una temperatura media anual entre 5 y 12 °C, con 40 mm. de precipitación media anual en el mes más seco, además de presentar una vegetación de bosque-pino subhúmedo.

El municipio de Zacatlán se encuentra en los paralelos $19^{\circ} 50' 06''$ y $20^{\circ} 08' 12''$ de latitud norte de los meridianos $97^{\circ} 51' 06''$ y $98^{\circ} 12' 36''$, de longitud occidental, presenta una temperatura media anual entre los 12 y 18 °C, con 700 mm. de precipitación media anual y con vegetación de bosque-pino.

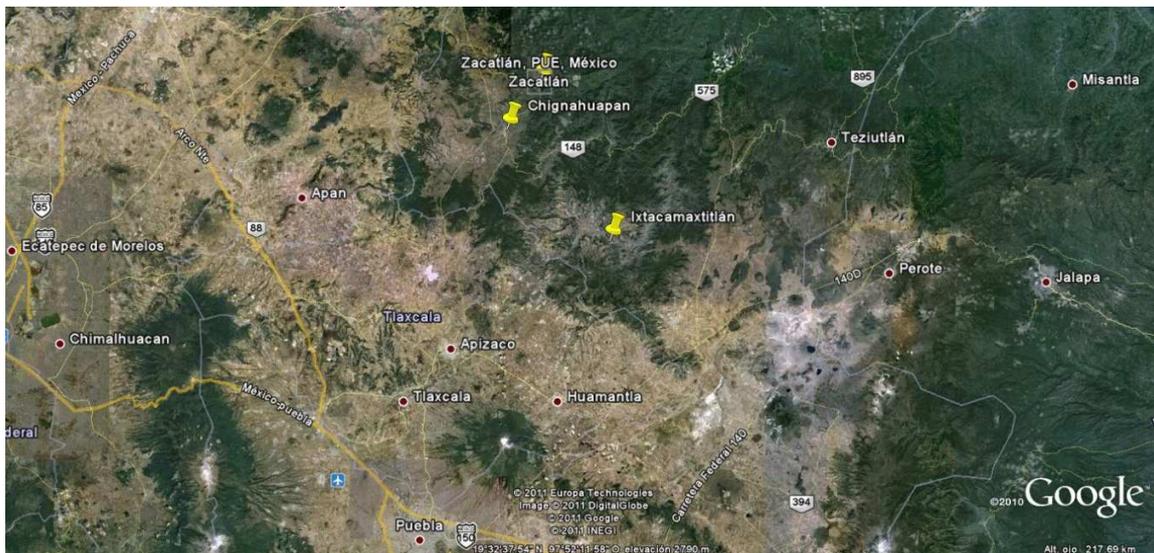


Figura 3. Ubicación de la zona de estudio.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 Micropropagación

La micropropagación es considerada como una extensión de la mayoría de los métodos de propagación convencional y consiste en cultivar segmentos de plantas seleccionadas que son conocidos como explantes. Dichos explantes son cultivados *in vitro* en un medio de cultivo conformado por macro y micronutrientes, azúcares como fuente de carbono, reguladores de crecimiento, vitaminas, un agente gelificante, así como condiciones de luz y temperatura que son específicas de acuerdo a la especie vegetal con la que se esté trabajando. Bajo estas condiciones se busca inducir la producción de brotes en los explantes para su posterior subcultivo en forma repetitiva, hasta producir plantas con las características genéticas de la planta original (Hussey, 1983). Las principales cualidades de la micropropagación son la rapidez y la multiplicación clonal de genotipos de plantas superiores libres de enfermedades y plagas (Smith y Drew, 1990).

Las técnicas de micropropagación o propagación *in vitro* tienen la ventaja de producir grandes cantidades de plantas en espacios relativamente reducidos y durante todo el año, a diferencia de los métodos convencionales de propagación, ya sea por semilla, hijuelos (rizomas) o bulbilos, con los cuales sólo se realiza la actividad de propagación una vez por año. En el caso del agave, la siembra por semilla o por bulbilos se lleva a cabo antes de la época de lluvias y en caso de los hijuelos, en el momento de la cosecha del agave, se dejan para su desarrollo. En caso de presentarse varios hijuelos, se selecciona el que tenga mejor vigor y mayor crecimiento (George, 1993).

Generalmente las técnicas de propagación *in vitro* semejan eventos naturales, como la producción de ramas y raíces; y más espectacularmente la producción de embriones. Estas formas de propagación no siempre se utilizan con el propósito de una producción masiva de las plantas de alto valor, sino que también se utilizan para mejorar genéticamente alguna especie de interés para el hombre.

Muchos factores afectan el crecimiento de los órganos en las plantas, tejidos y células *in vitro* y estos son similares a aquellos que limitan el crecimiento de las plantas intactas *in vivo*. Las más importantes variables químicas y ambientales que deben ser probadas para la inducción y/o multiplicación de los cultivos *in vitro* son la naturaleza y edad del explante, los reguladores de crecimiento vegetal, la composición del medio de cultivo, los antioxidantes, el balance de nitrógeno, el tipo y concentración de azúcares, agentes gelificantes, la luz y el fotoperíodo (Robert *et al.*, 2004).

La variación genética y la selección celular son técnicas que se pueden realizar a nivel celular en lugar de manipular plantas completas en grandes extensiones de suelo. A partir del descubrimiento de que las plantas pueden ser clonadas con mayor rapidez *in vitro* que *in vivo*, en los últimos años se ha incrementado el conocimiento concerniente a la micropropagación. Con esto, se ha abierto la posibilidad de obtener clonaciones que fueron imposibles de lograr *in vivo* en otros tiempos (Pierik, 1987).

3.1.1. Explante

Un explante es una pequeña porción del tejido vegetal que funciona como generador de nuevas plantas en el cultivo *in vitro*. La elección de un explante adecuado 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 utilizada. La selección de la fuente de explante es un paso crucial en el establecimiento exitoso de un cultivo de tejidos vegetales. Las plantas maduras no son recomendables debido a que son muy fibrosas y difíciles de cortar, en términos generales, están más infestados con microorganismos y es más difícil inducir la formación de nuevos brotes de estos tejidos (Robert *et al.*, 2004).

El estado del desarrollo del material inicial es un factor muy importante, ya que las plantas jóvenes tienen mayor capacidad de regeneración que las plantas adultas. Si el objetivo final es el obtener callos, es factible la utilización de una vasta gama de explantes que cultivados en condiciones apropiadas permiten la proliferación

callosa. Todo aquél explante que contenga células nucleadas vivas se puede emplear potencialmente para la obtención de callos. Frecuentemente se utilizan ápices o meristemos caulinares, hojas, entrenudos, cotiledones, raíces, anteras e inclusive tejidos altamente diferenciados como los provenientes de frutos (Pierik, 1987; George, 1993).

En el caso de plantas en las cuales la obtención de callos no esté limitada por el tipo de explante, éste se seleccionará por razones prácticas como disponibilidad, facilidad de manipulación, homogeneidad, baja contaminación con microorganismos y rápida respuesta *in vitro*. La elección de un explante apropiado se complica si se pretende la regeneración de plantas a partir de callos, así mismo, el establecimiento de cultivos que persiguen determinados objetivos puede limitar aún más la elección del tipo de explante.

El explante contiene en la superficie una abundante microflora, que debe de ser eliminada por medio de una desinfección antes del corte del tejido u órgano que será empleado como inóculo. El agente desinfectante más adecuado, así como su concentración y el tiempo de desinfección debe de ser determinado para el material vegetativo con el que se trabaja (Yoeman y Macleod, 1977; George, 1993).

3.1.2. Reguladores de crecimiento vegetal

Los reguladores de crecimiento vegetal o fitohormonas son sustancias extraídas de los tejidos vegetales y sustancias sintéticas, que en pequeñas cantidades estimulan, inhiben o modifican de alguna manera cualquier proceso fisiológico en plantas (Bidwell, 1979).

El crecimiento en las plantas es un proceso dinámico, complejo y rigurosamente controlado. Los reguladores del crecimiento vegetal juegan un papel principal en el control del crecimiento, no únicamente dentro de la planta como universo, sino también a nivel de órgano, tejido y célula (Wareing y Phillips, 1973).

Son cinco tipos básicos de sistemas químicos de reguladores de crecimiento vegetal (Tabla 2), divididos en tres grupos principales; promotores de crecimiento:

auxinas, citocininas y giberelinas; inhibidores de crecimiento: ácido abscísico; además del etileno que cuenta con características y efectos específicos (Leopold y Kriedemann, 1975; Gray, 2004). De éste grupo de promotores de crecimiento, las auxinas y las giberelinas tienen la función principal de estimular la elongación celular, por otro lado, las citocininas son las encargadas de estimular la división celular.

Tabla 2. Fitohormonas empleadas en cultivo de tejidos vegetales y sus efectos.

Fitohormonas	Siglas	Nombre	Efectos
Auxinas	AIA	Ac. 3 indolacético	Formación de raíces adventicias (altas concentraciones), formación de brotes adventicios (a bajas concentraciones), inducción de embriones somáticos (embrioides), división celular, formación y crecimiento de callos, inhibición del desarrollo de yemas axilares e inhibición del crecimiento de la raíz.
	ANA	Ac. Naftalenacético	
	AIB	Ac. indol 3-butírico	
	APA	Ac. Fenilacético	
	2,4-D	Ac. 2,4 diclorofenoxiacético	
	2,4,5T	Ac. 2,4,5 triclorofenoxiacético	
	ACP	Ac. Clorofenoxiacético	
Citocininas	Z	Zeatina	Inhibición de la formación de raíces, división celular, formación y crecimiento del callo, estimulación del desarrollo de yemas auxiliares, inhibición del alargamiento de los tallos e inhibición de la senescencia de la hoja.
	ZR	Ribosido de Zeatina	
	IP	Isopenteniladenina	
	TDZ	Thidiazurón	
	IPA	Isopenteniladenosina	
	BAP	6 bencilaminopurina	
	KIN	6 furfurilaminopurina	
	CPPU	N(2-cloro-4piridil)N-fenil urea	
Giberelinas	GA ₃	Ac. Giberélico	Alargamiento del tallo, ruptura de la dormancia de la semilla, embriones somáticos, yemas apicales y bulbos, inhibición de la formación de raíces adventicias y regulación de formación de tubérculos, cormos y bulbos.
	GA ₁	Giberelinas	
	GA ₄		
	GA ₇		
Etileno	---	---	Estimula la senescencia de las hojas, estimula la maduración de los frutos, promueve o inhibe la regeneración adventicia en dependencia del tiempo de aplicación o del genotipo.
Acido abscisico	ABA	---	Maduración de embriones somáticos, facilita la aclimatación, formación de bulbos y tubérculos, además de promover el desarrollo de la dormancia.

Los reguladores de crecimiento vegetal son diferentes entre sí, tanto en sus características químicas, como en su capacidad para inducir respuestas de crecimiento, diferenciación y en muy diversos fenómenos del desarrollo de las plantas, promoviéndolos o inhibiéndolos (Leopold y Kriedemann, 1975; Gray, 2004).

Las auxinas constituyen un grupo de hormonas vegetales que controlan múltiples procesos. En la planta regulan la dominancia apical, la formación de raíces laterales, el desarrollo de tejidos vasculares; así como la división, el alargamiento y la diferenciación celular. Estas hormonas, pueden estimular o inhibir el crecimiento dependiendo de su concentración y localización en la planta (respuestas tejido-específicas). Existen varias auxinas (Figura 4.) como el ácido indol-3-acético (AIA), presente en la mayoría de las plantas de forma natural, así como auxinas producidas de forma sintética, tales como el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido naftalenacético (ANA) y ácido indol butírico (AIB) (Guilfoyle *et al.*, 1998).

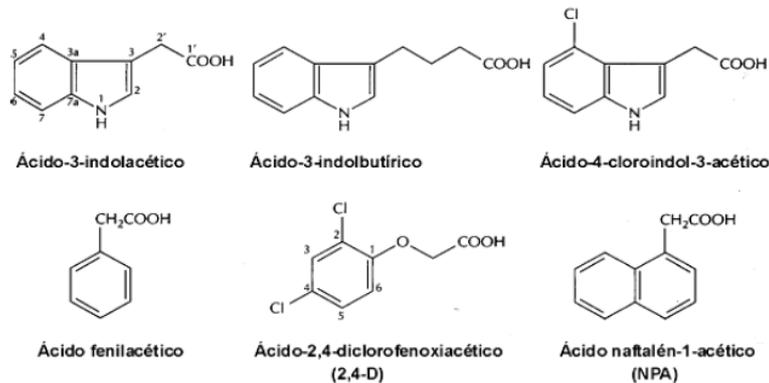


Figura 4. Principales auxinas utilizadas en el cultivo de tejidos vegetales.

Las citocininas por otro lado pueden estimular la división celular o la citocinesis. La mayoría de las citocininas naturales y sintéticas son compuestos derivados de la adenina (Figura 5). Como ocurre con el resto de los reguladores de crecimiento vegetal, las citocininas tienen amplios efectos regulatorios, ya que pueden promover la división celular, promover el crecimiento de raíces laterales, la inhibición de la elongación del tallo, el alargamiento de hojas y pueden actuar en el retraso de la senescencia, la dominancia apical, además de tener un papel fundamental en el proceso de organogénesis (Mock *et al.*, 2000).

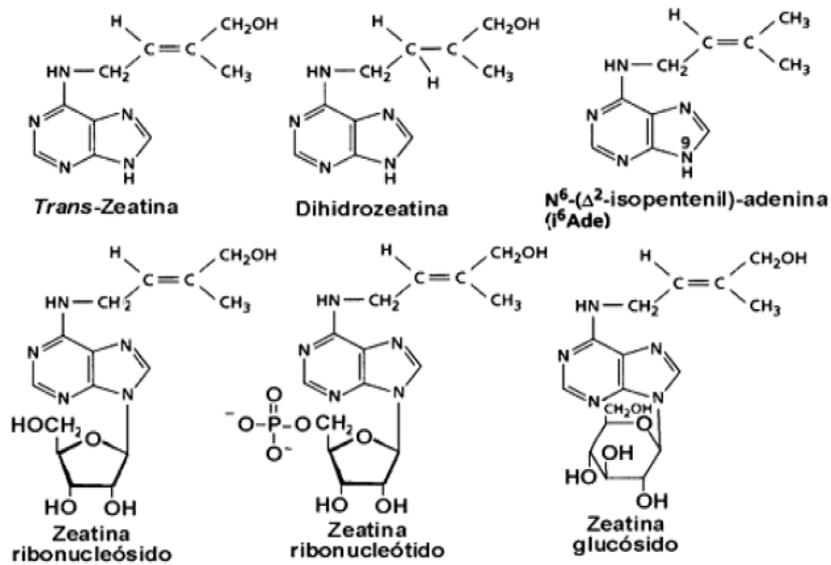


Figura 5. Principales citocininas utilizadas en el cultivo de tejidos vegetales.

Los reguladores de crecimiento vegetal son un elemento fundamental en técnicas de multiplicación masiva como la micropropagación. Esta técnica es utilizada principalmente en especies vegetales de interés ecológico y comercial, tal es el caso del *Agave victoriae-reginae* que tiene alta demanda como especie de ornato, de igual forma el *Agave tequilana weber* tiene una gran importancia dentro de la industria tequilera en México, lo cual sugiere la necesidad de implementar nuevos protocolos que aseguren la utilización sustentable de estas especies para su aprovechamiento de forma industrial y por consecuencia aseguren su supervivencia.

3.1.3. Métodos de micropropagación

3.1.3.1. Organogénesis

La organogénesis es el evento morfogénico mediante el cual se producen órganos tales como raíces y tallos, pero en momentos diferentes. Por el contrario en la embriogénesis somática se producen plantas completas (estructuras bipolares) en un solo evento.

El potencial morfogénico de las plantas se da gracias a la totipotencialidad de las células vegetales para producir un organismo completo.

La organogénesis es la base fundamental de la multiplicación vegetativa o formación de nuevos meristemos y de la producción de plantas *in vitro*. La producción de órganos puede ser directa o indirecta (George, 1993).

3.1.3.2. Organogénesis directa

Este proceso se da en explantes de un grupo cada vez más numeroso de especies vegetales. El tipo de explante, así como la salud y el estado fisiológico de la planta madre (donadora del explante) son factores importantes para el éxito de la propagación. En este tipo de organogénesis, la formación de brotes y/o raíces se da directamente en el explante inicial sin la previa formación del callo. La ausencia del callo en los explantes da un alto porcentaje de seguridad de que los brotes producidos sean idénticos (clones) a la planta madre, siendo por esto un medio de propagación comercial adecuado. Los brotes adventicios se originan principalmente a partir de células epidérmicas del explante, sin embargo, también pueden formarse a partir de células subdermales. La formación de brotes adventicios es frecuentemente acompañada de formación de callo, por lo que es necesario hacer ajustes en las concentraciones de reguladores de crecimiento para evitarlo, ya que su presencia puede dar lugar a la producción de brotes con cambios genéticos (Street, 1979; Vasil y Vasil, 1994).

3.1.3.3. Organogénesis indirecta

Un callo es un tejido desorganizado formado por una masa de células vegetales tumorales debido a que éstas crecen de manera descontrolada. La mayoría de estas células están en estado diferenciado salvo algunas que revierten al estado indiferenciado.

La inducción del callo a partir de una porción vegetal ocurre cuando el explante estéril se pone en contacto con un medio de cultivo que promueva y mantenga un crecimiento y una división celular continuas (Yoeman y Macleod, 1977). En general, las auxinas y los reguladores de crecimiento más usados en el inicio y

mantenimiento del cultivo del callo son el ácido indol-3-acético y ácido 2,4-diclorofenoxiacético, en concentraciones que generalmente oscilan de 0.1 a 10.0 mg/l (Yoeman y Macleod, 1977), encontrándose para cada especie un regulador de crecimiento y concentración óptima para a inducción y mantenimiento del callo. Por lo general, el callo toma de 3 a 8 semanas para alcanzar el tamaño suficiente para efectuar un subcultivo. Un callo puede formar brotes, raíces, embriones o simplemente continuar proliferando como callo, dependiendo ésta orientación de las cantidades relativas de auxinas y citocininas suministradas (Meins, 1986).

Por otra parte, los efectos sinérgicos de los reguladores de crecimiento vegetal pueden ser modificados por otros factores, como son los elementos constituyentes del medio y las condiciones físicas, aunque siempre se manifestará como factor dominante el balance de reguladores de crecimiento vegetal o fitohormonas (Aloni, 1980).

El cultivo de callo se puede dividir en las etapas siguientes:

- a) Inducción. En ésta etapa las células del explante inicial comienzan su crecimiento, tanto en número como en tamaño.
- b) Proliferación celular. Durante esta fase del tejido calloso aumenta su masa celular al máximo.
- c) Inducción de la diferenciación. En esta fase se obtienen meristemas tanto apicales como radiculares, embroides y tejido vascular a partir de la masa celular del callo.
- d) Envejecimiento y pérdida de la capacidad de crecimiento acelerado.

3.1.4. Micropropagación de agaves

La utilización de cultivo de tejidos en el género *Agave*, se ha llevado a cabo principalmente en especies de importancia económica y en especies en peligro de extinción.

El *Agave arizonica* spp. es una especie en peligro de extinción, nativa de Arizona. El cultivo se inició a partir bulbilos en medio Murashige & Skoog (MS) suplementado con 0.3 mg/l de ácido 2,4-diclofenoxiacético, obteniéndose callo en el que posteriormente se desarrollaron brotes en medio suplementado con 1.0 mg/l de 6-bencilaminopurina y 0.1 mg/l de ácido naftalenacético. Dichos brotes fueron enraizados en un medio libre de reguladores de crecimiento vegetal. Una vez en invernadero, se obtuvo 90% de sobrevivencia de las plantas (Powers y Backhaus, 1989).

Madrigal-Lugo y colaboradores, reportaron en 1989 organogénesis y enraizamiento de brotes en *Agave atrovirens* Karw, en un medio con sales inorgánicas MS, 30 g/l de sacarosa, 0.4 mg/l de tiamina y 10 mg/l de inositol.

En 1990 se obtuvieron brotes en *Agave cantala* Rob, esto a partir de rizomas en medio MS, 2% de sacarosa como fuente de carbono, 10% de agua de coco y suplementado con más de 120 concentraciones de auxinas como 2,4-D, AIA, ANA y ácido indol butírico (AIB), además de citocininas tales como cinetina (KIN), bencil aminopurina (BAP) y zeatina a distintas concentraciones (0.01-10 mg/l), en la combinación de 0.075 mg/l de ANA, 0.1 mg/l de AIB se obtuvieron los brotes que posteriormente fueron enraizados en medio MS sin reguladores de crecimiento vegetal (Binh *et al.*, 1990).

En 1987 se reportó que el balance en la concentración de NO_3 y NH_4 en el medio de cultivo es un factor importante para la obtención de callo y organogénesis en *Agave fourcroydes* (Robert *et al.*, 1987). La producción indirecta de brotes se logró en medio SH (Shenk y Hildebrant, 1972) modificado (5 mM de KNO_3 y 10 mM de NH_4NO_3) con 0.25 mg/l de 2,4-D y 10 mg/l de BAP. La proliferación de brotes ocurrió en la parte basal de los brotes sembrados, aparentemente por proliferación de yemas laterales. Por otro lado, en medio MS (5 mM de KNO_3 y 18 mM de NH_4NO_3) suplementado con 0.25 mg/l de 2,4-D y 1.0 mg/l de BAP se obtuvo producción de callo, sin embargo, con 0.25 mg/l de 2,4-D y 10 mg/l de BAP lograron organogénesis directa, es decir, sin la formación intermedia de callo. El enraizamiento de los brotes,

producidos directa e indirectamente se logró en medio MS (5 mM de KNO₃ y 18 mM de NH₄NO₃) suplementado con 0.25 mg/l de 2,4-D.

En 1989 se consiguió la producción de callo a partir de rizomas y tallos en medio suplementado con 0.1 mg/l de BAP y 3 mg/l de AIB, posteriormente éste callo fue resembrado en medio con 0.2 mg/l de 2,4-D y 0.1 mg/l de KIN donde se desarrollaron brotes. El enraizamiento de estos brotes se llevó a cabo en medio suplementado con 0.2 mg/l de AIA, con una intensidad de luz de 10,000 lux (Madrigal-Lugo *et al.*, 1989)

El procedimiento reportado por Binh en 1990 para *Agave cantala* fue probado para *Agave fourcroydes* y posteriormente para *Agave sisalana*, observándose los mismos resultados reportados para el caso del *Agave fourcroydes*.

La micropropagación de *Agave shidigera* Lem se realizó a partir de hijuelos en medio MS suplementado con vitaminas L2 reportadas por Phillips y Collins en 1979, además de la adición de 5 mg/l de KIN y 0.02 mg/l de ANA.

Por otra parte, Das en 1992 obtuvo la propagación a partir de hojas e hijuelos rizomatosos en los medios Murashige & Skoog y Shenk & Hildebrandt (SH), ambos suplementados con vitaminas MS, 5 y 10 mg/l de BAP. En el medio MS el tejido resultó necrótico y en medio SH las regiones nodulares se mantuvieron de un color verdoso después de 60 días. Estas regiones verdes se resembraron en el mismo medio durante 60 días y posteriormente fueron transferidas al medio SH con la adición de 0.5 y 1.0 mg/l de BAP, donde se desarrolló la proliferación de yemas axilares. Estas yemas fueron enraizadas en medio SH con 1% de sacarosa y libre de reguladores de crecimiento vegetal. A diferencia de todos los reportes donde se menciona la propagación *in vitro* de especies del genero *Agave*, que utilizan diferentes concentraciones y combinaciones de auxinas y citocininas, en esta especie, fueron suficientes únicamente concentraciones de citocinina (Das,1992).

Aún cuando Groenewald no mencionó la especie de agave con la que trabajó, reporta que a partir de fragmentos de semillas, obtuvo organogénesis indirecta en

medio Linsmaier y Skoog (LS) con concentraciones relativamente altas de 2,4-D y KIN. La producción de callo se dio con 1 mg/l de 2,4-D y 5 mg/l de KIN, este callo fue transferido al medio LS con 0.2 mg/l de 2,4-D y 1 mg/l de KIN, donde se produjo la organogénesis (Groenewald *et al.*, 1977).

Tallos de *Agave tequilana* Weber se utilizaron como fuentes de explante en el desarrollo de proliferación de yemas axilares. Se utilizó el medio MS con las concentraciones de KNO₃ y NH₄NO₃ modificadas, al medio se le adicionaron 10 mg/l de BAP y 0.025 mg/l de 2,4-D, estos brotes fueron utilizados para realizar experimentos para la reducción de la vitrificación (Castro-Concha *et al.*, 1990). Por otro lado, se ha obtenido organogénesis somática en medio MS (sin modificar las concentraciones de NO₃ y NH₄) con vitaminas L2 y adicionando 10 mg/l de BAP y 0.025 de 2,4-D. estas concentraciones de reguladores de crecimiento vegetal fueron reportadas para *Agave fourcroydes* y *Agave tequilana*.

El crecimiento de brotes adventicios en *Agave atrovirens* fue logrado utilizando 1 mg/l de BA, 1 mg/l de KIN, y 2 mg/l AIA, además de utilizar yemas axilares como explante. Utilizando 2 mg/l de ANA y 0.1 mg/l KIN sobre tejido de cambium vascular, se observó la formación de callo verde, que posteriormente en presencia de 1 mg/l de KIN y 1 mg/l de AIA se obtuvo la formación de brotes. Para el enraizamiento, se empleó el medio MS sin reguladores de crecimiento vegetal (Villalobos *et al.*, 1993).

La proliferación de yemas axilares en *Agave victoriae-reginae* a partir de embriones somáticos, se obtuvo en medio MS con vitaminas L2. La concentración de NH₄NO₃ fue reducida a 5 mM y se utilizó una ventana de papel filtro, para evitar la vitrificación. Este medio fue suplementado con 1 mg/l de KIN y 0.3 mg/l de ANA (Rodríguez-Garay *et al.*, 1996).

En 1997 se realizaron estudios con *Agave sisalana* a partir de explantes de tallo de bulbo y rizoma, usando 0.5 mg/l de ANA y 1.5 mg/l de BA obtuvieron callos, de los cuales generaron brotes en medio MS con 0.5 mg/l de KIN. Así mismo, utilizando 0.5 mg/l de KIN lograron obtener brotes directos en los dos tipos de explante. La BA no

fue efectiva para inducir brotes a partir de callo, a diferencia de la KIN (Nikam *et al.*, 1997).

Otro resultado exitoso para la regeneración de agave *in vitro* se presentó en el *Agave parrasana* Berger, donde se logró obtener brotes a partir de callos generados de hojas jóvenes, utilizando 6 y 12 mg/l de BA y con una combinación de 3, 6, 9 y 12 mg/l de BA y 0.008 mg/l de 2,4-D (Santacruz *et al.*, 1999).

Hazra en 2002 utilizó hojas jóvenes y maduras de agave, además de rizoma con tres medios de cultivo diferentes, MS, MS modificado (concentración de nitrógeno inorgánico) y MS con hidrolizado de caseína. Para la obtención de callo utilizaron 2 mg/l de 2,4-D y 1 mg/l de KIN. En los 3 medios hubo respuesta callogénica, además de formación de brotes en callo con 4 y 6 mg/l de BAP en los explantes de hojas jóvenes y rizoma.

Para la micropropagación de *Agave victoriae-reginae* fueron utilizados hojas y tallos jóvenes como fuente de explante en medio MS. Con las hojas no se obtuvo callo organogénico, a diferencia del tallo en medio MS y con 0.5 mg/l de 2,4-D donde si se presentó la respuesta embriogénica. Para la generación de brotes, utilizaron medio MS y 0.5-2mg/l de BA y medio sin reguladores de crecimiento vegetal (Martínez-Palacios *et al.*, 2003).

Para el caso del *Agave angustifolia*, se logró obtener brotes directos con el uso de tejidos de médula-tallo en medio MS con 1mg/l de BA (Enríquez *et al.*, 2005).

Toribio-Romero en 2005 trabajó con *Agave atrovirens* reportó la formación de callo hasta un 87.5%, utilizando como explante la base de la hoja de plantas de dos años de edad y 1.5 mg/l de 2,4-D y 1.5 mg/l de BAP. Además reportó respuesta organogénica con hasta 12 brotes por explante, utilizando 2 mg/l de BAP y 1 mg/l de KIN en medio MS.

La organogénesis indirecta fue desarrollada en el *A. tequilana*, con el uso de hoja y tejido meristemático como fuente de explante, los cuales fueron extraídos de la parte central de la piña del agave. El mejor crecimiento de los callos se dio con ANA, en

comparación con 2,4-D. La rediferenciación de los callos fue obtenida con 0.25 mg/l de 2,4-D y 10 mg/l de BAP. Los brotes fueron enraizados en medio MS libre de reguladores de crecimiento vegetal (Valenzuela *et al.*, 2006).

Delgado-Balbuena en 2007 reportó para *Agave atrovirens* la formación de callo a partir de explantes de hoja en concentraciones de 0.25 mg/l de 2,4-D y 1 mg/l de BAP, a partir de tejido meristemático con 1mg/l de BAP o 1 mg/l de KIN. De igual forma reportó el uso de antioxidantes, tales como el citrato de sodio al 0.5% y nitrógeno en concentraciones de 1.6 g/l y 1.9 g/l. Las yemas laterales y el callo formado del tejido meristemático formaron brotes en presencia de 1 mg/l de BAP o 1 mg/l de KIN o 1 y 3 mg/l de tidiazurón (TDZ).

Portillo y colaboradores en 2007 reportaron para *Agave tequilana* Weber cultivar azul, la inducción de embriones somáticos en medio MS suplementado con vitaminas L2 y la adición de las citocininas BA, TDZ y KIN, combinadas con la auxina 2,4-D. La fuente de explante fueron semillas y brotes rizomatosos. En relación a germinación de embriones somáticos reportan una eficiencia de 95-100% de conversión a plántulas establecidas.

Finalmente Romero-Tepal en 2009 reporta haber utilizado semillas y la base de hoja de plantas jóvenes de *Agave atrovirens* como fuente de explante. Obtuvo la formación de brotes (hasta 40%) con cuatro formulaciones: 6 mg/l de BAP; 0.02 mg/l de 2,4-D y 6 mg/l de BAP; 1.5 mg/l de ANA y 1 mg/l de KIN y sin reguladores de crecimiento vegetal. Para el enraizamiento, el medio MS con 50% de concentración de sales adicionado con 2.85 μ M de AIA y 10% de sacarosa fue el óptimo.

3.1.5. Embriogénesis somática

Haberlandt en 1921 fue el primero en declarar que era posible hacer crecer en forma artificial embriones originados de células vegetativas (Krikorian *et al.*, 1969), basado en la teoría celular de Schwann y Schleiden. Él consideró a cada célula como un organismo elemental y estaba convencido de la totipotencia de las células diferenciadas. Sus experimentos de cultivos con células aisladas de hoja sientan los fundamentos del cultivo *in vitro* en general. Sin embargo, no fue hasta 1958 que

los embriones somáticos fueron detectados y reconocidos como tales en cultivos *in vitro* gracias a los trabajos independientes de Reinerth, Steward y colaboradores en cultivos derivados de explantes multicelulares de *Daucus carota* (Kohlenbach, 1985).

Uno de los ejemplos más extremos de flexibilidad en el desarrollo de las plantas, es la capacidad de algunas células (además de los cigotos) de iniciar el desarrollo embrionario (Fehér *et al.*, 2003). La embriogénesis somática es definida como un proceso en el cual una estructura bipolar, con un eje radical y uno apical, semejante a un embrión cigótico, se desarrolla de una célula somática sin conexión vascular con el tejido original. Estas estructuras son capaces de crecer y formar plantas normales (Litz y Jarret, 1991; Arnold *et al.*, 2002).

Un embrión puede ser definido como el más temprano estado multicelular reconocible de un individuo que ocurre antes de que se hayan desarrollado las estructuras u órganos característicos de una especie dada. Los embriones somáticos, asexuales o adventicios son los iniciados a partir de células que no son el producto de la fusión de gametos (Gray, 2000).

La zanahoria (*Daucus carota*) fue la primera especie en que la embriogénesis somática *in vitro* fue reportada; en los años siguientes muchas especies de angiospermas y gimnospermas han sido adicionadas a la lista de éxitos (Gray, 2000).

Sannasgala en 1989 señaló que las características del embrión somático son que tiene autonomía frente al tejido generador (protegido generalmente por una epidermis), es una estructura bipolar con un ápice radical y apical y cotiledonales, además de que presenta bandas procambiales entre los ápices.

Según Halperin en 1995, dos condiciones tienen que ser satisfechas para que ocurra la embriogénesis, la primera es que las células especializadas tienen que estar separadas del tejido adyacente, tal que sea una célula simple. La segunda es que las células especializadas tienen que estar rodeadas de medio de cultivo que contenga los nutrientes necesarios para el crecimiento del embrión.

El desarrollo de un sistema experimental para la regeneración de plantas vía embriogénesis somática incluye los siguientes pasos:

- Inducción de los embriones somáticos.
- Desarrollo de los embriones somáticos
- Proliferación
- Maduración
- Germinación y conversión en plantas

La Inducción del proceso consiste en la terminación del patrón de expresión de los genes presentes en el tejido del explante; siendo reemplazado por un programa de expresión del gen o genes de la embriogénesis en aquellas células del tejido del explante, los cuales pudieran dar lugar a embriones somáticos (Gómez, 1998).

La inducción del estado embriogénico incluye la inducción de los mismos mecanismos genéticos que conllevan a la embriogénesis cigótica. Contrariamente a los embriones cigóticos los embriones somáticos no contienen un nuevo grupo de genes sino que poseen la misma combinación genética de la planta fuente de explante. (Gómez, 1998). El empleo de la auxina es la mejor manera de inducir la formación de células embriogénicas desde células somáticas. La inducción de la división celular como una respuesta a esta auxina puede resultar en un callo con crecimiento desorganizado o bien en un crecimiento polarizado coordinado para la formación de un embrión (Gómez, 1998).

Durante el desarrollo la etapa temprana o preglobular de los embriones somáticos son fácilmente reconocidos generalmente por el contenido de citoplasma denso y la ausencia general de vacuolización (Krikorian, 1995). Durante esta fase las auxinas son inhibitorias para el desarrollo de los agregados celulares embriogénicos a embriones (Halperin, 1995).

En la etapa de proliferación uno de los más poderosos aspectos de la embriogénesis somática que permite su aplicación en la propagación masiva y la transferencia de genes es la habilidad de los cultivos embriogénicos de muchas

especies de plantas a proliferar o multiplicarse indefinidamente (Merkle *et al.*, 1995). El factor más fuerte asociado con la proliferación continua de las células embriogénicas es la auxina. Sin embargo parece ser que el efecto de esta fitohormona no puede ser considerado independiente a la reducción de la concentración de nitrógeno, existiendo una fuerte evidencia de la interacción entre ambos (Gómez, 1998). Además el nivel de auxina necesario para mantener la embriogénesis repetitiva varía de acuerdo a la especie (Merkle *et al.*, 1995).

La maduración es el período en el que el embrión somático sufre expansión de sus células, y la acumulación de sustancias de reserva (Gómez, 1998). En esta etapa juega un papel fundamental la presencia de nitrógeno en el medio de cultivo, siendo necesario el suplemento con nitratos, amonio, aminoácidos y caseína hidrolizada. Los carbohidratos entre ellos la sacarosa en concentraciones de 3-6% son esenciales, junto a bajas concentraciones de oxígeno en el medio, lo cual permite una maduración total y evita la germinación precoz (Merkle *et al.*, 1995).

Varios cambios ocurren durante la embriogénesis somática, los cuales reprograman una célula somática a un estado de célula embriogénica. Un posible mecanismo para regular la expresión de los genes es la metilación del DNA, que se ha encontrado, está correlacionado con la cantidad de auxina exógena. (Merkle *et al.*, 1995).

3.1.6 Embriogénesis directa e indirecta

Los tratamientos para la obtención de la embriogénesis somática dependen si el tejido del explante está formado de células somáticas determinadas proembriogénicas ó células somáticas no embriogénicas, términos que fueron planteados por Evans y colaboradores en 1981.

Si el tejido del explante está formado de células somáticas determinadas un estímulo de la división celular puede ser suficiente para la formación de un embrión somático a partir del tejido del explante (Merkle *et al.*, 1995). Este proceso es llamado comúnmente embriogénesis directa. Los explantes con este tipo de

embriogénesis experimentan un mínimo de proliferación antes de formar los embriones somáticos, formándose en explantes en que todas o algunas de las células están predeterminadas como células embriogénicas, por haber retenido alguna de las propiedades de las células meristemáticas parentales de las que derivaron (Halperin, 1995).

En el caso de embriogénesis indirecta, las células no embriogénicas tienen que llevar a cabo varias divisiones mitóticas en la presencia de una auxina durante la inducción al estado de células embriogénicas, formándose los callos. En este proceso la fase de formación de callo se interpone entre el explante original y la aparición de embriones somáticos. (Merkle *et al.*, 1995). Según Halperin en 1995, este tipo de embriogénesis es característica de órganos maduros en que las células tienen que pasar por varios ciclos celulares para lograr la embriogénesis a determinadas condiciones. Los términos embriogénesis directa e indirecta no indican necesariamente diferencias fundamentales en las células involucradas.

4. JUSTIFICACIÓN

A partir de la caída de la industria pulquera en los años 70's las poblaciones del maguey pulquero (*Agave atrovirens*) han disminuido drásticamente, esto a pesar de su gran importancia en México, específicamente en la zona central del país, donde los estados de Hidalgo, Tlaxcala y Puebla son los mayores productores del país. Esta situación se ha venido presentando debido al cambio de uso de suelo, así como a un manejo inadecuado que se le ha dado al mismo en los últimos años, ocasionando que el número de agaves se redujera considerablemente. Debido a esto es necesario implementar técnicas que permitan la regeneración y multiplicación masiva de esta especie, para de esta forma asegurar su conservación, además de contar con materia prima para abastecer la creciente demanda de la industria pulquera.

La recuperación económica de la industria basada en pulque requiere plantaciones uniformes con características bien establecidas. Lo anterior es posible mediante la utilización de herramientas biotecnológicas, tales como la micropropagación que permite la inducción de embriones somáticos *in vitro*, ya que de esta forma se permite la obtención de plantas sanas, libres de plagas y así la multiplicación masiva de la especie.

Por lo anterior es importante evaluar diferentes tipos y concentraciones de reguladores de crecimiento, condiciones de luz, medios de cultivo y diferentes explantes que pueden inducir la embriogénesis somática en plantas que presentan dificultad en los procesos de propagación como lo es el agave pulquero.

5. HIPÓTESIS

El tipo de tejido como fuente explante, los reguladores de crecimiento vegetal tales como el 2,4-D, ANA, AIA, KN, 6-BAP y TDZ, los medios de cultivo MS y AE, así como las condiciones de luz tienen un efecto para la inducción y desarrollo de embriones somáticos en explantes de *Agave atrovirens* Karw. Ex Salm-Dyck.

6. OBJETIVO GENERAL

Inducir la embriogénesis somática en *Agave atrovirens* Karw. Ex Salm-Dyck en cultivo *in vitro*.

6.1 Objetivos Específicos

-Evaluar el potencial de la hoja de plántulas germinadas *in vitro*, así como de la hoja de plantas colectadas en campo como explante para la regeneración vía embriogénesis somática.

-Determinar el medio de cultivo y la concentración de reguladores de crecimiento vegetal para la inducción de embriones somáticos *in vitro* de *Agave atrovirens* utilizando 2,4-D, ANA, AIA, KN, 6-BAP y TDZ.

-Determinar el efecto de la luz y la ausencia de la misma sobre la respuesta embriogénica esperada.

-Establecer la concentración de 2,4-D adecuada para la inducción de embriogénesis somática directa en medio MS en condiciones de fotoperiodo.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

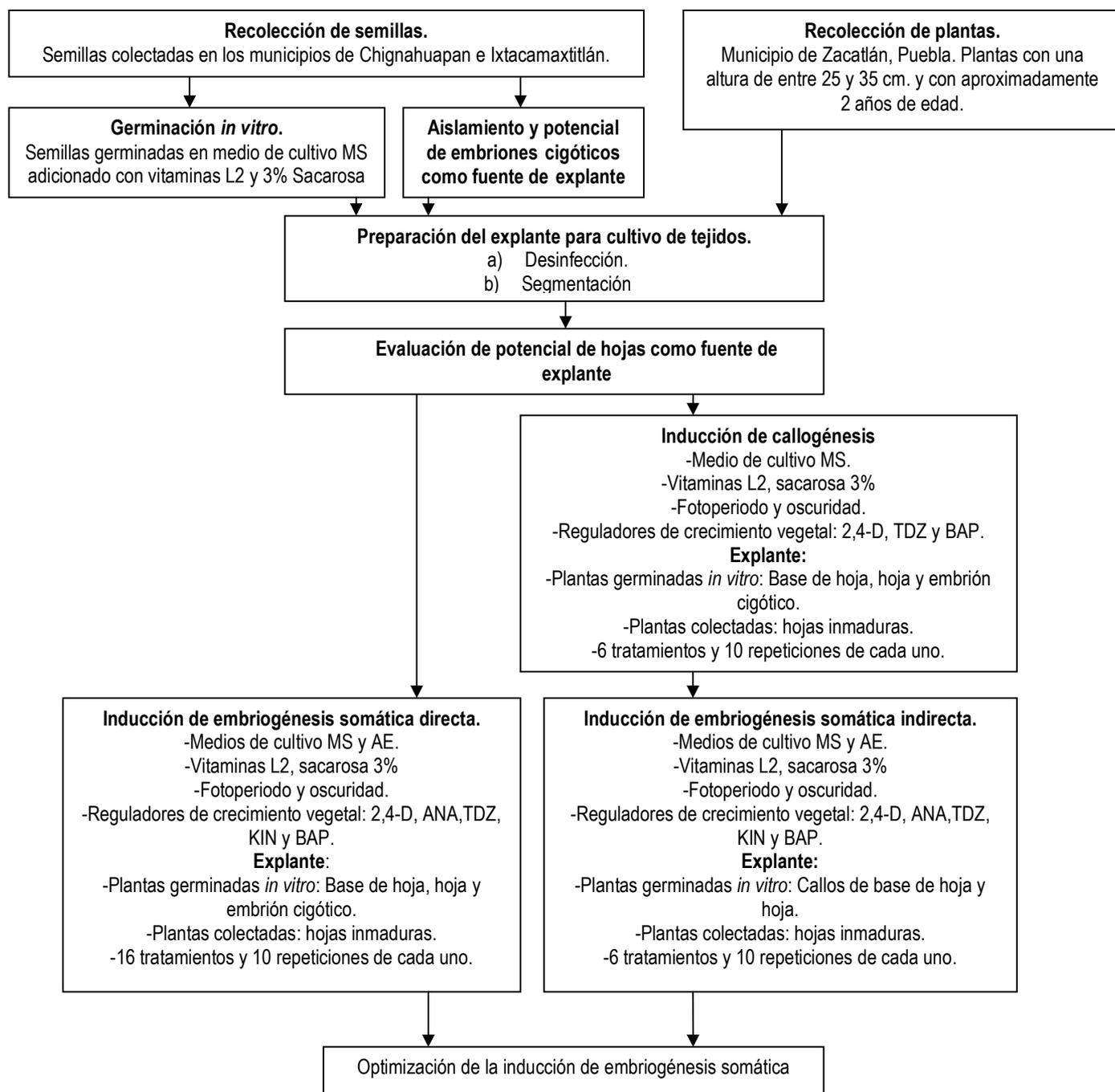


Figura 6. Diagrama de materiales y métodos para la inducción de embriogénesis somática en *Agave atrovirens*.

7.1 Recolección de semillas y plantas

Se colectaron semillas de agaves en los municipios de Ixtacamaxtitlán y Chignahuapan, Puebla; así como hojas inmaduras de agave en el municipio de Zacatlán, Puebla.

Las plantas donantes se seleccionaron de acuerdo a su estado de sanidad y vigor. Para la sanidad se revisó que la planta no presentara algún tipo de infección causada por fitopatógenos, tanto en la zona aérea, como en la raíz. Así mismo, el estado de vigor de la planta se determinó observando que la parte aérea no presentara daño mecánico y estrés causado por factores físicos y químicos.

Las semillas fueron colectadas en el mes de julio para posteriormente ser germinadas y obtener plántulas. De igual forma se aislaron embriones cigóticos a partir de dichas semillas para evaluar su viabilidad como fuente de explante en medio MS.

Se colectaron plantas de agave eligiendo las más sanas, vigorosas y libres de cualquier daño mecánico en el municipio de Zacatlán, Puebla. Las plantas de agave colectadas contaban con entre 25 y 35 cm. de altura y aproximadamente 2 años de edad.

7.2. Germinación *in vitro* de semillas colectadas y preparación del explante

Las semillas fueron lavadas con detergente y posteriormente fueron esterilizadas superficialmente con una solución de cloro comercial al 10% v/v (1.5% de cloro activo) por 20 minutos y una solución de etanol al 70% por 1 minuto. Las semillas se enjuagaron 3 veces con agua desmineralizada estéril después de ser sumergidas en cada una de las soluciones.

Se utilizaron semillas colectadas en los municipios de Ixtacamaxtitlán y Chignahuapan, procedentes de distintas plantas que fueron clasificadas de la siguiente forma: Ixtacamaxtitlán: B, E, K Q y R, Chignahuapan: 1 y 4. Se aplicaron dos distintos tratamientos independientemente del testigo (T) a cada una de las procedencias de las semillas. El primer tratamiento (I) consistió en mantener las

semillas en refrigeración a 4 °C por 24 horas antes de agregarlas al medio de cultivo para germinar. En el segundo tratamiento (IV) las semillas se mantuvieron en refrigeración a 4 °C por 96 horas consecutivas antes de ser puestas en las cajas de germinación. Cada tratamiento tuvo un total de 60 semillas. Posteriormente se colocaron en medio de cultivo MS adicionado con vitaminas L2 y 3% de sacarosa. Finalmente se incubaron a 25±2 °C en condiciones de fotoperiodo (16 h. luz / 8 h. oscuridad).

A partir de estas plántulas de aproximadamente 60 días se aislaron dos tipos de explante, la base de hoja (tejido sin pigmentación) y la hoja. Se utilizó la campana de flujo laminar para trabajar en condiciones asépticas y cortar cada una de las hojas en cuatro segmentos de aproximadamente 1 cm. por 1 cm, dos segmentos del tejido próximo a la base de la hoja, y dos segmentos de la parte central de la hoja, diferenciando de esta forma los dos tipos de explante a partir de la misma hoja.

7.3. Aislamiento y potencial de embriones cigóticos como explante

El aislamiento de embriones cigóticos se llevó a cabo mediante la hidratación de la semilla con agua desmineralizada estéril durante 40 minutos a 25°C. Se desprendió la testa de la semilla con ayuda de pinzas de disección y bisturí de disección en el estereoscopio. Los embriones aislados se sometieron a pruebas de viabilidad en medio de cultivo MS y AE, adicionados con vitaminas L2, 3% de sacarosa y reguladores de crecimiento vegetal, en condiciones de fotoperiodo 16 horas luz / 8 oscuridad y en completa oscuridad, así como con las concentraciones de reguladores de crecimiento vegetal establecidos para inducción de embriogénesis somática directa (Groenewald *et al.*, 1977; Nikam, 1997; Portillo *et al.*, 2007), realizando 10 repeticiones por tratamiento (Tabla 3).

Tabla 3. Tratamientos aplicados para la inducción de embriogénesis somática directa en los medios de cultivo MS y AE en condiciones de fotoperiodo (16 h. luz / 8 h. oscuridad) y oscuridad.

<i>Tratamiento</i>	<i>Explante</i>	<i>2,4-D mg/L</i>	<i>ANA mg/L</i>	<i>TDZ mg/L</i>	<i>KIN mg/L</i>
C1	Base	-	-	-	-
C2	Hoja	-	-	-	-
T1	Base	0.125	-	-	-
T2	Hoja	0.125	-	-	-
T3	Base	0.25	-	-	-
T4	Hoja	0.25	-	-	-
T5	Base	0.5	-	-	-
T6	Hoja	0.5	-	-	-
T7	Base	1.0	-	-	-
T8	Hoja	1.0	-	-	-
T9	Base	2.0	-	-	-
T10	Hoja	2.0	-	-	-
T11	Base	-	0.5	-	1.0
T12	Hoja	-	0.5	-	1.0
T13	Base	0.25	-	0.025	-
T14	Hoja	0.25	-	0.025	-
T15	Hoja	0.25	-	0.25	-
T16	Base	0.25	-	0.25	-

Los parámetros evaluados para determinar el potencial de embriones cigóticos como explante fueron:

- a) Tipo de respuesta: callogénesis, organogénesis o embriogénesis.
- b) Velocidad de respuesta: Tiempo en días en que se presenta la respuesta.
- c) Oxidación: Presencia o ausencia de oxidación en los explantes.
- d) Necrosis: Muerte del explante.

7.4 Potencial de hojas como fuente de explante

Las plantas colectadas en campo se enjuagaron con agua corriente, se deshojaron y se eligieron en promedio 3 hojas jóvenes por planta como fuente de explante. Estas hojas fueron esterilizadas superficialmente con una solución de cloro comercial al 15% v/v por 20 minutos en agitación continua, para posteriormente ser enjuagadas 3 veces con agua desmineralizada estéril y enseguida ser sumergidas en etanol al 70% por 1 minuto y de igual forma fueron enjuagadas 3 veces con agua desmineralizada estéril.

Se utilizó la campana de flujo laminar para cortar en condiciones asépticas cada una de las hojas en cuatro segmentos de aproximadamente 1.5 cm. por 1.5 cm.

Únicamente se utilizaron las hojas jóvenes que se encuentran próximas al meristemo y que aún carecen de tejido fotosintético.

Se evaluó el potencial como explante de la base de hoja y la hoja de plántulas germinadas *in vitro*, así como de hojas inmaduras de plantas colectadas en campo. Los parámetros de la evaluación para las hojas de agave constó en medir el porcentaje de tratamientos con respuesta callogénica, así como la velocidad de inducción de dicha respuesta, al ser esta última mucho más rápida (días) en comparación con la respuesta embriogénica (semanas).

Los explantes fueron cultivados en medio MS, en condiciones de fotoperiodo (16 h. luz / 8 h. oscuridad) con una intensidad luminosa de 2,400 lux y en completa oscuridad a 25 ± 2 °C. Se utilizaron 16 tratamientos (Tabla 3) con diez repeticiones cada uno.

7.5 Inducción de respuestas específicas

7.5.1 Inducción de embriogénesis somática directa

Se evaluaron cuatro tipos de reguladores de crecimiento vegetal, así como la base de la hoja y la hoja de planta cultivada *in vitro* como fuente de explante (Groenewald *et al.*, 1977; Nikam *et al.*, 1997; Nikam *et al.*, 2003; Portillo *et al.*, 2007). Las auxinas utilizadas fueron 2,4-D y ANA, así como las citocininas TDZ y KIN (Tabla 3). Se establecieron los cultivos en medio MS en condiciones de fotoperiodo (16 h. luz / 8 h. oscuridad) con una intensidad luminosa de 2,400 lux y en completa oscuridad, esto a una temperatura de 25 ± 2 °C.

Después de diez días del cultivo de los explantes se evaluaron los porcentajes de establecimiento del cultivo y el porcentaje de respuesta callogénica, posteriormente a las diez semanas se evaluó el porcentaje de respuesta embriogénica para cada uno de los 16 tratamientos, mismos que contaron con diez repeticiones.

7.5.2. Inducción de callogénesis

Se analizaron tres tipos de reguladores de crecimiento vegetal reportados por Delgado-Balbuena (2007) y Romero-Tepal (2009) como excelentes inductores de callogénesis: 2,4-D, TDZ y 6-BAP. Se establecieron los cultivos utilizando como fuente de explante base de hoja y hoja (Tabla 4), cultivados en medio MS y en un fotoperiodo (16 h. luz / 8 h. oscuridad) con una intensidad luminosa de 2,400 lux y en total oscuridad a una temperatura de 25 ± 2 °C. Cada uno de los 6 tratamientos constó de diez repeticiones.

7.5.3. Inducción de embriogénesis somática indirecta

Se analizaron cuatro tipos de reguladores de crecimiento vegetal: las auxinas 2,4-D y ANA, así como las citocininas 6-BAP y KIN (Tabla 5). Los cultivos se establecieron en medio MS en condiciones de fotoperiodo (16 h. luz / 8 h. oscuridad) con una intensidad luminosa de 2,400 lux y en completa oscuridad, esto a una temperatura de 25 ± 2 °C. Los explantes utilizados fueron de base de hoja y hoja. Se realizaron 10 repeticiones por cada tratamiento (Portillo *et al.*, 2007; Martínez-Palacios *et al.*, 2003; Delgado-Balbuena, 2007; Romero-Tepal, 2009).

Para la inducción de embriones somáticos a partir de callos se utilizaron concentraciones reportadas por Nikam en 2003 (0.25 mg/l ANA y 1.5 mg/l de KIN) y Portillo en 2007 (0.25 mg/l de 2,4-D y 1.5 mg/l de 6-BAP).

Tabla 4. Tratamientos aplicados para la inducción callogénica en los medios de cultivo MS y AE en condiciones de fotoperiodo (16 h. luz / 8 h. oscuridad) y oscuridad.

Tratamiento	Explante	2,4-D mg/L	TDZ mg/L	6-BAP mg/L
C1	Base de hoja	-	-	-
C2	Hoja	-	-	-
G1	Base de hoja	0.25	0.25	-
G2	Hoja	0.25	0.25	-
G3	Base de hoja	0.25	-	1.0
G4	Hoja	0.25	-	1.0
G5	Base de hoja	1.0	-	1.0
G6	Hoja	1.0	-	1.0

Tabla 5. Tratamientos aplicados para la inducción de embriogénesis somática indirecta en los medios de cultivo MS y AE en condiciones de fotoperiodo (16 h. luz / 8 h. oscuridad) y oscuridad.

Tratamiento	Explante	2,4-D mg/L	ANA mg/L	6-BAP mg/L	KIN mg/L
I1	Hoja	0.25	0.25	1.5	1.5
I2	Base de hoja	0.25	0.25	1.5	1.5
I3	Hoja	0.25	0.25	1.5	1.5
I4	Base de hoja	0.25	0.25	1.5	1.5
I5	Hoja	0.25	0.25	1.5	1.5
I6	Base de hoja	0.25	0.25	1.5	1.5

7.6 Optimización de la inducción de embriogénesis somática

Los cultivos se monitorearon cada 48 horas. Se registro el tipo de respuesta, oxidación y necrosis de los explantes. Dichas observaciones se realizaron con ayuda del estereoscopio con un aumento de 1.5 X.

En base al desarrollo de los explantes y conforme se iba consumiendo el medio de cultivo, se realizaban las resiembras y trasplantes, en promedio cada 3 meses. Posteriormente se utilizó el rango de concentraciones que había inducido la respuesta embriogénica en medio MS en condiciones de fotoperiodo, es decir 0.125 y 0.25 mg/L de 2,4-D en los tratamientos T1, T2, T3 y T4, generando tratamientos dentro de dicho rango como se muestra en la tabla 6.

Tabla 6. Tratamientos aplicados para la optimización de la inducción de embriogénesis somática en medio de cultivo MS en condiciones de fotoperiodo (16 h. luz y 8 h. oscuridad).

Tratamiento	Explante	2,4-D mg/L
E1	Base	0.12
E2	Hoja	0.12
E3	Base	0.16
E4	Hoja	0.16
E5	Base	0.20
E6	Hoja	0.20
E7	Base	0.24
E8	Hoja	0.24
E9	Base	0.28
E10	Hoja	0.28

7.7 Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevo a cabo utilizando el programa SPSS versión 18.0. Se realizó una prueba de ANOVA para comparar los resultados, mismos que se analizaron con la prueba de Duncan con un nivel de significancia de 0.05.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Germinación *in vitro* de semillas colectadas y preparación del explante

En los tratamientos testigo se observó que el mayor número de semillas germinadas se presentó en el tratamiento TR con 49 semillas que equivale al 81.66%, seguido por el T4 con 35 semillas que es igual al 56.66%. Por el contrario los tratamientos con porcentajes más bajos fueron el TE con apenas 9 semillas que representa el 15% y TK con 12 semillas que equivale al 20% (Figura 7).

En los tratamientos testigo se obtuvo un promedio de semillas germinadas de 23.14 semillas y un porcentaje promedio de 38.33% de germinación para estos tratamientos testigo.

En los tratamientos I destacaron los tratamientos IR y IQ con un porcentaje de germinación del 63.33% y 55% respectivamente. Sin embargo, en los tratamientos IE y IQ se observaron porcentajes de 18.33% y 20% respectivamente (Figura 8).

El porcentaje promedio de los tratamientos I fue de 41.66%.

En los tratamientos IVR y IV4, los porcentajes observados fueron del 80% y 68.33% respectivamente, siendo los más eficientes en cuanto al porcentaje de germinación. Por otro lado, los tratamientos IVK y IVE fueron los más deficientes presentando un 20% y 18.33% respectivamente (Figura 9). Se obtuvo un porcentaje promedio en los tratamientos IV de 46.90%.

Los tratamientos en general con mayor porcentaje de germinación fueron TR, IVR y IV4, siendo el TR el más alto con el 81.66%. Los porcentajes más bajos se presentaron en todos los casos donde la procedencia era E y K, siendo el más bajo el TE con el 15% de germinación.

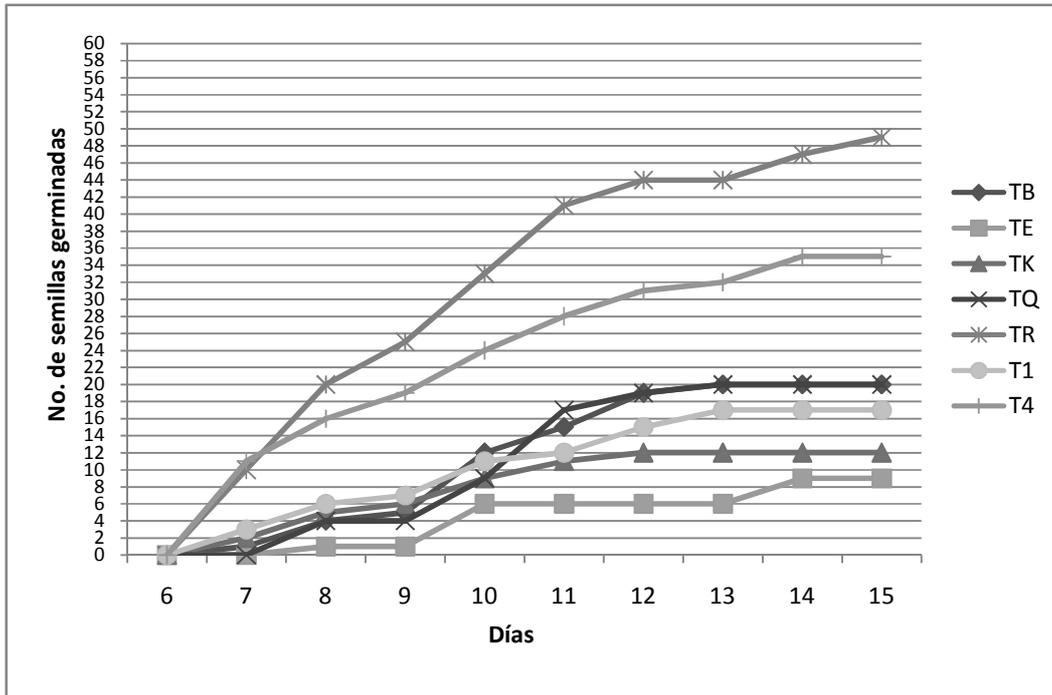


Figura 7. Germinación acumulada por día de semillas de *Agave atrovirens* en los tratamientos testigo.

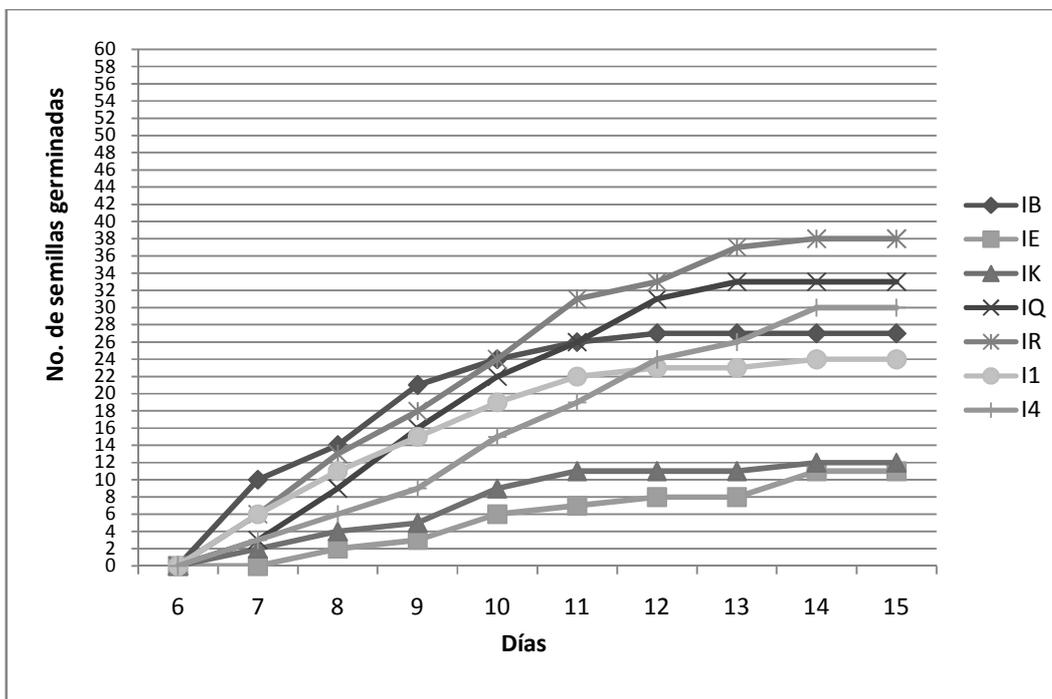


Figura 8. Germinación acumulada por día de semillas de *Agave atrovirens* en los tratamientos I (24 hrs a 4°C).

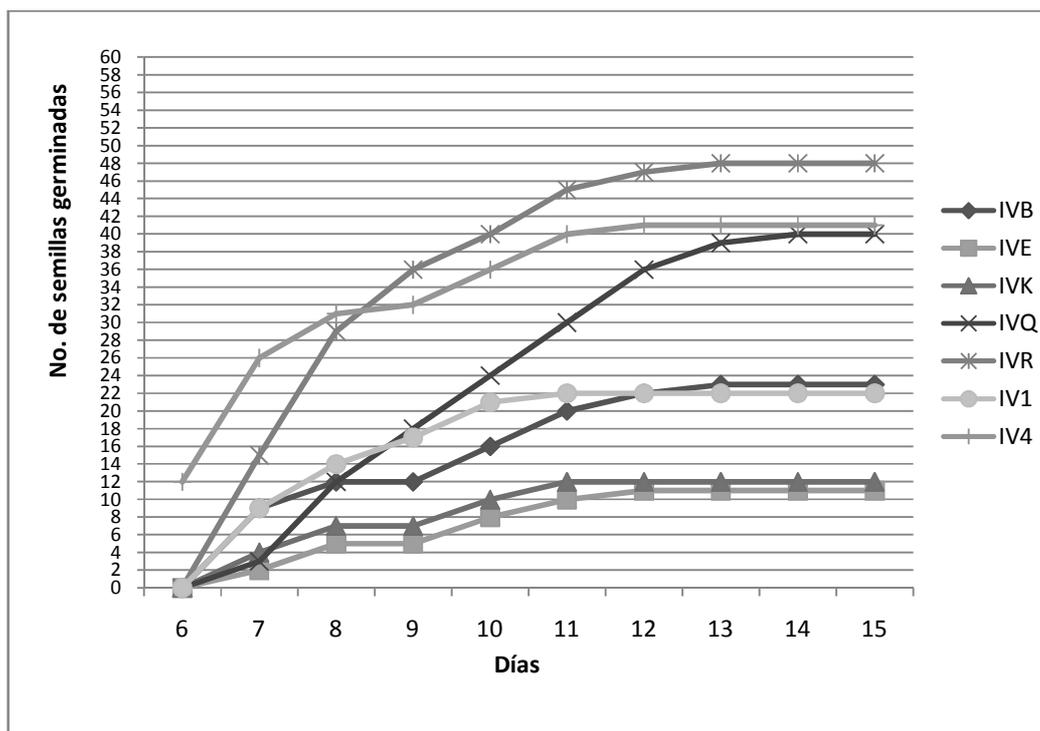


Figura 9. Germinación acumulada por día de semillas de *Agave atrovirens* en los tratamientos IV (96 hrs a 4°C).

8.2 Aislamiento y potencial de embriones cigóticos como fuente de explante

Los embriones cigóticos aislados y posteriormente cultivados en medio MS no presentaron respuesta alguna para los 16 tratamientos aplicados, donde se incluyeron reguladores de crecimiento vegetal como el 2,4-D con concentraciones de 0.125, 0.25, 0.5, 1.0 y 2.0 mg/l, el TDZ con 0.025 y 0.25 mg/l, ANA con 0.5 mg/l, KIN con 1.0 mg/l, además de los testigos sin reguladores de crecimiento vegetal.

El 100% de los embriones cigóticos cultivados tanto en los 16 tratamientos como en los testigos, presentó algún grado de oxidación, que finalmente llevo a la muerte del tejido al cabo de entre 35 y 40 días de cultivo. Muchas pueden ser las causas de la nula germinación en los embriones cigóticos cultivados, que posiblemente están directamente ligadas a los complejos procesos en la dormancia de las semillas. De esta forma se descartó el embrión cigótico como fuente de explante para el resto de la investigación.

Caso contrario reporta Groenewald, quien en 1977 cultivó segmentos de semillas de *Agave* sp. en medio MS utilizando concentraciones de 1 mg/l de 2,4-D y 5 mg/l de KIN, formando nódulos que eventualmente desarrollaron embriones somáticos. En base a esta experiencia se buscó obtener el mismo tipo de respuesta a partir de este mismo tejido sin obtener resultados similares.

8.3. Potencial de hojas como fuente de explante

Se observó que las hojas inmaduras de plantas de agave colectadas formaron callos en medio MS en promedio a los 12 días después de la siembra para los 16 tratamientos en condiciones de fotoperiodo, siendo 10 días el tiempo promedio de respuesta callogénica para los 16 tratamientos en condiciones de oscuridad. En contraste, en la hoja de plántula germinada *in vitro*, el mismo tipo de respuesta se observó en promedio hasta el día 16 para los 16 tratamientos en condiciones de fotoperiodo y 14 días para los mismos tratamientos en condiciones de oscuridad, existiendo diferencias significativas como se muestra en la tabla 7.

Tabla 7. Porcentaje de tratamientos y velocidad de respuesta callogénica en explantes de hoja de *Agave atrovirens* en medio de cultivo MS y en condiciones de fotoperiodo y oscuridad.

Tipo de explante y condiciones de luz.	Calogénesis % de tratamientos produciendo callos	Velocidad de respuesta (días)
Base de hoja y fotoperiodo	26.94±3.92 ^a	16.66±1.55 ^b
Base de hoja y oscuridad	42.50±6.42 ^a	14.66±1.65 ^{ab}
Hoja y fotoperiodo	27.77±3.98 ^a	16.16±1.72 ^b
Hoja y oscuridad	41.94±4.22 ^a	15.77±1.65 ^b
Hojas inmaduras de plantas colectadas y fotoperiodo	29.16±4.22 ^a	12.11±1.31 ^{ab}
Hojas inmaduras de plantas colectadas y oscuridad	42.50±6.60 ^a	10.94±1.20 ^a

Fotoperiodo 16 horas luz / 8 horas oscuridad.

Valores con letras distintas dentro de una misma columna indican diferencias significativas. (Duncan $p < 0.05$). Media±error estándar.

La rapidez en la respuesta de las hojas inmaduras no se pudo canalizar para obtener la respuesta embriogénica, ya que predominó la callogénesis. Delgado-Balbuena en 2007 establece que la utilización de diferentes explantes puede contribuir al éxito de la propagación en el *Agave atrovirens*, sin embargo, el uso de tejidos de edades maduras ha propiciado que los cultivos de callos sufran muerte celular temprana, y por lo tanto se impide su posterior desarrollo. Por estos motivos se descartó este tipo de tejido como fuente de explante, ya que el establecimiento de explantes poco diferenciados como es el caso de semillas y tejidos jóvenes como las bases de hojas de plántulas, presentan grandes ventajas: respuestas rápidas, menos problemas de contaminación por microorganismos, disponibilidad del explante, factibilidad de manipulación, homogeneidad y rápida respuesta *in vitro* (Hurtado y Merino, 1987; Mroginski y Roca, 1993).

En base a estos resultados se continuó trabajando con la base de hoja y hoja de plántulas germinadas *in vitro* al observarse la fácil inducción del tipo de respuesta deseado en este tipo de tejido.

8.4. Inducción de respuestas específicas

8.4.1 Inducción de embriogénesis somática directa en medio MS en fotoperiodo.

Se cuantificó el porcentaje de establecimiento del explante después de siete días del cultivo para la inducción de la embriogénesis somática directa. Los porcentajes están en el rango de 80 y 95%. Así mismo se observaron porcentajes de respuesta callogénica entre 10% y 55%.

En la respuesta embriogénica el mayor porcentaje obtenido fue del 30%, teniendo un promedio del apenas 5.83% al solo presentarse este tipo de respuesta en 4 de los 16 tratamientos aplicados (0.125 mg/l de 2,4-D con base de hoja, 0.125 mg/l de 2,4-D con hoja, 0.25 mg/l de 2,4-D con base de hoja y 0.25 mg/l de 2,4-D con hoja), estos 4 tratamientos suplementados por una combinación de auxina con citocinina, (T11 hasta el T16) (Figura 10). De esta forma observamos un efecto sinérgico en la formación de callos. Este efecto fue reportado por primera vez en 1957 por Skoog y

Miller, quienes usaron combinaciones de auxinas y citocininas para observar dicho efecto sinérgico en la regeneración de tejidos vegetales, además de que pudieron controlar más detalladamente la formación de brotes y raíces en cultivos de callos de tabaco.

Por otro lado, en 2003 Martínez-Palacios reportó que le bastó únicamente 2,4-D para la formación de callos en el 100% de los explantes en los cultivos de *Agave victoriae reginae*.

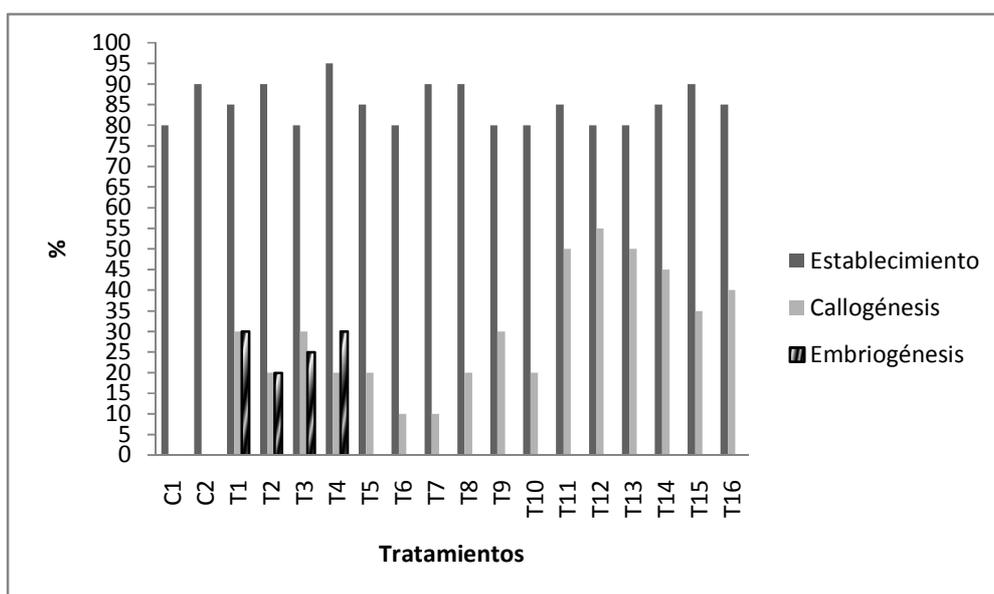


Figura 10. Porcentajes de respuesta inducida de explantes base de hoja y hoja en medio de cultivo MS y en condiciones de fotoperiodo (16 h. luz / 8 h. oscuridad) a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$.

Generalmente los callos inducidos con auxinas son una masa desorganizada de células de color blanco que con el paso del tiempo se van tornando amarillentos (Figura 11.a), sin embargo, en presencia de citocininas los callos desarrollados fueron de un color verde translúcido independientemente del tipo de explante (Figura 11.b). Esta característica es probablemente debida al efecto de las concentraciones de citocininas que aumentan la síntesis de clorofila en las plantas (George, 1993; Zaffari *et al.* 1998).

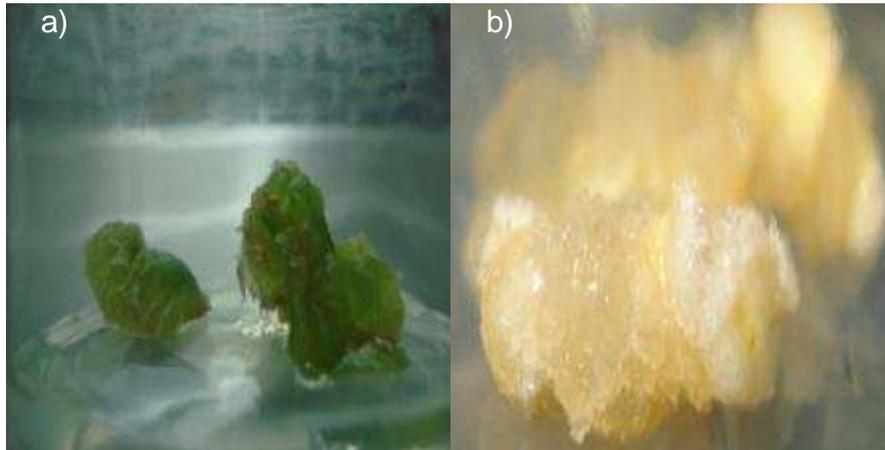


Figura 11. Efecto de las citocininas en la síntesis de clorofila en callos de base de hoja en medio MS y fotoperiodo. a) Callo de 30 días en medio MS, en condiciones de fotoperiodo y con una concentración de 0.25 mg/l de 2,4-D y 1.5 mg/l de BAP. b) Callo de 30 días en medio MS, en condiciones de fotoperiodo y con una concentración de 1 mg/l de 2,4-D.

Para el caso de la callogénesis, las concentraciones de reguladores de crecimiento vegetal indujeron a que el tejido comenzara a crecer de forma desorganizada, formando aglomeraciones de células que posteriormente fueron rediferenciadas con otras concentraciones y reguladores de crecimiento en algún tejido vegetal deseado (Figura 12.a).

Por otra parte, cuando se indujo la respuesta embriogénica, el tejido comenzó a crecer de forma más organizada formando nodulos que son los precursores de los embriones somáticos (Figura 12.b). Este proceso incluye la inducción de los mismos mecanismos genéticos que conllevan a la embriogénesis cigótica, sin embargo, a diferencia de los embriones cigóticos, los embriones somáticos no contienen un nuevo grupo de genes, sino que poseen la misma combinación genética de la planta fuente de explante (Gómez,1998).

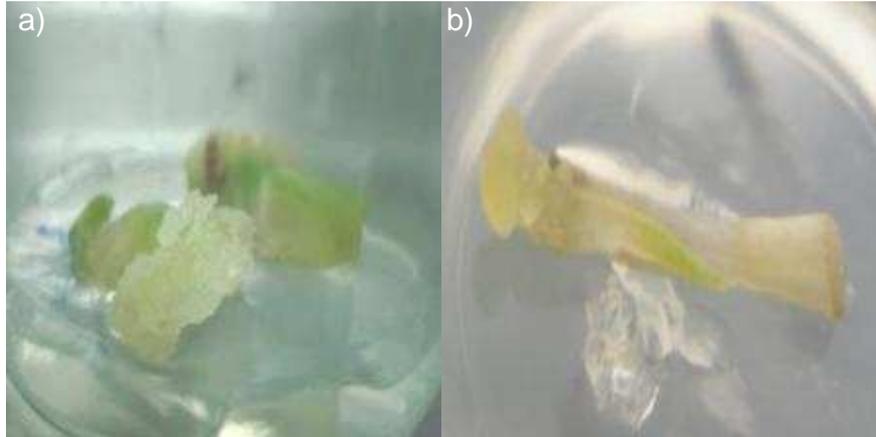


Figura 12. Inducción de respuesta callogénica y embriogénica. a) Inducción de respuesta callogénica en base de hoja como explante en medio MS adicionado con 2 mg/l de 2,4-D en condiciones de fotoperiodo. b) Inducción de respuesta embriogénica en base de hoja como explante en medio MS adicionado con 0.25 mg/l de 2,4-D en condiciones de fotoperiodo.

Transcurridos 14 días se observó la producción de callo embriogénico friable. En la semana 20 se comenzaron a desarrollar células globulares y elongadas color crema conocidos como embriones. Tres semanas después formaron una estructura con un ápice radical y apical, los embriones (Figura 13).

Estas observaciones son similares a las reportadas por Martínez-Palacios y colaboradores, así como por Nikam y colaboradores, ambos en 2003, quienes indujeron embriones somáticos vía indirecta en *Agave victoriae reginae* y *Agave sisalana* Perr. Ex. Engelm, respectivamente, en donde los callos embriogénicos fueron rodeados de un tipo de tejido blanco esponjoso y nodular. Del mismo modo, se obtuvieron resultados como los reportados para las especies de monocotiledóneas *Gasteria verrucosa* y *Haworthia fasciata*, estrechamente relacionadas con agaves, donde los embriones somáticos se originaron a partir de callo amarillo y compacto (Beyl y Sharma, 1983).

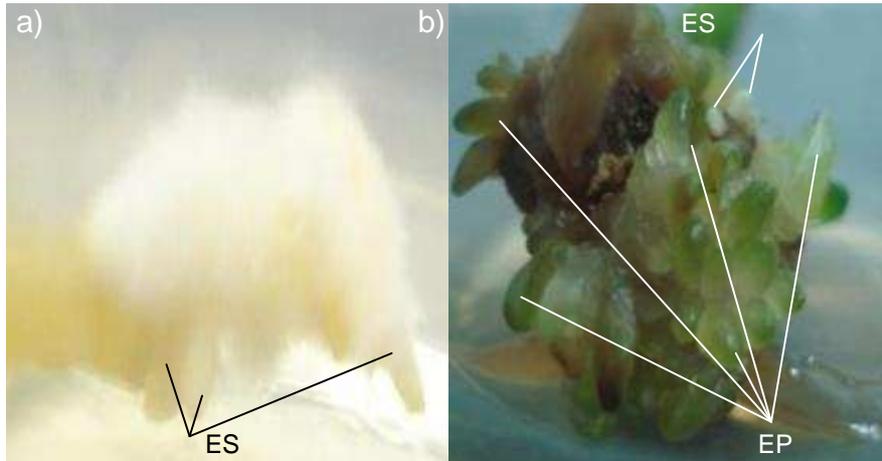


Figura 13. Formación de embriones somáticos. a) Base de hoja de 25 semanas en medio MS adicionado con 0.25 mg/l de 2,4-D en condiciones de fotoperiodo. b) Hoja de 20 semanas en medio MS adicionado con 0.25 mg/l de 2,4-D en condiciones de fotoperiodo. Estructuras proembriogénicas en diferentes fases de maduración (EP) y Embriones somáticos en estado cotiledonal (ES).

La embriogénesis somática se presentó tanto en el explante base de hoja como en la hoja, pero únicamente se pudo observar cuando el cultivo se encontró en condiciones de fotoperiodo, y exclusivamente en dos concentraciones 0.125 y 0.25 mg/l de 2,4-D. De igual manera Rodríguez-Garay en 1996 indujo respuesta embriogénica utilizando hojas de especies silvestres de *Agave victoriae-reginae* en presencia de 0.25 mg/l de 2,4-D. George en 1993 señaló que las auxinas es el principal regulador de crecimiento para inducir embriones somáticos.

La respuesta embriogénica evaluada en este trabajo para el caso del *Agave atrovirens* se presentó en la semana 20 de cultivo (Figura 14), la cual es mas lento a lo reportado en *Agave victoriaeae-regineae*, donde la respuesta embriogénica se presentó a la semana 14 (Martínez-Palacios *et al.*, 2003).

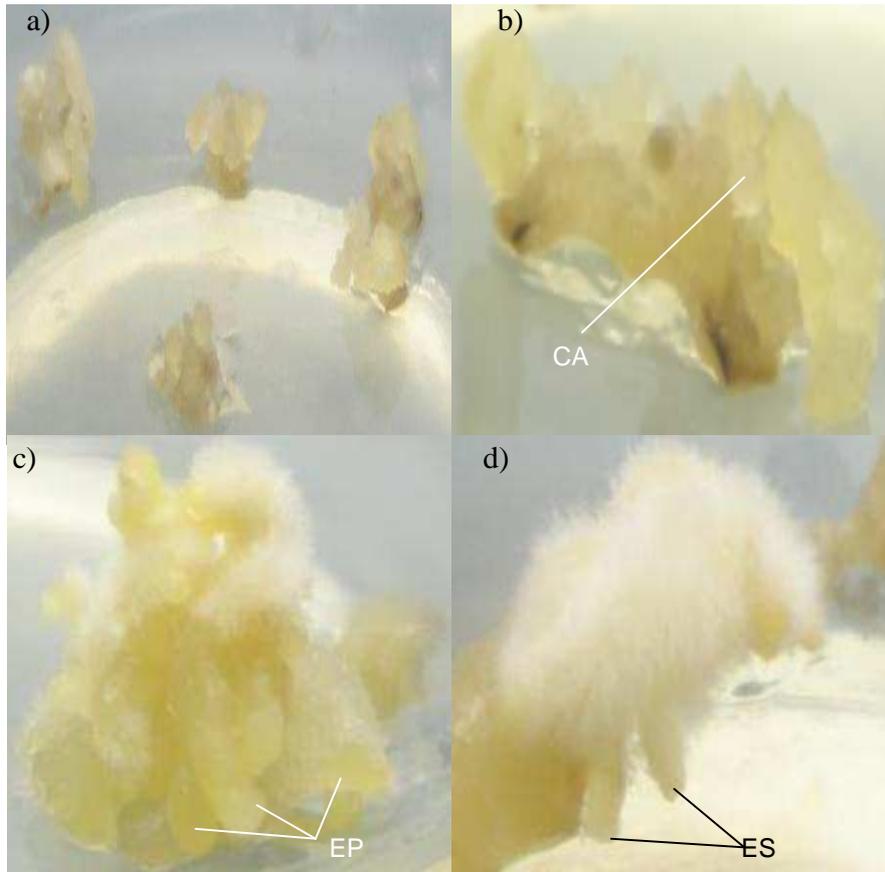


Figura 14. Desarrollo de embriones somáticos en base de hoja cultivada en medio MS adicionado con 0.25 mg/l de 2,4-D en condiciones de fotoperiodo. a) Inducción de la respuesta embriogénica a las 10 semanas b) Crecimiento y desarrollo de la masa embriogénica a las 15 semanas. c) Desarrollo de los proembriones pasando por las fases: globular, corazón y torpedo a las 20 semanas y d) Embriones desarrollados en la fase cotiledonal a las 25 semanas. Callo embriogénico (CA), estructuras proembriogénicas en diferentes fases de maduración (EP) y embriones somáticos en estado cotiledonal (ES).

8.4.2 Inducción de embriogénesis somática directa en medio MS en oscuridad.

Se observó que la oscuridad no induce la respuesta embriogénica directa en medio MS. El 100% de los tratamientos que se establecieron bajo condiciones de oscuridad, no mostraron respuesta embriogénica (Figura 15). Resultados similares a los obtenidos por Martínez-Palacios y colaboradores en 2003, así como Portillo y colaboradores en 2007 para *Agave victoriae-regine* y *Agave tequilana* weber respectivamente.

El mayor porcentaje y velocidad de respuesta callogénica en los tratamientos se presentó en condiciones de oscuridad, esto en comparación con los tratamientos en fotoperiodo como se muestra en la tabla 8, donde se observan diferencias significativas entre los tratamientos en las diferentes condiciones de luz.

Tabla 8. Efecto del medio de cultivo y condiciones de luz en la respuesta callogénica en explantes de *Agave atrovirens*.

Medio de cultivo y condiciones de luz	Calogénesis (% de tratamientos produciendo callos)	Velocidad de respuesta (días)
Murashige & Skoog y fotoperiodo	30.31±3.57 ^a	14.4±0.19 ^a
Murashige & Skoog y oscuridad	47.81±5.96 ^b	11.0±0.36 ^b

Fotoperiodo 16 horas luz / 8 horas oscuridad

Valores con letras distintas dentro de una misma columna indican diferencias significativas (Duncan $p < 0.05$). Media±error estándar.

En los cultivos en condiciones de oscuridad la respuesta callogénica se logró observar en el 100% de los tratamientos, destacando aquellos donde se utilizó la combinación de auxinas con citocininas, como caso del tratamiento T11 (0.5 mg/l de ANA y 1.0 mg/l de KIN en base de hoja) que alcanzó porcentajes de hasta un 90% de respuesta callogénica, en contraste con los tratamientos donde únicamente se utilizó una auxina, ya que el porcentaje máximo es de 40%.

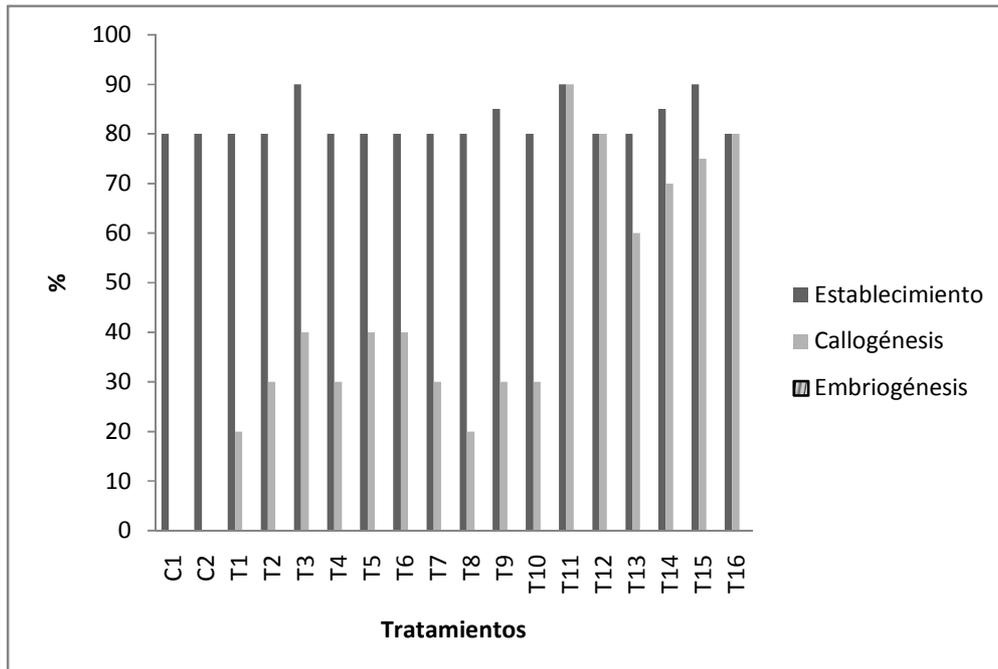


Figura 15. Porcentajes de respuesta inducida de explantes base de hoja y hoja en medio de cultivo MS y en condiciones oscuridad a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$.

En la tabla 9 se comparó la totalidad de tratamientos en medio MS, incluyendo los 16 de fotoperiodo y los 16 de oscuridad.

Los porcentajes más altos de establecimiento se observaron en los tratamientos T4 y T15, que consisten en 0.25 mg/l de 2,4-D en hoja y 0.25 mg/l de 2,4-D y 0.25 mg/l de TDZ en hoja respectivamente.

Los porcentajes de respuesta callogénica son mucho más altos en los tratamientos donde se utiliza más de un regulador de crecimiento vegetal, es decir, a partir del tratamiento T11 y hasta el T16, donde se mezclan 2,4-D, ANA, TDZ y KIN, observándose los porcentajes más altos en los tratamientos T11, T12 y T16.

Para el caso de la respuesta embriogénica, las concentraciones donde se observó dicho tipo de respuesta fueron 0.125 y 0.25 mg/l de 2,4-D, es decir en los tratamientos T1, T2, T3 y T4, de esta forma la respuesta embriogénica se indujo tanto en la base de la hoja como en la misma hoja, aunque únicamente en condiciones de fotoperiodo. Cabe destacar que no se observaron diferencias

significativas entre estos últimos cuatro tratamientos para la respuesta embriogénica (Tabla 9).

Tabla 9. Porcentajes de establecimiento, respuesta callogénica y embriogénica de explantes cultivados en medio Murashige & Skoog adicionado con reguladores de crecimiento vegetal, vitaminas L2 y 3% de sacarosa.

Tratamiento	2,4-D mg/l	ANA mg/l	TDZ mg/l	KN mg/l	Establecimiento	Callogénesis	Embriogénesis
Porcentaje de tratamiento							
C1	-	-	-	-	80.0±0.0 ^a	0.0±0.0 ^a	0.0±0.0 ^a
C2	-	-	-	-	85.0±5.0 ^a	0.0±0.0 ^a	0.0±0.0 ^a
T1	0.125	-	-	-	82.5±2.5 ^a	25.0±5.0 ^{abc}	15.6±4.1 ^d
T2	0.125	-	-	-	85.0±5.0 ^a	25.0±5.0 ^{abc}	9.11±4.9 ^b
T3	0.25	-	-	-	85.0±5.0 ^a	35.0±5.0 ^{abcd}	11.04±4.2 ^c
T4	0.25	-	-	-	87.5±7.5 ^a	25.0±5.0 ^{abc}	14.9±2.8 ^d
T5	0.5	-	-	-	82.5±2.5 ^a	30.0±10 ^{abc}	0.0±0.0 ^a
T6	0.5	-	-	-	80.0±0.0 ^a	25.0±15 ^{abc}	0.0±0.0 ^a
T7	1.0	-	-	-	85.0±5.0 ^a	20.0±10 ^{ab}	0.0±0.0 ^a
T8	1.0	-	-	-	85.0±5.0 ^a	20.0±0.0 ^{ab}	0.0±0.0 ^a
T9	2.0	-	-	-	82.5±2.5 ^a	30.0±0.0 ^{abc}	0.0±0.0 ^a
T10	2.0	-	-	-	80.0±0.0 ^a	25.0±5.0 ^{abc}	0.0±0.0 ^a
T11	-	0.5	-	1.0	87.5±2.5 ^a	70.0±20 ^d	0.0±0.0 ^a
T12	-	0.5	-	1.0	80.0±0.0 ^a	67.5±12.5 ^d	0.0±0.0 ^a
T13	0.25	-	0.025	-	80.0±0.0 ^a	55.0±5.0 ^{bcd}	0.0±0.0 ^a
T14	0.25	-	0.025	-	85.0±0.0 ^a	57.5±12.5 ^{cd}	0.0±0.0 ^a
T15	0.25	-	0.25	-	90.0±0.0 ^a	55.0±20 ^{bcd}	0.0±0.0 ^a
T16	0.25	-	0.25	-	82.5±2.5 ^a	60.0±20 ^d	0.0±0.0 ^a

Valores con letras distintas dentro de una misma columna indican diferencias significativas (Duncan $p<0.05$). Media±error estándar.

8.4.3 Inducción de callogénesis

Se observó el desarrollo de callos a partir de dos diferentes fuentes de explantes, hojas de plántulas germinadas *in vitro* y hojas inmaduras de plantas en campo (Figura 16), presentándose hasta un 30% en condiciones de fotoperiodo en el tratamiento G6 y hasta un 90.4% y 91.3% en oscuridad en los tratamientos G1 y G4 respectivamente (Tabla 10). Estos resultados eran esperados ya que se utilizaron los reguladores de crecimiento vegetal y concentraciones reportados por Toribio en 2005 y Delgado en 2008, quienes reportaron porcentajes de respuesta

calogénica de hasta el 100% en base de hoja como fuente de explante de *Agave atrovirens*.

De igual forma Romero-Tepal en 2009 reporta 100% de respuesta calogénica con la mezcla de BAP y 2,4-D en concentraciones de 0.5 a 2 mg/l y 1 a 2.5 mg/l respectivamente y bajo condiciones de oscuridad y $27\pm 3^{\circ}\text{C}$.

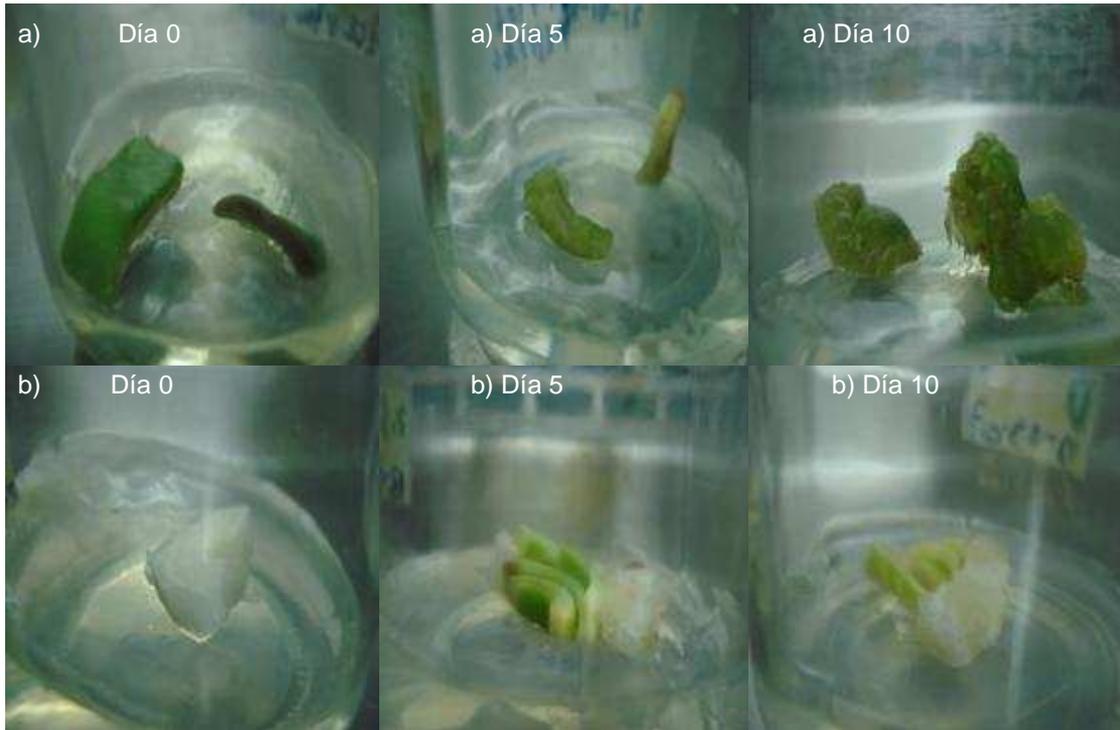


Figura 16. Inducción y desarrollo de la respuesta calogénica en: a) Hojas de plántulas germinadas *in vitro* en medio MS, concentración 1.0 mg/l de 2,4-D y 1.0 mg/l de 6-BAP, en condiciones de fotoperiodo a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ y b) Hojas inmaduras de plántulas colectadas en campo en medio MS, concentración 1.0 mg/l de 2,4-D y 1.0 mg/l de 6-BAP, en condiciones de oscuridad a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$.

Tabla 10. Porcentajes de respuesta para la inducción de callo para la embriogénesis somática indirecta en medio de cultivo MS en condiciones de fotoperiodo (16 h. luz / 8 h. oscuridad) y oscuridad.

Tratamiento	Fotoperiodo		Oscuridad	
	Establecimiento %	Callogénesis %	Establecimiento %	Callogénesis %
C1	90±4.71	-	94±5.16	-
C2	95±5.27	-	88±4.22	-
G1	79±11.01	11.7±2.21	89±5.68	90.4±4.48
G2	80±6.67	19.8±7.77	80±6.67	69.8±11.50
G3	90±6.67	19.5±6.96	92±6.32	79.9±6.19
G4	84±6.99	24.9±2.85	90±6.67	91.3±6.93
G5	80±6.67	9.9±2.85	78±10.33	81.2±6.49
G6	90±6.67	29.7±4.99	79±9.94	60.3±9.15

Media±error estándar.

8.4.4 Inducción de embriogénesis somática indirecta en medio MS.

Los callos obtenidos de base de hoja y hoja como fuente de explante se sembraron en el mismo tipo de medio MS y en dos tratamientos: el primer tratamiento se adicionado con 0.25 mg/l de 2,4-D y 1.5 mg/l de 6-BAP, en condiciones de fotoperiodo y a 25±2 °C. El segundo tratamiento constó de 0.25 mg/l de ANA y 1.5 mg/l de KIN, en condiciones de fotoperiodo y a 25±2 °C. Se observó que los callos no desarrollaron ningún tipo de respuesta en alguno de los tratamientos, observándose una rápida oxidación, así como necrosis del tejido (Figura 17), resultados similares reporta Das en 1992 al intentar propagar *Agave sisalana* a partir de los callos cultivados provenientes de hojas en medio MS, sin conseguir algún tipo de respuesta. Por el contrario, Portillo y colaboradores, en 2007 reportan la inducción de embriogénesis somática indirecta en hojas de *Agave tequilana* Weber cultivar azul utilizando medio MS suplementado con vitaminas L2 y reguladores de crecimiento vegetal como BAP, TDZ, KN y 2,4-D. De igual forma, Nikam en 2003 reporta la inducción de embriogénesis somática indirecta en *Agave sisalana* trasplantando callos a medio MS suplementado con KN, ANA, BAP y 2,4-D. Las posibles causas del por qué no se obtuvo respuesta embriogénica somática indirecta en *Agave atrovirens* radica posiblemente en las concentraciones endógenas de reguladores de crecimiento vegetal propias de cada especie de

Agave, lo que hace más complejo inducir un tipo de respuesta específico tomando como referencia otra especie de Agave.

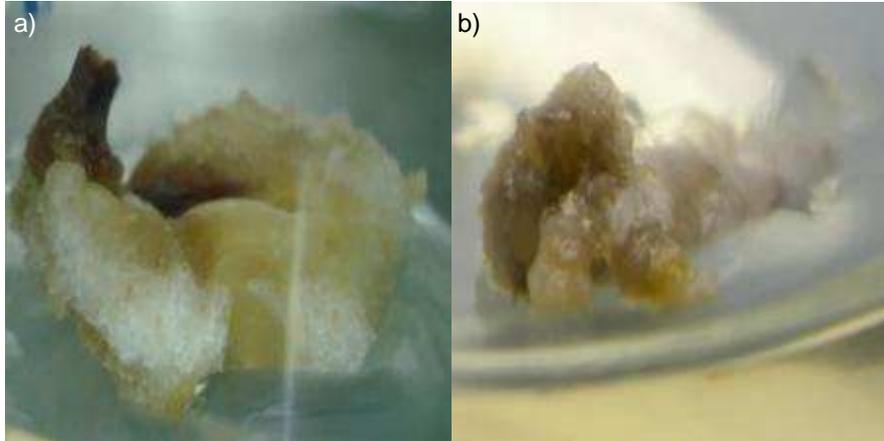


Figura 17. Oxidación y necrosis de callos trasplantados para la inducción de embriogénesis somática indirecta. Concentración 0.25 mg/l de ANA y 1.5 mg/l de KIN, en medio MS en condiciones de fotoperiodo (16 h.luz / 8 h. oscuridad) a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$. a) Día 5 de cultivo posterior al trasplante. b) Día 10 posterior al trasplante.

8.4.5 Inducción de embriogénesis somática directa en medio AE.

Para la inducción de la embriogénesis somática directa en el medio Arnold & Eriksson, al igual que en medio MS, se utilizaron los reguladores de crecimiento vegetal: 2,4-D con concentraciones de 0.125, 0.25, 0.5, 1.0 y 2.0 mg/l, el thidiazurón con 0.025 y 0.25 mg/l, el ANA con 0.5 mg/l, la cinetina con 1.0 mg/l, además de los testigos sin reguladores de crecimiento vegetal.

Para los tratamientos en condiciones de fotoperiodo de observación porcentajes de respuesta callogénica de 35% para los tratamientos A13 y A15 (Figura 18), en comparación con los tratamientos cultivados en medio MS, donde se indujo hasta un 55% de respuesta callogénica en el tratamiento T12 en condiciones de fotoperiodo (Figura 10). De igual forma, no se observó respuesta embriogénica alguna, donde aunque se observan altos porcentajes de establecimiento, la respuesta callogénica se presenta en 12 de los 16 tratamientos con un porcentaje máximo del 35% (Figura 18). En la tabla 11 se observa que existe diferencia

significativa entre el porcentaje de tratamientos produciendo callos en medio MS en condiciones de oscuridad. En el medio MS se observa una respuesta a 14.4 días en fotoperiodo y 11.0 en oscuridad, además de que en estas mismas condiciones de oscuridad se presenta el mayor porcentaje de tratamientos produciendo callo con un 47.81%. En medio AE la velocidad de respuesta es de 27.5 y 23.3 en fotoperiodo y oscuridad respectivamente, presentando un porcentaje de tratamientos produciendo callo de 14.16% para fotoperiodo y 14.72% para oscuridad, sin observarse diferencias significativas entre estos últimos.

En el medio AE y en condiciones de fotoperiodo, se observa un establecimiento de los explantes por arriba del 80% en cada uno de los tratamientos. Por otra parte, en lo que respecta a la respuesta callogénica, se puede establecer que el medio de cultivo AE, aunado a la presencia de luz en el cultivo, no son las condiciones adecuadas para inducir altos porcentajes de respuesta callogénica en *Agave atrovirens* (Figura 18), esto en comparación con los porcentajes alcanzados en medio MS, aún en condiciones de fotoperiodo.

Caso contrario se ha observado en numerosas especies de dicotiledóneas, específicamente en *Picea glauca*, con la cual Tremblay en 1990 y obtuvo altos porcentajes de respuesta callogénica y posteriormente respuesta embriogénica utilizando el medio de cultivo AE y bajo condiciones de fotoperiodo.

Tabla 11. Efecto del medio de cultivo y condiciones de luz en la respuesta callogénica en explantes de *Agave atrovirens*.

Medio de cultivo y condiciones de luz	Calogénesis % de tratamientos produciendo callos	Velocidad de respuesta (días)
Murashige & Skoog y fotoperiodo	30.31±3.57 ^a	14.4±0.19 ^a
Murashige & Skoog y oscuridad	47.81±5.96 ^b	11.0±0.36 ^b
Arnold & Eriksson y fotoperiodo	14.16±2.92 ^a	27.5±0.42 ^c
Arnold & Eriksson y oscuridad	14.72±5.10 ^a	23.3±0.26 ^d

Fotoperiodo 16 horas luz / 8 horas oscuridad

Valores con letras distintas dentro de una misma columna indican diferencias significativas (Duncan $p < 0.05$). Media ± error estándar.

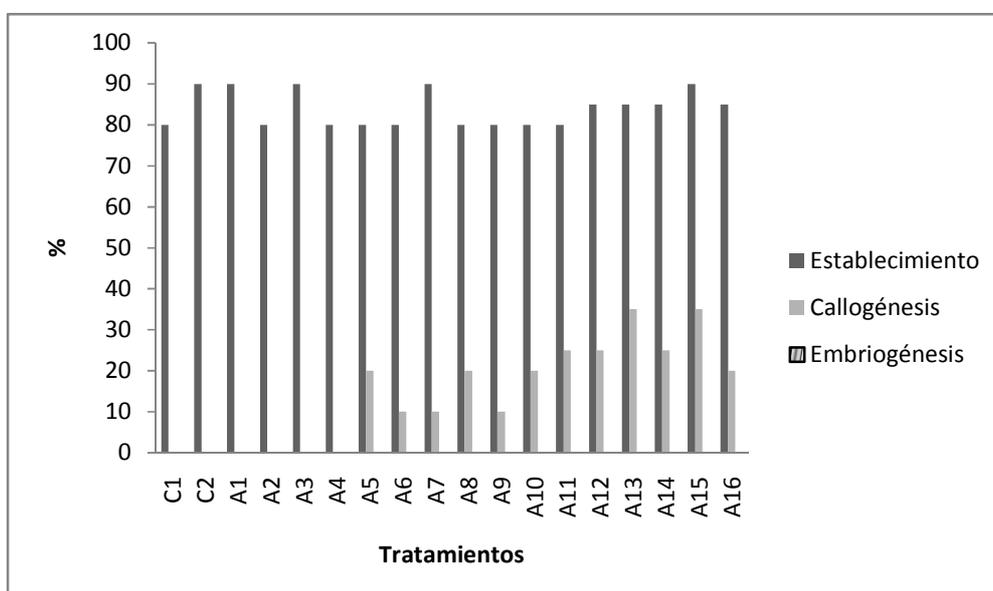


Figura 18. Porcentajes de respuesta inducida de explantes base de hoja y hoja en medio de cultivo AE y en condiciones de fotoperiodo (16 h. luz / 8 h. oscuridad) a $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

Para los tratamientos en condiciones de oscuridad, el establecimiento se presentó por arriba del 80%. A diferencia del medio de cultivo MS, en el medio AE la inducción hacia la respuesta callogénica fue más lenta, ya que para el caso del medio MS el tiempo promedio de inducción callogénica en oscuridad fue de once días, a diferencia del medio AE en oscuridad donde se induce dicha respuesta hasta el día 23 (Tabla 11). Así mismo, se obtuvieron callos mucho más compactos, comparándolos con los inducidos en medio MS (Figura 19).

El porcentaje de respuesta callogénica en condiciones de oscuridad fue superior al porcentaje de dicha respuesta en condiciones de fotoperiodo, sin embargo, no se observó respuesta embriogénica en ninguno de los dos casos..

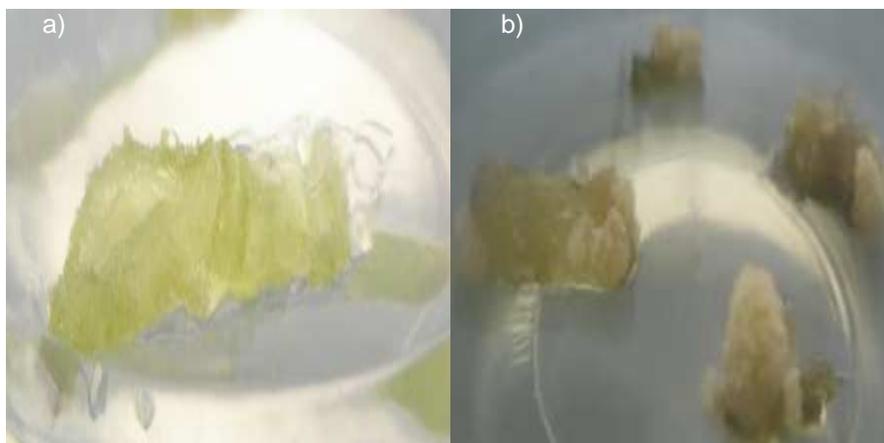


Figura 19. Callos producidos a partir de base de hoja de *A. atrovirens* como fuente de explante en medio AE. a) 1 mg/l 2,4-D y 1 mg/l BAP, en condiciones de fotoperiodo (16 h. luz / 8 h. oscuridad) a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$. b) 1 mg/l 2,4-D y 1 mg/l BAP, en condiciones de oscuridad a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$

Según los resultados obtenidos en medio MS, en condiciones de oscuridad se esperaban altos porcentajes de respuesta callogénica, situación que no se presenta en el medio AE, donde los tratamientos A14 y A15 presentaron el máximo porcentaje de respuesta que fue del 50%, además de no observarse respuesta embriogénica en ninguno de los tratamientos (Figura 20), lo que indica que este medio de cultivo no es el adecuado para inducir la embriogénesis somática directa para esta especie, al no presentar ni respuesta embriogénica, ni porcentajes de callogénesis siquiera similares a los obtenidos en medio MS. Caso contrario se presenta especies de dicotiledoneas de gran importancia tanto económica como ecológica y tal es el caso de *Picea glauca*, donde se pudo inducir respuesta embriogénica por vía directa e indirecta en medio de cultivo AE y utilizando 2,4-D y BA (Stasolla, 2006).

En base a estos resultados podemos establecer que el medio de cultivo y las condiciones de luz óptimas para la rápida inducción de la respuesta callogénica son el medio Murashihe & Skoog en condiciones de oscuridad.

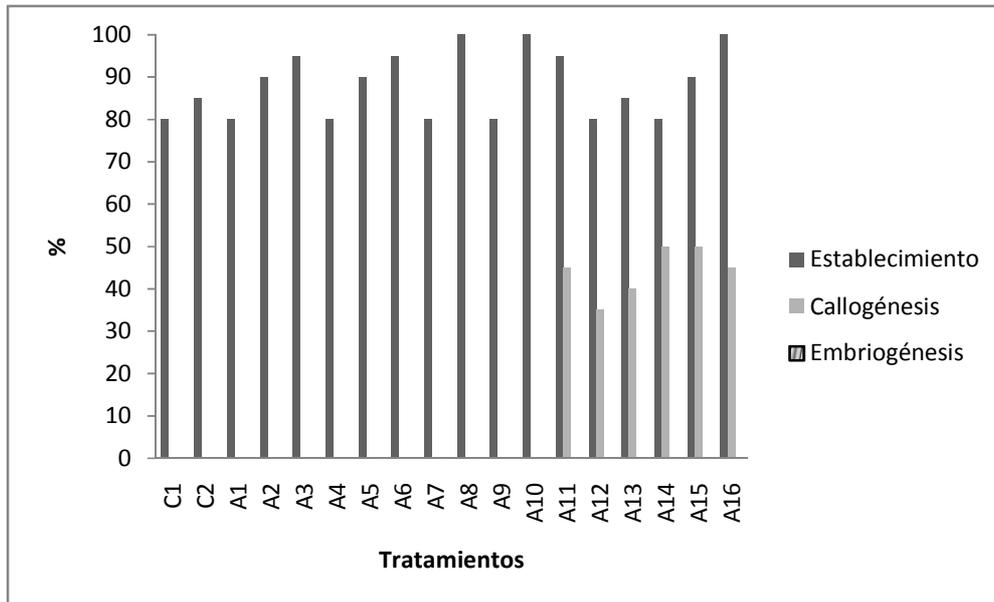


Figura 20. Porcentajes de respuesta inducida de explantes base de hoja y hoja en medio de cultivo AE y en condiciones de oscuridad a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$.

Haciendo un balance general sobre el medio de cultivo AE para inducción de embriogénesis somática en *Agave atrovirens* se puede decir que no tiene efecto alguno en el establecimiento, en comparación con el medio MS. Analizando la respuesta callogénica entre los tratamientos en medio AE se observa una marcada diferencia entre los tratamientos donde únicamente se utilizó una auxina (A1-A10) y los tratamientos donde se utilizó la combinación de una auxina y una citocinina (A11-A16) como se observa en la figura 20.

En la tabla 12 se muestran los resultados del análisis estadístico para el establecimiento, respuesta callogénica y embriogénica de cultivos en medio Arnold & Eriksson suplementado con reguladores de crecimiento vegetal, agrupando los tratamientos totales, independientemente de las condiciones de fotoperiodo y oscuridad.

No se observaron efectos en los porcentajes de establecimiento en los cultivos, en relación al tipo de explante, concentración de reguladores de crecimiento vegetal y medio de cultivo utilizado en los tratamientos.

La respuesta callogénica se indujo a partir del tratamiento A5 y hasta el A16, alcanzando un porcentaje máximo de respuesta callogénica en los tratamientos A14 y A15 con un 50% (Figura 20). Así mismo, los tratamientos con nulo porcentaje de respuesta callogénica fueron del A1 al A4 para ambas condiciones, tanto fotoperiodo como oscuridad. Al igual que en condiciones de fotoperiodo, no se indujo respuesta embriogénica alguna en el medio de cultivo AE en condiciones de oscuridad.

Stasolla en 2006 obtuvo plantas de *Picea glauca* mediante la inducción de tejido embriogénico, el mantenimiento del mismo, el desarrollo de embriones, así como la maduración de dichos embriones para su posterior conversión a plantas, esto en medio AE, utilizando 2,4-D como regulador de crecimiento y en condiciones de oscuridad, por tanto se establece la importancia de la especie vegetal con la cual se está trabajando, ya que el tipo de respuesta inducido va a depender en gran parte de la concentración endógena de reguladores de crecimiento vegetal que contenga el tejido utilizado como explante.

Tabla 12. Porcentajes de establecimiento, respuesta calogénica y embriogénica de explantes cultivados en medio Arnold & Eriksson adicionado con reguladores de crecimiento vegetal, vitaminas L2 y 3% de sacarosa.

Tratamiento	2,4-D mg/l	ANA mg/l	TDZ mg/l	KN mg/l	Porcentaje de tratamiento		
					Establecimiento	Calogénesis	Embriogénesis
C1	-	-	-	-	80.0±0.0 ^a	0.0±0.0 ^a	0.0±0.0 ^a
C2	-	-	-	-	87.5±2.5 ^a	0.0±0.0 ^a	0.0±0.0 ^a
A1	0.125	-	-	-	85.0±5.0 ^a	0.0±0.0 ^a	0.0±0.0 ^a
A2	0.125	-	-	-	85.0±5.0 ^a	0.0±0.0 ^a	0.0±0.0 ^a
A3	0.25	-	-	-	92.5±2.5 ^a	0.0±0.0 ^a	0.0±0.0 ^a
A4	0.25	-	-	-	80.0±0.0 ^a	0.0±0.0 ^a	0.0±0.0 ^a
A5	0.5	-	-	-	85.0±5.0 ^a	10.63±3.7 ^c	0.0±0.0 ^a
A6	0.5	-	-	-	87.5±7.5 ^a	5.28±1.7 ^b	0.0±0.0 ^a
A7	1.0	-	-	-	85.0±5.0 ^a	4.96±2.3 ^b	0.0±0.0 ^a
A8	1.0	-	-	-	90.0±10 ^a	10.9±2.2 ^c	0.0±0.0 ^a
A9	2.0	-	-	-	80.0±0.0 ^a	6.6±2.7 ^b	0.0±0.0 ^a
A10	2.0	-	-	-	90.0±10 ^a	11.6±7.7 ^c	0.0±0.0 ^a
A11	-	0.5	-	1.0	87.5±7.5 ^a	33.6±3.3 ^d	0.0±0.0 ^a
A12	-	0.5	-	1.0	82.5±2.5 ^a	31.6±2.3 ^d	0.0±0.0 ^a
A13	0.25	-	0.025	-	85.0±0.0 ^a	37.6±2.7 ^e	0.0±0.0 ^a
A14	0.25	-	0.025	-	82.5±2.5 ^a	38.9±3.1 ^e	0.0±0.0 ^a
A15	0.25	-	0.25	-	90.0±0.0 ^a	41.6±4.7 ^f	0.0±0.0 ^a
A16	0.25	-	0.25	-	92.5±7.5 ^a	31.6±1.7 ^d	0.0±0.0 ^a

Valores con letras distintas dentro de una misma columna indican diferencias significativas (Duncan $p<0.05$). Media±error estándar.

8.5 Optimización de la inducción de embriogénesis somática

Dentro de los 10 tratamientos utilizados destacan el E7 y el E8 con concentraciones de 0.24 mg/l de 2,4-D y utilizando base de hoja y base respectivamente, donde se observan porcentajes de inducción embriogénica superiores al 29% (Tabla 13).

Tabla 13. Tratamientos aplicados para la inducción de embriogénesis somática en medio de cultivo MS (1962) y en condiciones de fotoperiodo (16 h. luz y 8 h. oscuridad).

Tratamiento	Explante	2,4-D mg/L	Establecimiento (%)	Embriogénesis (%)
E1	Base	0.12	90	19.66±1.45 ^c
E2	Hoja	0.12	90	14.66±0.33 ^b
E3	Base	0.16	85	14.66±0.33 ^b
E4	Hoja	0.16	90	9.0±0.57 ^a
E5	Base	0.20	85	19.33±0.66 ^c
E6	Hoja	0.20	90	25.33±0.33 ^d
E7	Base	0.24	100	34.0±0.57 ^f
E8	Hoja	0.24	100	29.0±0.57 ^e
E9	Base	0.28	85	19.0±0.57 ^c
E10	Hoja	0.28	80	20.66±0.66 ^c

Valores

con letras distintas dentro de una misma columna indican diferencias significativas (Duncan $p < 0.05$). Media±error estándar.

Así, los porcentajes de respuesta embriogénica observados fueron muy similares, destacando la concentración de 0.24 mg/l de 2,4-D donde hubo hasta un 34% de respuesta embriogénica, sin embargo, se observan diferencias significativas entre los tratamientos aplicados para la inducción de la embriogénesis somática directa (tabla 8).

De igual forma Nikam y colaboradores en 2003 reportaron porcentajes de hasta un 76% para *Agave sisalana* Perr. ex. Engelm, además de reportar 100% de sobrevivencia en campo de las plántulas regeneradas *in vitro* a partir de los embriones somáticos.

9. CONCLUSIONES

- ❖ Las hojas jóvenes de *Agave atrovirens* son una buena fuente de explante para inducir la embriogénesis somática directa en *Agave atrovirens*.
- ❖ El medio de cultivo Murashige & Skoog es más adecuado para inducir la respuesta embriogénica en *A. atrovirens*, en comparación con el medio de cultivo Arnold & Eriksson.
- ❖ El porcentaje máximo de respuesta embriogénica fue de 34%, presentándose en medio de cultivo MS, con base de hoja de *Agave atrovirens* como fuente de explante en condiciones de fotoperiodo y con 2.4 mg/l de 2,4-D.
- ❖ El fotoperiodo de 16 horas luz y 8 de oscuridad es indispensable para la inducción de la respuesta embriogénica, ya que únicamente bajo estas condiciones se indujo dicha respuesta. Así mismo, las condiciones de oscuridad en el cultivo son un factor determinante en la inducción de altos porcentajes de respuesta callogénica de los explantes en comparación con los tratamientos en condiciones de fotoperiodo.
- ❖ La concentración de 0.24 mg/l de 2,4-D fue la que permitió inducir el mayor porcentaje de respuesta embriogénica mediante la vía directa, en medio MS y en condiciones de fotoperiodo.

10. PERSPECTIVAS

Es recomendable realizar estudios sobre la maduración y germinación de embriones somáticos, determinando concentraciones óptimas de nitrógeno, nitratos, amonio, aminoácidos, caseína hidrolizada, sacarosa y oxígeno en el medio de cultivo, lo cual permitiría establecer las condiciones adecuadas para una maduración total y evitaría por consiguiente la germinación precoz de los embriones somáticos, con lo cual se puede dar paso a las aplicaciones biotecnológicas para la multiplicación masiva del *Agave atrovirens*.

Por otra parte, es importante realizar estudios histológicos tanto de los embriones somáticos, como de los callos, así como estudios a nivel molecular para poder establecer la susceptibilidad hacia la inducción de la respuesta deseada y definir los posibles cambios en el material genético de las células vegetales cultivadas.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abundis-Vagas, B. 2007. Monografía de Agave pulquero. Secretaria de Desarrollo Rural del estado de Puebla. 4-20. Archivo pulquero.

Aloni, R. 1980. Role of auxin and sucrose in the differentiation of sieve and tracheary elements in plant tissue cultures. *Planta* 150: 255-263.

Arizaga, S. y E. Ezcurra. 2002. Propagation Mechanisms in *Agave macroacantha* (Agavaceae), a tropical arid-land Succulent Rosette. *American Journal of Botany*

Arnold, S., Sabala, I., Bozhkov, P., Dyachok, J. & L. Filonova. 2002. Developmental Pathways of Somatic Embryogenesis. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 69:233-249.

Beyl, C. & G. Sharma. 1983. Picloram induced somatic embryogenesis in *Gasteria* and *Haworthia*. *Plant, Cell, Tissue and Organ culture*. Netherlands. 8:207-213.

Bidwell, R.S. 1979. *Fisiología vegetal*. AGT Editor. México. D.F. 409-438.

Binh, L. T., Muoi, L. T., Oanh, H. T. K., Thang T. D. & D.T. Phong. 1990. Rapid propagation of agave by *in vitro* tissue culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 23: 67-70.

Castro-Concha, L., Loya-Vargas, V.M., Chan, J.L. & M.L. Robert. 1990. Glutamate dehydrogenase activity in normal and vitrified plants of *Agave tequilana* weber propagated *in vitro*. *Pl. Cell Tissue Organ Cult.* 22:147-151.

Cedeño, C.M. 1995. "Tequila Production", *Critic. Rev. Biotech.* 15:1-11.

Conquist, A. 1981. The evolution and classification of flowering plants. Hough Mifflin. Boston.

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

Delgado-balbuena, L., 2007. Cultivo de tejidos para la propagación in vitro de Agave pulquero (*Agave atrovirens Karw ex Salm-Dick*). Tesis de Maestría de CIBA-IPN, Tlaxcala, 54-55.

Eguiarte, L.E., Souza, V. & A. Silva-Montellano. 2000. Evolución de la familia Agavaceae: Filogénia, biología reproductiva y genética de poblaciones. Boletín de la Sociedad Botánica de México 66: 131-150.

Enríquez D.V., Castañeda G.C. & J.L. Rodríguez. 2005. Inorganic salts and indolebutyric acid on *in vitro* root induction in *Agave angustifolia* shoots. Rev. Fitotec. Mex., 28: 175-178.

Evans D.A., Flick C.E. & W. R. Sharp. 1981. Growth and behavior of cell cultures: Embryogenesis and organogenesis. In: Plant Tissue Culture: Methods and Applications in Agriculture. T. A Thorpe, Ed. Academic Press, NY. p. 45-113.

Fehér, A., Taras, P., Pasternak, P. & D. Dudits. 2003. Transition of Somatic Plant Cell to an Embryogenic State. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 74: 201-228.

García-Mendoza, A. y R. Galván. 1995. Riquezas de las familias Agavaceae y Nolinaceae en México. Boletín de la sociedad Botánica de México. 56: 7-24.

Gentry, M.S. 1982. Agaves of Continental North America. The University of Arizona Press, Tucson Arizona. 170 p.

George, E.F. 1993. Plant propagation by tissue culture. The thechnology. Exegetics Ltd. England.

Gómez, R. 1998. Generalidades sobre la embriogénesis somática. Resúmenes del curso Internacional de Propagación Masiva *in vitro* de Especies vegetales Instituto Biotecnología de las plantas. Santa Clara-Cuba. 134 p.

Good-Avila, S.V., Souza, V., Gaut, V.S., y L.E. Eguiarte. 2006. Timing and rate of speciation in Agave (Agavaceae). PNAS. 103(24):9124-9129.

Gray, D. 2000. Nonzygotic embryogenesis. Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises. USA, CRC Press. P. 175 – 190.

Gray,W.M. 2004. Hormonal regulation of plant growth and development. Biol 2(9):e311.

Groenewald, E.G., Wessels, D.C.J. & A. Koeleman. 1977. Callus formation and subsequent plant regeneration from seed tissue of an Agave species (Agavaceae). Z. Pflazenphysiol 21: 369-373.

Guerrero, C.,Martín-Rufián, M., Reina, J.J. y A. Heredia. 2006. Isolation and characterization of a cDNA ecoding a membrane bound acyl-CoA binding protein from *Agave Americana* L. epidermis. Plant Physiology and Biochemistry 44:85-90-

Guilfoyle, T., Hagen, G., Ulmasov, T. & J. Murfett. 1998. How does auxin turn on genes? Plant Physiol. 118: 341-347.

Halperin, W. 1995. In vitro embriogénesis: some historical issues and unresolved problems. In: In vitro Embriogénesis in plants. (Ed.) Thorpe, T.A. Kluwer Academic, Dordrecht, Netherlands. 1-16.

Hartmann, H.T. & D.E. Kester. 1975. Plant propagation: principles and practices. 3rd ed. Prentice-Hall, Inc. Englewood cliffs, New Jersey. 314-427.

Hazra, S.K., Das, S. & A.K. Das. 2002. Plant regeneration via somatic embryogenesis in *Agave sisalana* Perr. Ex Engelm. *Phytomorphology*, 52:217-222.

Hurtado, M.D.V. y M.M.E. Merino. 1987. Historia del cultivo de tejidos vegetales. Cultivo de tejidos vegetales. Edit. Trillas. 1ª edición. Cap.1:15-17. Cap. 4:48-49.

Hussey, G. 1983. *In vitro* propagation of horticultural and agricultural crops. 111–138. *En: Plant Biotechnology*. Mantell, S. H. and Smith, H. Cambridge Univ. Prensa, Cambridge.

Janick, J., Kitto S.L. & Y.H. Kim. 1989. Production of synthetic seed by desiccation and encapsulation. *In vitro cell Dev Biol* 25: 1167-1172.

Janick, J., Kim, Y-H., Kitto, S. & Y. Saranga, Y. 1993 Desiccated synthetic seed. *En: Redenbaugh K (Ed) Synseeds*. CRC Press, Boca Raton. 11–33.

Jiménez, C. 1999. Inducción de embriogénesis somática en papayo (*Carica papaya* Linnaeus) cultivar PT-101-B. Tesis. Universidad Nacional Agraria La Molina. 82 p.

Krikorian, A. y Berquam, D. 1969. *Revista botánica*. 35 p.

Krikorian, A. 1995. Hormones in Tissue cultured and micropropagation. In *Plant hormones. Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. Davies Peter J. 2da edición. Kluwer Academic Publisher. Netherlands. 774-796.

Kohlenbach, H. 1985. Fundamental and Applied Aspects of In Vitro Plant Regeneration by Somatic Embryogenesis. En *in vitro* techniques propagation and long term storage. Ed. By A. Shaefer. 101-109.

Leopold, A. & P.E. Kriedemann. 1975. Plant growth and development. McGraw Hill. New York. 545 p.

Linsmaier, E.M. & F. Skoog. 1965. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Pl. Physiol.* 18:100-127.

Litz, R. y R. Jarret. 1991. Regeneración de Plantas en el Cultivo de Tejidos: Embriogénesis Somática y Organogénesis. In CIAT. Roca, W; Mroginski; eds. Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Colombia. p 111-120.

Madrigal-Lugo, R., Pienda, F.E. & J.L. Rodriguez de la O. 1989. Agave. Handbook of Plant Cell Culture, Vol. 5 Ornamental species. Chapter 9. Mc. Graw Hill. New York. 206:227.

Martinez-Palacios, A., Ortega-Larocea, M.P., Chavez, V.M. y R. Bye. 2003. Somatic embryogenesis and organogénesis of *Agave victoriae-reginae*: Considerations for its conservation. *Plant cell. Tissue and organ culture* 74:135-142.

Meins, F. 1986. Determination and morphogenic competence in plant tissue culture. 7-25 pp.

Merkle, S.A., Parrott, W.A. & B.S. Flinn. 1995. Morphogenic Aspects of Somatic Embryogenesis, In: *in Vitro Embryogenesis in Plants*. pp 155-203 T.A. Thorpe(ed.). Kluwer Academic Publisher. Netherlands.155-203.

Mondal, T.K., Bhattacharya, A., Laxmikumaran, M. & P.S Ahuja. 2004. Recent advances of tea (*Camellia sinensis*) biotechnology. Plant cell, tissue and organ culture. 76: 195-254.

Mock, M.C., Martin, R.C. & D.W.S. Mok. 2000. Cytokinins: Biosynthesis, metabolism and perception, In vitro cell. 36:102-107.

Mroginski, L.A. y W.M. Roca. 1993. Establecimiento de cultivo de tejidos vegetales in vitro: Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura tropical. 28:647-649.

Nikam, T.D. 1997. High frequency shoot regeneration in *Agave sisalana*. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 51:225–228.

Nikam, T.D., Bansude, G.M. & K.C. Aneesh Kumar. 2003. Somatic embryogenesis in sisal (*Agave sisalana* Perr. Ex.Engelm). Plant Cell Rep. 22:188-194.

Ornoz, M.R., Roaro, D. N. y I.L. Rodriguez. 1983. Tratado elemental de Botánica. México: Científica Latino Americano Larios. 663-664.

Pierik, R.L. 1987. In vitro Culture of Higher Plants. Martinns Nighoff Publishers Acad. Publish. Group. Netherlands. 326 p.

Phillips, G.C. & G.B. Collins. 1979. In vitro tissue culture of selected legumes and plant regeneration from callus cultures of red clover. Crop Science 19: 59-64

Portillo, L., Santacruz-Ruvalcaba, F., Gutierrez-Mora, A. & B. Rodriguez-Garay. 2007. Somatic embryogenesis in *Agave tequilana* Weber cultivar azul. In vitro cellular and development biology. 569-575

Powers, D.E. y R.A. Backhaus. 1989. *In vitro* propagation of *Agave arizonica* Gentry weber. *PI. Cell Tissue Organ Cult.* 16:57-60.

Redenbaugh, K. 1990. Application of Artificial Seed to Tropical Crops. *HortScience* 25: 251-255.

Redenbaugh, K. 1993. Synseeds, Application of Synthetic Seeds to Crop Improvement. CRC Press, Roca Raton, USA. 481 p.

Retamal, N., Duran, J.M. & J. Fernandez. 1987. Seasonal variation of chemical composition of prickly pear (*Opuntia ficus-indrca*). *Journal of science of food and Agriculture.* 38: 303.

Robert, M. L., J.L. Herrera, F. Contreras & K.N. Scorer. 1987. *In vitro* propagation of *Agave fourcroydes* Lem (Henequen). *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 8:37–48.

Robert, M.L., Herrera Herrera, J.L., Herrera Alamillo, M.A., Quijano-Ramayo, A. & E. Balám. 2004. Manual for de *in vitro* culture of agaves. Common fund for commodities. Technical paper no. 38. United nations industrial development organization Vienna 2004.

Rodriguez, D.L., Kitto, S.L. & K.M. Lomax. 1990. Mechanical putrefaction of torpedo stage somatic embryos of *Daucus carota*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 23: 9–14.

Rodríguez-Garay, B., Gutiérrez-Mora, A., & B. Acosta-Dueñas. 1996. Somatic embryogenesis of *Agave victoria-Reginae* Moore. *Plant cell, Tissue and Organ Culture.* 46: 85-87.

Romero-Tepal, E.M. 2009. Evaluación de reguladores de crecimiento vegetal en semillas y plántulas de agave pulquero (*Agave atrovirens* Karw. Ex Salm-Dick) y su aplicación en un sistema de propagación. Tesis de Maestría de CIBA-IPN, Tlaxcala.

Ruvalcaba J.M. 1983. El maguey manso. Universidad Autónoma Chapingo; México. 122 p.

Sannasgala K. 1989. *In vitro* somatic embryogenesis in *Musa*. PhD Thesis, KULeuven, Belgica. 189pp.

Santacruz, R.F., Gutierrez, H. & B. Rodriguez. 1999. Efficient *in vitro* propagation of *Agave parrasana* Berger. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 56:163-167.

Schenk, R.V. & A.C. Hildebrandt. 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can. J. Bot.* 50:119-204.

Smith, M.K. & R.A. Drew. 1990. Growth and yield characteristics of dwarf off-types recovered from tissue-cultured bananas. *Aust. J. Exp. Agric.* 30: 575-578.

Stasolla, C. 2006. Somatic embryogenesis in *Picea* suspensión cultures. *Methods in molecular Biology. Plant cell culture protocols*. 318: 87-99.

Street, H.E. 1979. Embryogenesis and chemically induced organogenesis. En: *Plant Tissue and Cell Culture. Principals applications*. Columbus University. 127-153.

Skoog, F. & C.O. Miller. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultures *in vitro* . *Symp. Soc. Exp. Biol.*11:118–131.

Tremblay, F.M. 1990. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from embryos isolated from stored seeds of *Picea glauca*. *Canadian Journal of Botany* 68: 236–242.

Toribio-Romero, H. 2005. Comportamiento de explantes de Agave pulquero (*Agave atrovirens*) en la interacción de dos reguladores de crecimiento. Tesis para obtener el grado de Maestro en Tecnología Avanzada. Instituto Politécnico Nacional.

Valenzuela A. 1997. El agave tequilero, su cultivo e industria. Litteris editores. 204 p.

Valenzuela, S.K., Juarez, H.R., Cruz, H.A, Olalde, P.V., Valverde, M. & L.O. Paredes. 2006. Plant regeneration of Agave tequilana by indirect organogénesis. *In vitro and Development Biology Plant*. 42(4):336-340.

Vasil, V. & I.K. Vasil. 1994. Induction and maintenance on embryogenic callus cultures of *gramineae*. 36-42 pp.

Villalobos, A.V.M., Mejia-Muñoz, J.M. & H.A. Escobar-Arraya. 1993. Micropropagation de opuntias y agaves en: Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. Roca, William M., y Mroginski. Luis M. edit. Centro Internacional de Agricultura Tropical. 28:647-649.

Wareing, R.F. & I.D. Phillips. 1973. The control of growth and differentiation in plants. Pergamon press. UK

Went, F.W. & K.V. Thimann. 1937. Phytohormones. Macmillan, New York. 294 pp.

Williams, E.G. & G. Maheswaran. 1986. Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryonic group. *Annals of Botany* 57: 443-462.

Yoeman, M.M. & A.J. Macleod. 1977. Tissue (callus) cultures-techniques. Ed. H.E. USA. 31-32.

Zaffari, G.R., Peres, L.E.P. & G.B. Kerbauy. 1998. Endogenous levels of cytokinins, IAA, ABA and pigments in variegated somaclones of micropropagated banana leaves. *J. Plant Growth Regulation*. 17:59-61.

III. ANEXOS

ANEXO 1. Composición del medio de cultivo Murashige & Skoog 1963.

	<i>mg/L</i>	<i>mM</i>
Macroelementos		
NH ₄ NO ₃	1650	20.60
KNO ₃	1900	18.80
CaCl ₂ •2H ₂ O	440	3.00
MgSO ₄ •7H ₂ O	370	1.50
KH ₂ PO ₄	170	1.25
Na ₂ EDTA	37.30	0.10
FeSO ₄ •7H ₂ O	27.80	0.10
Microelementos	mg/L	μM
H ₃ BO ₃	6.20	100
MnSO ₄ •4H ₂ O	22.30	100
ZnSO ₄ •7H ₂ O	8.60	30
KI	0.83	5
NaMoO ₄ •2H ₂ O	0.25	1
CuSO ₄ •5H ₂ O	0.025	0.1
CoCl ₂ •6H ₂ O	0.025	0.1
Componentes orgánicos	mg/L	μM
Inositol	100	555.10
Ácido nicotínico	0.5	4.06
Pirodixina	0.5	2.43
Thiamina	0.1	0.30
Glicina	2.0	26.60
Sacarosa	30,000	87.64 mM
pH	5.7-5.8	

ANEXO 2. Composición del medio de cultivo Arnold & Eriksson 1981.

	<i>mg/L</i>
Macroelementos	
NH ₄ NO ₃	1200
KNO ₃	1900
CaCl ₂ •2H ₂ O	180
MgSO ₄ •7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
Microelementos	mg/L
H ₃ BO ₃	0.63
MnSO ₄ •4H ₂ O	2.20
ZnSO ₄ •7H ₂ O	4.1
KI	0.75
NaMoO ₄ •2H ₂ O	0.025
CuSO ₄ •5H ₂ O	0.0025
CoCl ₂ •6H ₂ O	0.0025
Iron Stock	mg/L
FeSO ₄ •7H ₂ O	5.57
Na ₂ EDTA	12.85
Componentes orgánicos	mg/L
Inositol	500
Ácido nicotínico	2
Pirodixina	1
Thiamina	5