UNIVERSIDAD DE SONORA

DEPARTAMENTO DE AGRICULTURA Y GANADERIA

MAESTRIA EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

PROPAGACION *in vitro* DE *Agave pacifica* TREL. (MAGUEY DE BACANORA) PARA SU CONSERVACION, REPOBLACION Y CULTIVO COMERCIAL

SERGIO FRANCISCO MORENO SALAZAR

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

HERMOSILLO, SONORA. AGOSTO DE 1995

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON

"El saber de mis hijos hará mi grandeza"

Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

Esta tesis se realizó bajo la dirección del Consejo Particular y fué aceptada como requisito parcial para la obtención del grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

CONSEJO PARTICULAR

DIRECTOR: _____

M. C. DAMIÁN MARTÍNEZ HEREDIA

ASESOR: _____

DR. JAIME JAVIER MARTÍNEZ TELLEZ

ASESOR: _____

M. S. ALFREDO SERRANO ESQUER

DEDICATORIAS

Este trabajo está dedicado con Amor y Cariño a:

Mi Familia:

Ingrid Rebeca

Giselle Rebeca y Jennifer

A mis Padres:

Héctor Armando y Josefina

A mis hermanos

A mis amigos

AGRADECIMIENTOS

El agradecimiento es la memoria del corazón
Proverbio francés

Deseo expresar mi mas sincero reconocimiento a las personas e Instituciones que hicieron posible la culminación de este esfuerzo.

Al Centro de Investigación y Desarrollo de los Recursos Naturales (CIDESON), a través de su Director general M. I. Martín Alberto Delgado Saldívar y su Director de investigación M. C. Juan Carlos Barrera Guevara. Su apoyo moral y económico fue vital para el logro de esta meta.

Al Departamento de Agricultura y Ganadería (DAG) de la Universidad de Sonora.

A los profesores de la Maestría en Ciencias en Horticultura por compartir sus valiosas experiencias y conocimientos.

A los integrantes del consejo académico de esta tesis: M. C. Damián Martínez Heredia, director de este trabajo por su valiosa asesoría y todo el apoyo brindado, asimismo a los profesores: M. S. Alfredo Serrano Esquer y Dr. Jaime Javier Martínez Tellez por la minuciosa revisión del trabajo escrito y acertadas recomendaciones.

A los compañeros: Ecol. Martín Sau Cota e I. Q. Gustavo Canizalez C. por su ayuda desinteresada en el manejo de fotografías y mapa.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
INDICE DE CUADROS	v
INDICE DE FIGURAS	viii
RESUMEN	ix
ABSTRACT	xi
INTRODUCCION	1
OBJETIVOS	4
General	4
Particulares	4
LITERATURA REVISADA	6
Algunos aspectos sobre el género ***Agave***	6
Clasificación	6
Descripción botánica	6
Metabolismo y adaptación a los ambientes áridos	7
Usos e importancia económica de las plantas de agave	8
Agave como alimento	8
Fuente de fibras	9
Usos medicinales y diversos	10
Agaves como fuente de bebidas	11
Pulque	11
Tequila y mezcal	12
El bacanora	13
Agaves cultivados en México	15
El ***Agave pacifica***	16
Reproducción de ***Agave pacifica***	18
Aspectos generales sobre el cultivo de tejidos	21
Tipos de explantes utilizados	23
Manipulación del material vegetal	24
Esterilización de los explantes	24
Factores que afectan el crecimiento y desarrollo de plantas *in vitro*	26
Constitución genética de la planta	26
Medios de cultivo	26
Factores físicos	30

Micropropagación 30
Técnicas de micropropagación 33
Multiplicación de nudos simples 33
Multiplicación mediante rebrotes axilares y apicales 34
Cultivo de meristemos 36
Multiplicación de brotes adventicios 37
Multiplicación a través de tejido de callo 40
Etapas de la micropropagación 41
Etapa I (establecimiento del cultivo) 41
Etapa II (multiplicación) 41
Etapa III (transferencia a su ambiente normal) 41
Propagación *in vitro* de algunas especies del género ***Agave*** 42
Importancia de la propagación *in vitro* en agaves 42
Micropropagación en ***Agave*** 44

MATERIAL Y METODOS 47
Material vegetal utilizado 47
Obtención y esterilización superficial de los explantes 47
Explantes de hojas 47
Explantes de tallo 47
Explantes de rizomas 48
Esterilización 48
Obtención de explantes a partir de plántulas 48
Sembrado 49
Métodos de multiplicación en estudio 50
Proliferación de brotes adventicios 50
Variable respuesta 50
Multiplicación a través de tejido de callo 50
Variable respuesta 51
Incubación 51
Enraizamiento y aclimatación 52

RESULTADOS Y DISCUSION 54
Proliferación de callo 54
Velocidad de aparición o inducción 54
Biomasa del callo formado 60
Calidad del callo formado 62
Número de brotes regenerados a partir del callo 64
Proliferación de brotes adventicios 68
Enraizamiento y aclimatación 70

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES 78

BIBLIOGRAFIA 83
APENDICE (INDICE DE CUADROS) 87

INDICE DE CUADROS

Número	Título	Página
Cuadro 1.-	Composición de los medios de cultivo evaluados en la propagación *in vitro* de ***A. pacifica***.	88
Cuadro 2.-	Prueba de Kruskal-Wallis para evaluar el efecto de 2 medios de cultivo (Gamborg y MS), 3 niveles de 2,4-D, 3 niveles de BA y 2 tipos de explantes (raíces y tallos de plántulas), sobre el número de días requeridos para la aparición de callo.	89
Cuadro 3.-	Prueba de Tukey con un nivel de significancia de 5% para medir la influencia de los 2 medios de cultivo, sobre el número de días requeridos para la aparición de callo.	90
Cuadro 4.-	Prueba de Tukey con un nivel de significancia de 5% para medir la influencia de los 2 tipos de explante, sobre el número de días requeridos para la aparición de callo.	91
Cuadro 5.-	Prueba de Tukey con un nivel de significancia de 5% para medir la influencia de las 3 concentraciones de auxina (2,4-D), sobre el número de días requeridos para la aparición de callo.	92
Cuadro 6.-	Prueba de Tukey con un nivel de significancia de 5% para medir la influencia de las 3 concentraciones de citocinina (BA), sobre el número de días requeridos para la aparición de callo.	93
Cuadro 7.-	Prueba de Tukey con un nivel de significancia de 5% para medir la influencia de las 3 concentraciones de auxina (2,4-D), sobre el número de días requeridos para la aparición de callo en tejido de raíz.	94

Cuadro 8.- Prueba de Tukey con un nivel de significancia de 5% para medir la influencia de las 3 concentraciones de auxina (2,4-D), sobre el número de días requeridos para la aparición de callo en tejido de tallo. 95

Cuadro 9.- Prueba de Kruskal-Wallis para evaluar el efecto de 2 medios de cultivo (Gamborg y MS), 3 niveles de 2,4-D, 3 niveles de BA y 2 tipos de explantes (raíces y tallos de plántulas), sobre la biomasa de callo producida en 5 semanas de subcultivo. 96

Cuadro 10.- Prueba de Tukey con un nivel de significancia de 5% para medir la influencia de los 2 medios de cultivo, sobre la biomasa de callo producida en 5 semanas de subcultivo 97

Cuadro 11.- Prueba de Tukey con un nivel de significancia de 5% para medir la influencia de los 2 tipos de explante, sobre la biomasa de callo producida en 5 semanas de subcultivo. 98

Cuadro 12.- Prueba de Tukey con un nivel de significancia de 5% para medir la influencia de las 3 concentraciones de auxina (2,4-D), sobre la biomasa de callo producida en 5 semanas de subcultivo. 99

Cuadro 13.- Prueba de Tukey con un nivel de significancia de 5% para medir la influencia de las 3 concentraciones de citocinina (BA), sobre la biomasa de callo producida en 5 semanas de subcultivo. 100

Cuadro 14.- Características de calidad observadas en los callos obtenidos en los diferentes tratamientos. 101

Cuadro 15.- Prueba de Kruskal-Wallis para evaluar el efecto de 2 medios de cultivo (Gamborg y MS), 3 niveles de 2,4-D, 3 niveles de BA y 2 tipos de explantes (raíces y tallos de plántulas), sobre el número de brotes regenerados a partir de callo, a los 5 meses de subcultivo. 102

Cuadro 16.- Prueba de Tukey con un nivel de significancia de 5% para medir la influencia de los 2 medios de cultivo, sobre el número de brotes regenerados a partir de tejido de callo. 103

Cuadro 17.- Prueba de Tukey con un nivel de significancia de 5% para medir la influencia de los 2 explantes, sobre el número de brotes regenerados a partir de tejido de callo. 104

Cuadro 18.- Prueba de Tukey con un nivel de significancia de 5% para medir la influencia de las 3 concentraciones de 2,4-D, sobre el número de brotes regenerados a partir de tejido de callo. 105

Cuadro 19.- Prueba de Tukey con un nivel de significancia de 5% para medir la influencia de las 3 concentraciones de BA, sobre el número de brotes regenerados a partir de tejido de callo. 106

INDICE DE FIGURAS

Número	Título	Página
Figura 1.-	Diagrama de bloques para el aprovechamiento integral de las plantas del género ***Agave***.	17
Figura 2.-	Distribución de ***Agave pacifica*** por Municipios en el Estado de Sonora.	19
Figura 3.-	Comunidad de plantas de ***Agave pacifica.***	20
Figura 4.-	Formas de reproducción de ***Agave pacifica***: (A) por semillas, (B) vía asexual por bulbillos y (C) vía asexual por rizomas.	22
Figura 5.-	Fuentes de explante y algunos de los explantes probados en el presente estudio.	53
Figura 6.-	Brotes de ***A. pacifica***, regenerados a partir de callo proveniente de segmentos de tallos de plántulas	67
Figura 7.-	Número de brotes adventicios regenerados a partir de tejido de tallo de plantas juveniles.	71
Figura 8.-	Número de brotes adventicios regenerados a partir de tejido de rizoma de plantas juveniles.	72
Figura 9.-	Número de brotes adventicios regenerados a partir de tejido de tallo de plántulas.	73
Figura 10.-	Brotes adventicios regenerados directamente de tejido de tejido de rizoma.	74
Figura 11.-	Brotes adventicios regenerados directamente de tejido de tallo de plántulas.	75
Figura 12.-	Plantas regeneradas y aclimatadas creciendo a las condiciones de la región.	77

RESUMEN

Ante la inminente industrialización del bacanora y dado que la población silvestre de ***Agave pacifica*** es insuficiente para satisfacer la demanda actual de esta bebida, urge el desarrollo de nuevas técnicas de propagación que permitan la multiplicación masiva de esta especie. En este sentido, en el presente trabajo se estudiaron 2 métodos de micropropagación: a) la formación de brotes adventicios directamente de los explantes y b) la regeneración de brotes a partir de tejido de callo. En la proliferación de brotes adventicios directamente de los explantes, se utilizó el medio MS modificado conteniendo 18 mM de NO_3^- y 5 mM de NH_4^+ y se evaluó la capacidad de 5 distintos tipos de explantes en tres niveles de benciladenina: 5, 10 y 15 mg/l; mientras que en la multiplicación a partir de tejido de callo se probó la influencia de dos medios de cultivo: MS y Gamborg, tres niveles de 2,4-D: 1.13, 2.26 y 3.39 μM, tres niveles de BA: 2.22, 4.44 y 6.66 μM, además de 5 diferentes explantes, sobre la inducción a la formación, producción de biomasa del callo, la regeneración de órganos y la formación de brotes a partir del callo. La inducción a la formación de callo duró entre 5 y 11 días (dependiendo del tratamiento), la velocidad de aparición de callo fue mayor en tejido de raíz que en tallo. Se observó además que a medida que se incrementó el contenido de 2,4-D en el medio de cultivo, se redujo el tiempo necesario para la aparición del callo y se incrementó la biomasa del callo producida. Los tratamientos que presentaron mejores resultados se dieron en tejido de tallo sembrado en MS conteniendo 3.39 μM de 2,4-D. En cuanto a la calidad del callo se observó que los tejidos

de tallo fueron mejores que los de raíz, observándose mejores respuestas en cuanto a color y textura de *callo*, además de una mayor respuesta a la organogénesis. En cuanto al número de brotes obtenidos, se encontraron diferencias significativas entre los niveles de todas las variables. Se observó un mayor número de brotes en el medio MS, en tejido de tallo, bajos niveles de 2,4-D (1.13 μM) y altos niveles de BA (6.66 μM)., obteniéndose hasta 12 brotes, durante 6 meses de subcultivo. Por otro lado, en lo que respecta a la técnica de proliferación de brotes adventicios, se observó que el tejido de rizoma y tallo de plantas juveniles responden bien a los diferentes tratamientos, mostrando una proliferación de brotes a las 4-5 semanas después de iniciado el cultivo. En el caso de los segmentos de tallo de plántulas, la proliferación de los brotes, inició entre las 5-6 semanas iniciales de cultivo. En los 3 casos las mejores respuestas se observaron a los niveles de 5 y 10 mg/l (23.2 y 46.4 μM) de BA.

ABSTRACT

In the presence of imminent bacanora industry development and assuming that the wild population of ***Agave pacifica*** is insufficient to satisfy the current demand of this beverage, it is urgent that new techniques of propagation are developed, tending to the mass multiplication of plants of this specie. At present work two methods of micropropagation had been studied: a) adventitious shoot formation directly from explants and b) shoot regeneration through callus culture. In the proliferation of adventitious shoots, MS modified media containing 18 mM NO_3^- and 5 mM NH_4^+ was utilized and the ability of five explant sources at three levels of BA (5, 10 and 15 mg/l), was evaluated; while in the multiplication of shoots through callus culture two culture media: MS and Gamborg, at three levels of 2,4-D: 1.13, 2.26, 3.39 μM, three levels of BA: 2.22, 4.44 and 6.66 μM and five different types of explants were tested, and as response variables callus induction, callus growth, organ regeneration and shoot formation were evaluated. The induction period was 5-11 days (depending on treatment). The callus appearing rate was significantly higher in root explants than stem segments and better responses were observed at higher 2,4-D content. The better treatments were plantlet stem tissue explanted in MS media supplemented with 3.39 μM 2,4-D. In respect to callus quality, it was observed that plantlet stem tissue was better than root tissue, showing better responses in the color and texture of callus in addition to having highest response to organogenesis. In relation to the number of shoots regenerated from tissue callus, significant differences in levels of all variables tested were

found. The highest shoot number was obtained in stem plantlet tissue explanted in MS media containing the lowest level of 2,4-D (1.13 μM) and higher BA concentrations (4.44 and 6.66 μM). In these treatments there were obtained an average of 12 shoots for six months of subculture. In respect to adventitious shoots multiplication, it was observed that the best explant sources were rhizomes and stems from plants and stems from plantlets, showing a proliferation of shoot in 4-5 weeks after the culture was started. In the three explants the better results were observed at 5 and 10 mg/l (23.2 and 46.4 μM) BA. On the other hand, the root tissue of plantlets showed only a tendency for callus formation and the hypocotyls had neither of these responses.

INTRODUCCION

Existen evidencias de que algunas tribus indígenas del Noroeste de México y del Suroeste de EUA, cultivaban algunas especies de ***Agave*** con fines de aprovechamiento (Colunga y May, 1993). En Sonora una de las especies más importantes, es el ***Agave pacifica***. Esta planta, ha sido aprovechada durante siglos en la elaboración de una bebida alcohólica tipo "mezcal", ampliamente aceptada en la región por su sabor característico. Esta bebida se ha denominado "bacanora" y a la planta de la cual se obtiene "maguey de bacanora".

A pesar de lo anterior, actualmente el cultivo del maguey de bacanora no ha sido estudiado a profundidad; solo algunos productores de bacanora han mantenido por años pequeñas parcelas de ***A. pacifica*** en condiciones de temporal.

En 1977, se hicieron los primeros esfuerzos por estudiar el cultivo del maguey de bacanora, cuando las autoridades gubernamentales de aquella época habían planteado la idea de legalizar la producción de la bebida de bacanora. Sin embargo, el proyecto fue abandonado una vez que se hizo patente el hecho de que la planta requiere de un período mínimo de 7 años desde la siembra de sus "retoños" o "hijuelos" hasta la cosecha de las "cabezas" maduras del maguey.

En junio de 1992, ante la necesidad de reactivar la economía de las zonas serranas del Estado de Sonora, las cuales se encuentran afectadas por una severa escasez de empleo y migración, la actual Administración, aplicó una serie de reformas de ley con las cuales se estipuló la legalización de la producción, industrialización y venta al público del bacanora.

Ante esta situación y dado que no existe una población de ***Agave***, suficiente para satisfacer la producción actual y que su legalización y posible industrialización incrementará notablemente su demanda, urge desarrollar la tecnología de su cultivo, pero sobretodo, es de vital importancia el desarrollo de nuevas técnicas de propagación que permitan una rápida reproducción de clones de ***A. pacifica*** y obtener suficiente material para su repoblación y cultivo, de tal forma que el daño a la población silvestre de la especie sea menos drástico.

La reproducción del ***Agave pacifica***, se realiza de 2 formas: asexual y sexual. La asexual es mediante retoños que nacen en la base o bien mediante propágulos que brotan eventualmente a partir de la inflorescencia, cada retoño es genéticamente igual a la planta madre y se puede trasplantar para dar origen a una nueva planta. Este método es sumamente lento ya que cada planta empieza a producir "hijuelos" hasta la edad de 3 años en adelante y solo produce un promedio de 6 plántulas por cada planta adulta. Por otra parte, la reproducción sexual se realiza a base de semillas y si bien es cierto que cada planta produce una gran cantidad de semillas, este procedimiento presenta las desventajas de bajos índices de germinación y las plantas están sujetas a una alta variabilidad genética.

Una técnica de propagación alternativa que permitiría obtener clones de ***A. pacifica*** con una alta velocidad de multiplicación, puede ser el cultivo de células y/o tejidos vegetales.

El cultivo de tejidos vegetales *in vitro*, consiste en cultivar pequeños segmentos de las plantas (explantes) sobre medios sintéticos estériles bajo condiciones controladas, con el propósito de regenerar plantas enteras. Esto se puede lograr a partir de casi cualquier parte de la planta: meristemos, tallo, raíz, hojas, inflorescencias, pétalos, polen, embriones, etc. (Perea y Navarro, 1988). Incluso, se pueden obtener plantas completas a partir de células aisladas o protoplastos en suspensión, siempre y cuando dichas células conserven su capacidad para reasumir su actividad meristemática (Robert, 1985)

En el presente trabajo se estudiaron 2 métodos de micropropagación: la formación de brotes adventicios directamente de los explantes y la regeneración de brotes a partir de tejido de callo. El primero de ellos orientado hacia la producción masiva de la especie y el segundo se plantea como una metodología alterna para la propagación y la inducción de variación somaclonal en programas futuros de mejoramiento genético.

OBJETIVOS

General

Este trabajo tiene como finalidad establecer una metodología para la propagación masiva de la planta de ***Agave pacifica***, mediante las técnicas de cultivo de tejidos y esta orientado hacia la obtención de germoplasma con fines de manipulación genética y cultivo intensivo para su explotación industrial, así como para repoblación en su hábitat natural.

Particulares

Probar dos métodos de micropropagación: la proliferación directa de brotes adventicios a partir de los explantes y la regeneración de plantas a partir de callo.

Evaluar la capacidad de 5 tipos de explantes (segmentos de tallo y rizomas de plantas juveniles, así como trozos de tallo, hojas y raíces de plántulas) y tres niveles de benciladenina (BA): 5, 10 y 15 mg/l, sobre la proliferación de rebrotes adventicios a partir del explante mismo sin pasar por callo.

Además, probar el efecto de dos distintos medios de cultivo: Murashige & Skoog (MS) y Gamborg (B-5), tres niveles de ácido 2,4-diclorofenoxi-acético (2,4-D): 1.13, 2.26 y 3.39 μM, tres niveles de BA: 2.22, 4.44 y 6.66 μM, y 5 diferentes tipos de explantes (segmentos de raíces, tallo, hojas e hipocotilo obtenidos a partir de plántulas y segmentos de hojas obtenidos de plantas juveniles), sobre la inducción a la formación de callo, la regeneración de órganos y la formación de brotes a partir del tejido de callo.

Por último, aclimatar el material vegetal obtenido a las condiciones ambientales de la región.

LITERATURA REVISADA

Algunos Aspectos Sobre el Género *Agave*

Clasificación

El género ***Agave*** perteneciente a la familia Agavaceae en el orden de las Asparagales (Dahlgren, *et al*, 1985; citado por Robert, *et al*, 1992), se divide en 2 subgéneros *Littaea* y *Agave*, y comprende 136 especies.

El centro de origen y diversidad del ***Agave*** ha sido delimitado a México, sin embargo desde el siglo XVII los agaves han sido distribuidos en todas las áreas subtropicales del mundo, principalmente con propósitos ornamentales (Robert, *et al*, 1992).

Descripción botánica

Algunas especies de ***Agave*** pertenecientes al grupo Policephalae, son plantas policárpicas y perennes que florean repetidamente a partir de ejes excéntricos al eje principal; pero la mayoría de las especies son multianuales con un ciclo de vida entre 5 y 20 años, al final del cual la planta florea, libera sus semillas y muere.

En general las plantas de agave son de cáudice relativamente leñoso, sus pencas son suculentas, muy numerosas y están colocadas en forma de espiral formando una roseta basal. Generalmente los márgenes de sus pencas están armados con dientes rígidos y sus ápices en la mayoría de los casos terminan en una espina fuerte y rígida. Sus raíces son duras y fibrosas, su inflorescencia es alta, bracteada, racimosa o paniculada con flores en racimos umbelados (Gentry, 1982).

Metabolismo y adaptación a los ambientes áridos

Aunque el grado de adaptabilidad varía considerablemente, la mayoría de los agaves están muy bien adaptados a los ambientes áridos. La forma y distribución de las hojas, les ayuda a capturar la poca agua de lluvia disponible de una manera mas eficiente (Gentry, 1982).

Sin embargo la principal característica de adaptación, es que los agaves poseen el metabolismo ácido de las crasuláceas (MAC), el cual le permite efectuar la fotosíntesis y sobrevivir en condiciones de extrema sequía. Este metabolismo está asociado a un estricto control estomático, que hace que los estomas abran durante la noche para fijar el CO_2 atmosférico con el ácido fosfoenolpirúvico y formar ácido málico, luego durante el día los estomas se cierran para evitar la transpiración excesiva y el ac. málico se transforma en ac. pirúvico, que luego pasa a carbohidratos y almidón mediante el proceso fotosintético. Otro factor importante que contribuye a evitar la transpiración, es la gruesa capa de cutícula que cubre las pencas de las plantas. Esta cubierta es transparente a fin de permitir la captura de energía solar para el proceso de fotosíntesis (Nobel, 1983; Nobel, 1976; Nobel and Hartsock, 1981).

Usos e importancia económica de las plantas de *Agave*

Desde épocas prehistóricas, las plantas del género Agave, tradicionalmente han provisto de alimento, fibras y bebidas a diferentes comunidades indígenas de América (García and Nobel, 1990; Nobel, 1990).

Agave como Alimento

En la década de 1950 a 1960, la Peabody Foundation en sus expediciones arqueológicas en México, reportaron mediante un análisis de coprolitos (heces humanas momificadas) que el hombre Mesoamericano incluía en su dieta plantas del género ***Agave***.

La principal fuente de alimentos en agaves es la suave, blanca y almidonosa parte meristemática del tallo, además de las bases de las hojas excluyendo la parte verde. Conforme la planta madura, el contenido de azúcar en esta parte del tallo aumenta, incrementando a su vez su palatabilidad. Algunas especies y variedades tienen mejor sabor que otras y en general se deben evitar las que contengan altas concentraciones de sapogeninas u otras sustancias tóxicas.

Otra parte comestible en la mayoría de las especies es el tallo floral cuando está en su fase tierna y turgente y en algunos casos las flores también llegan a consumirse (Gentry,1982).

Generalmente, los agaves se preparaban cociendo las "cabezas" (parte basal de la planta a la cual previamente se le han eliminado sus hojas) sobre rocas calentadas por brasas en combustión y colocadas en grandes fosas, para obtener un producto dulce y nutritivo. También se preparaba una bebida dulce, hirviendo en agua los pedazos de agave cocido y en ocasiones esta bebida se dejaba fermentar para obtener un licor para beber durante las ceremonias y rituales (Canizales,*et al*, 1995).

En Tehuacán y sus alrededores se ha reportado el consumo de flores cocidas en agua y mas comúnmente el consumo de flores "capeadas" con huevo, mientras que en Saltillo Coahuila se ha elaborado pan con sabor a pulque y se ha obtenido vinagre y alcohol a partir del pulque (licor obtenido de la fermentación del ***Agave salmiana***).

Por otra parte en San Luis Potosí, se ha reportado el uso de ***A. salmiana*** como forraje para vacas lecheras y en Baja California el empleo de las panículas florales de ***A. shawii*** y ***A. goldmaniana*** para novillos estabulados (Gentry, 1982).

Fuente de Fibras

Las fibras de agaves, fueron ampliamente utilizadas por las culturas indígenas de Mesoamérica en la confección de diversos productos como: cordelería, redes, bolsas, cestos, petates, mantas, vestimenta, sandalias, soportes de alfarería, adornos para trenzas y otros objetos misceláneos tejidos como cepillos para el cabello, brochas para pintura, agujas e hilos, cuerdas

para pescar, escudos, lanzas, instrumentos musicales y objetos ceremoniales (Castetter, *et al*, 1938; citado por Gentry, 1982).

En el presente siglo, con el desarrollo de las técnicas de cultivo y maquinaria para la cosecha las fibras de agaves dieron origen a una creciente industria.

El ***A. sisalana***, la fuente de fibras de sisal fue introducida a Estados Unidos vía Florida, proveniente de varios países de Africa, Asia y Brasil. Esta especie, actualmente suministra el 70% de las fibras duras largas a nivel mundial, mientras que las fibras de henequén obtenidas a partir del ***A. fourcroydes*** suministran apenas el 15%. La razón es que la producción de henequén ha permanecido confinada a ciertos estados del sureste de México y algunas islas adyacentes del Caribe. El 90% de la producción de henequén es de origen Mexicano (Gentry,1982; McLaughlin and Schuck, 1991; Osborne and Singh, 1980).

Usos Medicinales y Diversos

Solo algunos componentes químicos presentes en las hojas de ciertas plantas del género ***Agave*** han sido identificados, pero se sabe que las tribus indígenas de América usaban dichas hojas como cataplasma en el tratamiento de sarna, úlceras, contusiones y heridas. El jugo de las hojas de algunos especies de ***Agave*** fue utilizado como veneno contra peces por los indios Tarahumara de México y como veneno en las flechas para cacería y guerra; además fue ampliamente utilizado por mucho tiempo como jabón en México.

Se sabe que las hojas contienen sapogeninas, esteroles, terpenos y vitaminas. La hecogenina obtenida a partir de los agaves cultivados para fibra y la esmilagenina extraída a partir de ***A. vilmoriniana***, son dos importantes producto químicos de alto valor comercial, dado que pueden ser utilizados como iniciadores en la elaboración de drogas esteroidales, cortisona y algunas hormonas sexuales (Gentry, 1982; Indrayanto, *et al*, 1993; Sharma and Khana, 1980; Texeira, *et al*, 1989;).

Agaves como fuente de bebidas

Los agaves producen dos clases distintas de bebidas. La primera de ellas comprende a un extracto obtenido de plantas vivas y consumido en fresco, el cual se conoce como aguamiel, además de un licor fermentado conocido como pulque. La segunda clase es un licor destilado que ha sido denominado como mezcal o tequila. Este licor fue desarrollado posteriormente a la ocupación Española en México.

Pulque. El pulque se ha producido desde épocas prehistóricas, no obstante su consumo se ha mantenido como local y endémico; pero su importancia estriba en que fue un producto básico para las antiguas civilizaciones de México y por lo tanto motivó el cultivo de los agaves en México. La principal especie utilizada en la producción de pulque es el ***A. salmiana***, que es el maguey mas ampliamente cultivado; siendo los principales Estados productores Puebla y Tlaxcala, con poca profusión en Michoacán, Aguascalientes y San Luís Potosí. Otras especies pulqueras son ***A. mapisaga, A. atrovirens, A. ferox, A. hookery*** y ***A. americana*** (García and Nobel, 1990; Gentry, 1972 y 1982).

Tequila y Mezcal. Estos son los nombres genéricos asignados a las bebidas alcohólicas obtenidas de las destilación del producto fermentado de las cabezas (meristemo y base de las hojas) de ciertos agaves. El tequila se produce principalmente en Jalisco, mientras que el mezcal es originario de Oaxaca. La manufactura del tequila en Jalisco data de más de 150 años, en compañías bien establecidas en el poblado de Tequila (de donde el producto toma su nombre) y sus alrededores y aunque cada compañía fabrica tequilas con diferentes grados de calidad, todos los productos son obtenidos a partir de algunas variedades cultivadas de ***Agave tequilana*** Weber.

A través de los años, la producción de tequila se ha consolidado como una de las principales industrias de Jalisco; en 1993, la fuerza de trabajo empleada fue de 23230 trabajadores; mientras que la producción fue de 69 503 254 l de producto a 55 °G L. Este producto se consume en varias partes del mundo y es reconocido como una bebida de calidad que ha alcanzado la cima en sus exportaciones, en 1993 se exportaron 47 338 232 l de tequila, representando el 68.11% del total producido ese año (Muñoz, 1994).

En lo que respecta al mezcal, es un producto destilado obtenido principalmente de la fermentación alcohólica de las cabezas de ***Agave potatorum***, cultivado en Oaxaca. Esta bebida también tiene gran aceptación en el mercado, aunque sus niveles de consumo y exportación están muy por debajo de los del tequila, principalmente por la falta de sistemas adecuados de promoción y mercadotecnia y porque su procesamiento aún continúa siendo artesanal (Gentry, 1972 y 1982).

El Bacanora.

Uno de lo mezcales mas famosos de México, es el "bacanora", producido en el Estado de Sonora. Esta bebida toma su nombre del poblado Bacanora, situado en la sierra Sonorense, en las cercanías de Sahuaripa.

El bacanora es una bebida regional elaborada en el noroeste de México, particularmente en las zonas serranas del Estado de Sonora. Dicha bebida se obtiene mediante la destilación del producto de la fermentación alcohólica de los azúcares contenidos en las "cabezas" de ***Agave pacifica,*** Trel. (Canizales, *et al*, 1995) . El bacanora es un destilado transparente de olor y sabor característicos, distintos de otros productos destilados de agave como el tequila y el mezcal, fabricados en el centro y sur del país. Estas características distintivas son atribuidas principalmente a la composición bioquímica del ***Agave pacifica***, al tipo de microorganismo fermentador, al método empleado en su elaboración y a las condiciones climatológicas imperantes en Sonora.

Los misioneros jesuitas que se establecieron en la región en el siglo XVIII, describieron las costumbres de los indígenas con quienes convivieron y atribuyen a la etnia de *los ópatas* como los que elaboraban esta bebida fermentada. No obstante, dado que las culturas prehispánicas no conocían la técnicas de destilación, el origen del bacanora se dio en la época de colonización, cuando los españoles introdujeron esta tecnología (Nentuig, 1971; Pfefferkorn, 1984; citados por Canizales, 1995).

A principios del siglo XX, existía en Sonora una incipiente industria del bacanora que utilizaba equipo más elaborado y técnicas más precisas (Archivo Histórico del Gobierno del Estado de Sonora. Hermosillo, México). Sin embargo, el 8 de Agosto de 1915 mediante la promulgación del Decreto Gubernamental No. 1 se prohibió la importación, venta y fabricación de bebidas alcohólicas, bajo este ordenamiento jurídico, desaparecieron las plantas destiladoras (Boletín Oficial del Gobierno del Estado de Sonora. Junio 1992). Lo anterior propició el surgimiento de la producción clandestina que se mantuvo a lo largo del presente siglo, además de un considerable retraso en la técnica y equipo empleado en el proceso.

El proceso de elaboración tradicional de bacanora implica la siguiente secuencia de operaciones: 1) recolección y "jimado" (corte de las hojas), 2) cocimiento o "tatemado" en donde las cabezas o piñas se cuecen durante 2 noches en una fosa acondicionada en forma de horno, 3) molienda o "machucado" aquí las piñas tatemadas se desmenuzan una por una, colocándolas sobre un pedazo de tronco en forma de cuenca conocida como *cuba* y golpeándolas con la parte trasera de una hacha hasta reducirlas a fibras, 4) fermentación o "cuelgue" en esta operación el mezcal triturado se pasa a una fosa cuyas paredes al igual que en el caso del horno, están recubiertas por piedras. (el tiempo que dura la fermentación varía en proporción al clima, en temporada de calor el proceso tarda de 4 a 5 días, mientras que en clima gélido dura hasta 7 días y se dice que esta etapa ha concluido cuando el producto, tiene un olor característico y un sabor amargo), 5) primera destilación o "cocimiento".

La mayoría de los mezcaleros aseguran que el mejor bacanora, es el que se elabora en los meses de abril a mayo, durante la temporada de sequía, debido a que en esa parte del año es cuando el agave concentra más "miel". Respecto al rendimiento, sostienen que por cada carga de 24 cabezas se obtienen de 8 a 10 litros de bacanora, dependiendo del tamaño y madurez del agave procesado. También se ha reportado que para producir 40 lt se requieren de 60 a 70 cabezas (Canizales-Curiel, *et al,* 1995).

Agaves Cultivados en México

Como puede desprenderse de la información vertida en párrafos anteriores, el cultivo de algunas especies de ***Agave*** ha resultado un importante factor para el desarrollo de algunas comunidades en diferentes Estados de la República Mexicana. Así en Yucatán, el cultivo del ***A. fourcroydes*** (henequén) durante mucho tiempo ha sido un cultivo rentable y generador de divisas, al ser utilizado como materia prima para la industria textil (cordelera), y en Jalisco, la próspera industria tequilera, ha sido sostenida mediante el cultivo del ***A. tequilana*** (maguey azul tequilero).

Otras especies importantes son ***A. salmiana*** (maguey manso o pulquero), empleado para la elaboración de pulque en Tlaxcala y el ***A. potatorum*** (maguey mezcalero), para la industria del mezcal en Oaxaca. (Nava, 1990).

Hasta 1990 se cultivaban en México mas de 200 mil ha de ***Agave***, principalmente de las especies antes mencionadas. Sin embargo, el potencial

es mucho mayor ya que además de su uso como fuente de fibras y bebidas, existe un importante potencial como alimento, fármacos, jabones, papel y forrajes.

La figura 1 presenta un diagrama para el aprovechamiento integral de los diferentes tipos de agaves (Nava, 1990).

El *Agave pacifica*

En Sonora existen 22 especies (algunas de las cuales son endémicas) y 2 subespecies pertenecientes al género ***Agave***. Una de las más importantes es el ***Agave pacífica***, Trel., también designado como ***Agave yaquiana*** por otros autores, y mas recientemente Gentry (1982), generó aún mas controversia sobre la clasificación botánica de esta especie, al reclasificarla como una variedad endémica de Sonora perteneciente a la especie ***A. angustifolia***.

La importancia del ***A. pacifica*** estriba en que durante siglos ha sido aprovechada en la elaboración de una bebida alcohólica, cuyo sabor característico (distintivo de otros destilados de ***Agave*** como el tequila y el mezcal), la han situado en la preferencia de los habitantes de Sonora y Estados colindantes. Esta bebida se conoce como "bacanora" y por esta razón a la planta se le llama comúnmente como "el maguey del bacanora".

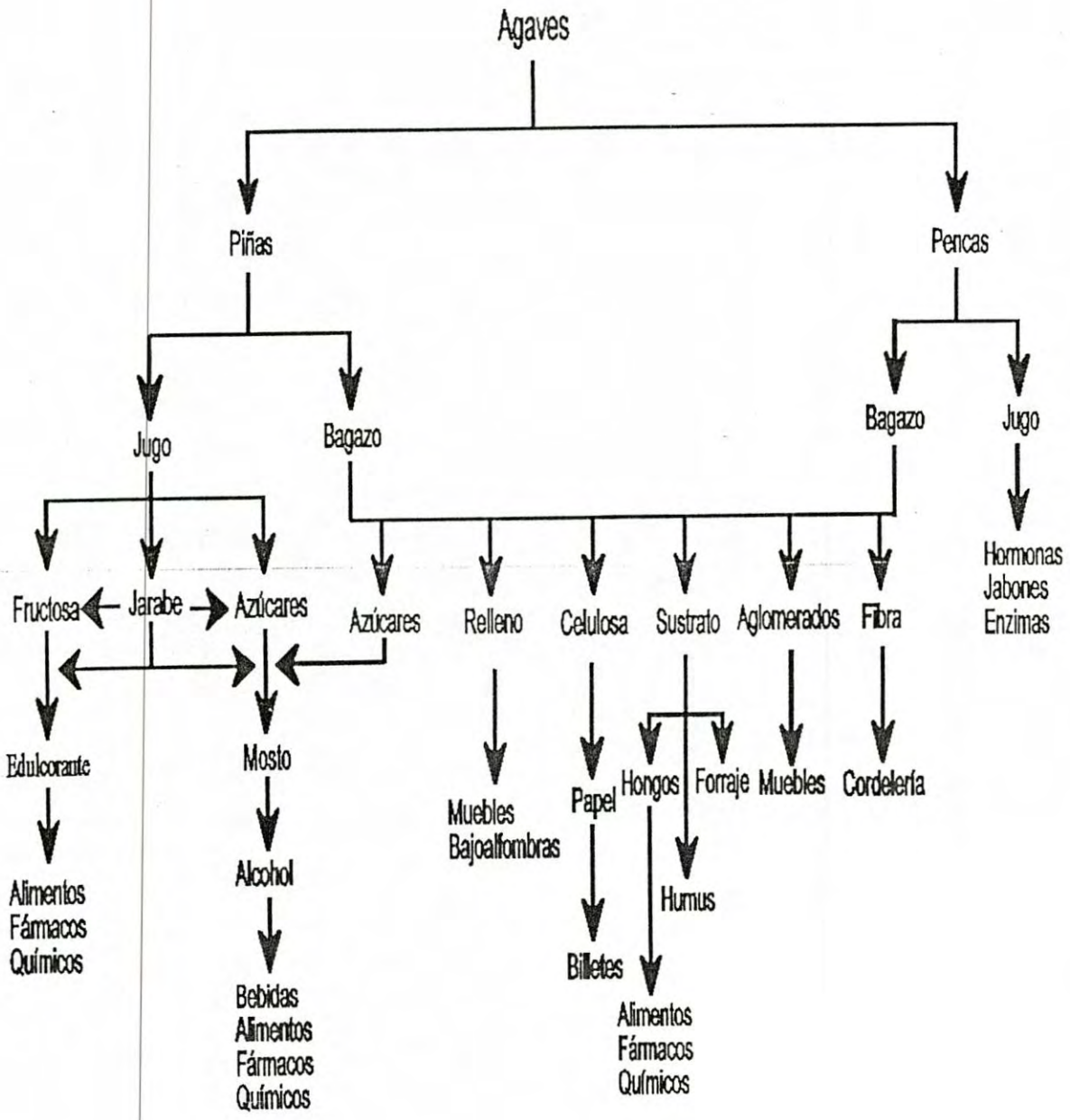

Figura 1.- Diagrama de bloques para el aprovechamiento integral de las plantas del género ***Agave***.

Fuente Nava, 1990.

El ***Agave pacifica*** se encuentra ampliamente distribuido en el Estado de Sonora, ya que puede crecer en regiones donde la precipitación pluvial es del orden de los 150 mm o menos, mostrando especial predilección por los sitios cuya precipitación fluctúa entre 400 y 550 mm Se pueden localizar plantas desde la región de Caborca hasta Santa Ana, en los municipios de Hermosillo, Guaymas, Cajeme y Navojoa. También al Norte de Ures y principalmente en los poblados serranos de Soyopa, Sahuaripa, Arivechi, Tesopaco, Alamos y Bacanora. La figura 2 indica los principales municipios donde se distribuye esta planta.

El ***A. pacifica*** es una planta perenne, acaulescente, formada por una roseta de pencas basales que alcanza de 1 a 1.5 m de longitud y de 1.5 a 2 m de diámetro. Sus pencas son de 50 a 120 cm de largo y de 4 a 8 cm de ancho, terminando en una fuerte espina apical. Los bordes de dichas pencas están cubiertos por numerosos dientes pequeños y rígidos (Shreve and Wiggins, 1964). La figura 3, muestra una comunidad de plantas de ***A. pacifica***, en las que se pueden apreciar algunas de las principales características morfológicas de esta especie.

Reproducción de *Agave pacifica*

La reproducción natural de ***A. pacifica*** al igual que todos los agaves, puede llevarse a cabo de 2 formas: sexual y asexual. A su vez, la reproducción asexual puede efectuarse de 2 maneras: mediante "hijuelos" o estolones que nacen en la base y alrededor de las plantas mas grandes y por medio de bulbillos (propágulos) que se desarrollan a partir de los meristemos axilares en la inflorescencia, después de la floración.

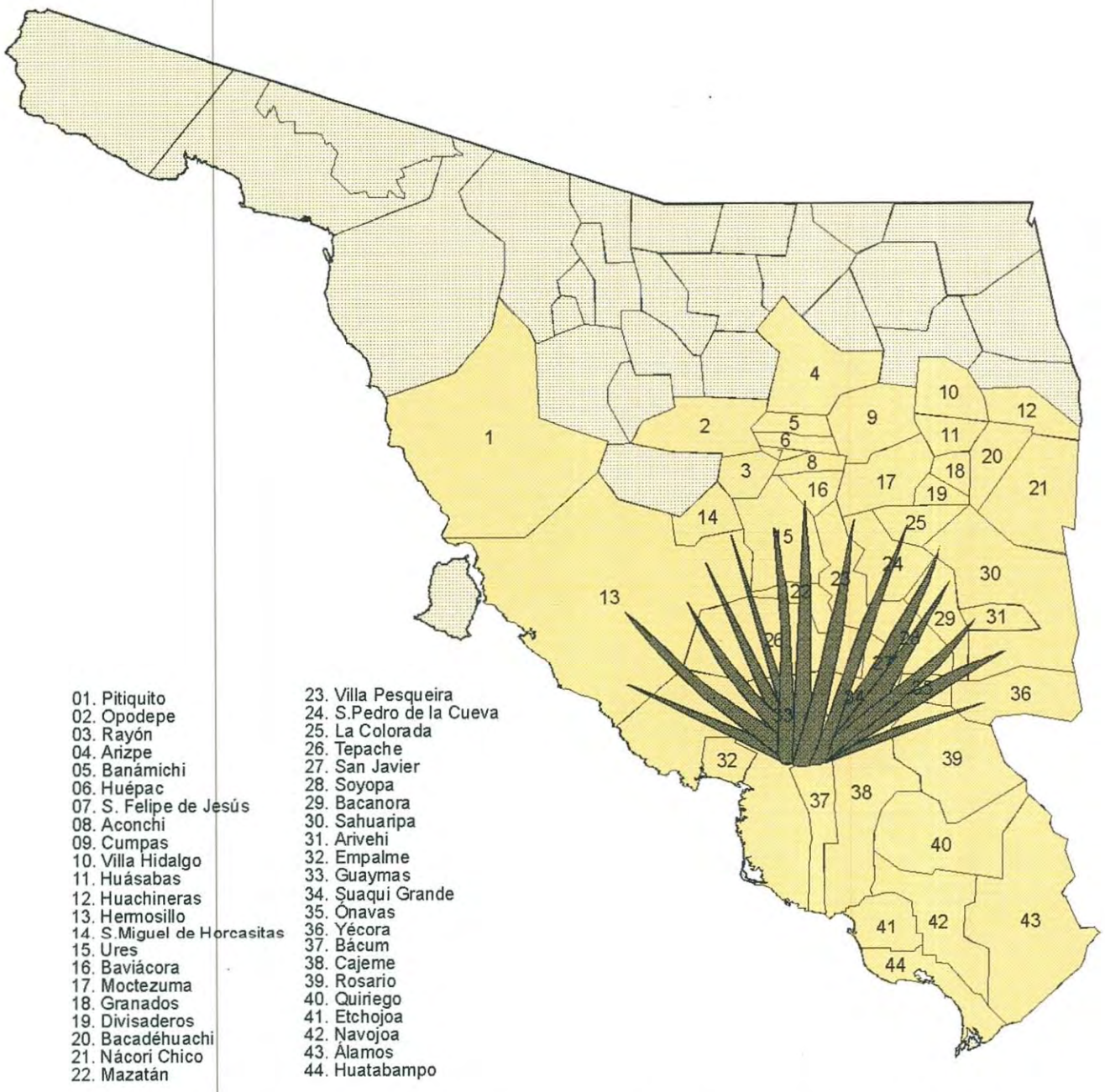

Figura 2.- Distribución de ***Agave pacifica*** por Municipios en el Estado de Sonora.

Figura 3.- Comunidad de plantas de ***Agave pacifica***.

En ambos casos, cada plántula es genéticamente igual a su progenitor y se puede transplantar para dar origen a una nueva planta. Pero como método de propagación, la reproducción asexual es sumamente lenta; ya que cada planta empieza a producir "hijuelos" hasta la edad de 3 años en adelante y solo producen un promedio de 6 plántulas por cada planta adulta, mientras que los propágulos, si bien es cierto se desarrollan en mayor cantidad, requieren de un mínimo de 7 años para su eventual aparición (Binh,*et al*, 1990; Das, 1992; Frydrych, 1982).

Por otra parte, la reproducción sexual se realiza a base de semillas, y por lo tanto requiere también de un mínimo de 7 años para que las plantas alcancen su madurez y produzcan semillas. La reproducción sexual, presenta además las desventajas de bajos índices de germinación, y las plantas están sujetas a una alta variabilidad genética (Freeman and Reid, 1985; Nobel, 1992). La figura 4, presenta las 3 formas de reproducción del ***A. pacifica***.

Aspectos generales sobre el cultivo de tejidos

Desde 1975 el cultivo *in vitro* de plantas superiores ha mostrado un espectacular desarrollo. Actualmente existe un gran número de métodos científicos para el cultivo *in vitro* de diversas plantas (Pierik, 1987).

El cultivo de tejidos vegetales *in vitro*, consiste en cultivar pequeños segmentos de las plantas (explantes) sobre medios sintéticos estériles bajo condiciones controladas, con el propósito de regenerar plantas enteras. Esto se

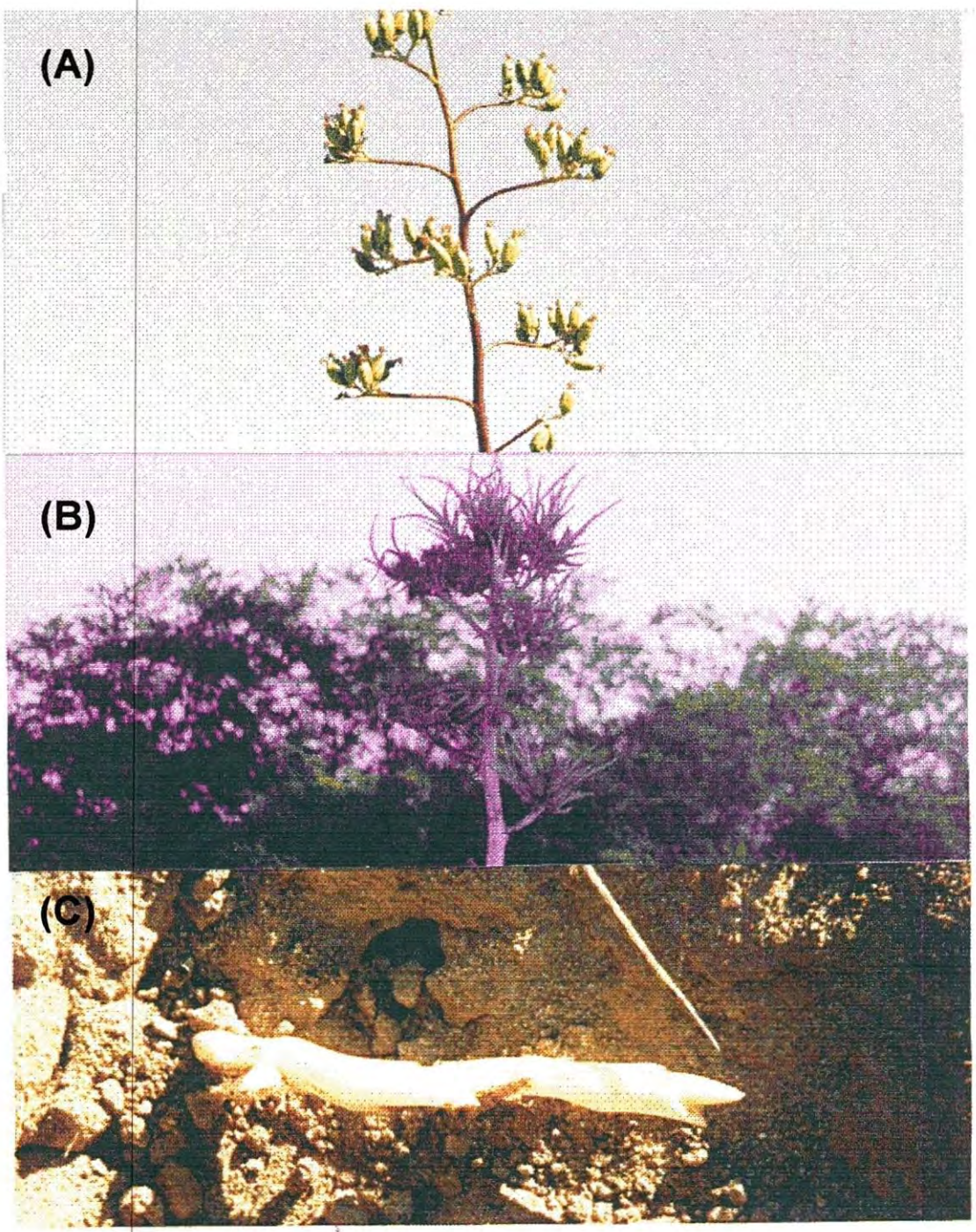

Figura 4.- Formas de reproducción del ***Agave pacifica***: (A) por semillas, (B) vía asexual por bulbillos y (C) vía asexual por rizomas

puede lograr a partir de casi cualquier parte de la planta: meristemos, tallo, raíz, hojas, inflorescencias, pétalos, polen, embriones, etc. (Perea y Navarro, 1988). También se pueden obtener plantas completas a partir de células aisladas o protoplastos en suspensión, siempre y cuando dichas células conserven su capacidad para reasumir su actividad meristemática (Robert, 1985). Otra finalidad del cultivo de tejidos *in vitro,* es el mejoramiento genético, el cual puede lograrse mediante la obtención de plantas haploides, inducción de variación somaclonal y gametoclonal, ingeniería genética y/o selección de líneas mutantes con las características deseables.

Tipos de explantes utilizados

Como ya se mencionó con anterioridad, se puede regenerar plantas a partir de cualquier parte de una planta. Sin embargo, siempre es necesario seleccionar el explante después que se hayan definido perfectamente los objetivos del trabajo; ya que la selección de la parte de la planta a cultivar dependerá de si se desea realizar una propagación masiva, mejoramiento genético, mutagénesis, producción de metabolitos, etc.

En general se pueden distinguir dos tipos de explantes:

a) Explantes organizados: meristemos, yemas, embriones, anteras, óvulos, polen, hipocotilos, etc.

b) Explantes no organizados: segmentos de algún órgano, normalmente considerado como un explante.

El material experimental por sí mismo, así como el medio utilizado y los factores fisiológicos de crecimiento, pueden influenciar el crecimiento y desarrollo de las plantas *in vitro*. Los factores relativos al material vegetal utilizado, que pueden afectar el crecimiento y desarrollo *in vitro* son: El genotipo, la edad de la planta, la edad del tejido u órgano, el estado fisiológico, las condiciones climáticas y de crecimiento de la planta, así como de la posición, tamaño, método de corte e inoculación del explante (Mantell, *et al*, 1985; Pierik, 1987).

Manipulación del material vegetal

En todo trabajo de cultivo de tejidos o células vegetales es indispensable mantener las condiciones de asepsia a lo largo de todas las etapas del proceso.

Esterilización de los explantes. Antes de iniciar cualquier trabajo de cultivo de células o tejidos vegetales, se debe realizar una rigurosa asepsia sobre el material que vaya a ser utilizado como explante. Los métodos más utilizados son:

a) Destrucción física de microorganismos. Esto se hace usando aire caliente, vapor o radiaciones gamma o ultravioleta.

b) Remoción física de microorganismos. Por medio de lavado y/o filtración.

c) Destrucción química de microorganismos. Esta técnica de esterilización de explantes es la más común, y se basa en la aplicación de compuestos químicos

desinfectantes, tales como: hipoclorito de sodio o de calcio, cloruro de mercurio, alcohol etílico, óxido de etileno, antibióticos, etc.

Para la esterilización de los explantes es necesario tomar en cuenta las siguientes consideraciones: a) las partes de los vegetales en contacto con el suelo, particularmente raíces y tubérculos deben ser esterilizadas lo más cuidadosamente posible, b) cuando se utilizan explantes provenientes de cultivos *in vitro* estériles, no se requiere ningún tratamiento de esterilización, solo es necesario realizar la manipulación bajo condiciones de completa asepsia en los subcultivos sucesivos, c) en el caso de meristemos obtenidos a partir de plantas sanas la esterilización también puede obviarse, ya que los meristemos están protegidos por varias hojas y ramas pequeñas, las que si deben ser tratadas, d) en el caso de que se vaya a utilizar material vegetal pubescente, se recomienda hacer inmersiones previas en alcohol etílico o alguna solución detergente, enjuagando el explante para romper la tensión superficial, de tal forma que el agente esterilizante pueda penetrar con mayor facilidad, e) todos los trabajos deben realizarse en un ambiente totalmente estéril, por lo que se recomienda usar una cámara de flujo laminar, la cuál debe ponerse a funcionar una hora antes de empezar a trabajar. También debe hacerse una limpieza a fondo con alcohol y posteriormente solo introducir material de trabajo estéril (bisturí, cuchillas, pinzas, agujas, fórceps, tijeras, cajas petri, papel filtro, frascos con agua, alcohol, mechero, etc.), f) el laboratorista debe proveerse de ropa de laboratorio limpia, asearse las manos y brazos con agua y jabón y posteriormente con alcohol y debe evitar hablar, toser, estornudar y comer durante su permanencia en el lugar de trabajo, g) los instrumentos deben ser flameados completamente y enfriarse cada vez que sean usados (Dodds and Roberts, 1990; Mantell, *et al*, 1985; Pierik, 1987).

Factores que Afectan el Crecimiento y Desarrollo de Plantas *in vitro*

El crecimiento y desarrollo de plantas *in vitro* está determinado por un gran número de complejos factores, tales como: constitución genética de las plantas, nutrientes (agua, macro y micro elementos y azúcares), factores físicos de crecimiento (temperatura, luz, pH y concentraciones de O_2 y CO_2) y algunas sustancias orgánicas, tales como: reguladores de crecimiento, vitaminas, aminoácidos (Dodds and Roberts, 1990; Hurtado y Merino, 1988; Mantell, *et al*, 1985; Pierik, 1987).

Constitución genética de las planta

La constitución genética es un factor decisivo en cada etapa de crecimiento de la planta, determina por ejemplo si una planta es monocotiledónea, la forma de sus hojas, su temperatura óptima de crecimiento y floración, la forma y el color de sus flores, etc. La expresión de la constitución genética, en conjunto con las condiciones físicas y químicas creadas en el ambiente *in vitro*, controla también la respuesta de la planta bajo estas condiciones (Hurtado y Merino, 1988; Mantell, *et al*, 1985; Pierik; 1987).

Medios de cultivo

Los nutrientes son esenciales para un buen crecimiento y desarrollo de la planta: sin agua y nutrientes minerales una planta no puede sobrevivir *in vivo* ni

in vitro. Se deben adicionar azúcares dado que las plantas (o partes de las plantas) en estas condiciones no son completamente autotróficas.

Composición del medio. Para el cultivo de tejidos vegetales, es indispensable la presencia en el medio de cultivo de los siguientes componentes:

a) Agua: debido a que el 95% del medio de cultivo está constituido por agua, debe ponerse especial atención en su calidad. Para propósitos de investigación se recomienda el uso de agua destilada y deionizada, pero para investigaciones con protoplastos células y meristemos el agua debe ser doble destilada.

b) Agar: este compuesto es un polisacárido de alto peso molecular derivado de algas marinas y que obtenido en forma de polvo es usado como agente gelificante en la mayoría den los medios de cultivo. La concentración de agar en el medio de cultivo es muy importante, debido a que una alta concentración ocasionará que no haya buen contacto entre el tejido y los nutrientes, y por otro lado, una baja concentración de agar ocasionará que no haya una buena gelificación. En general para el cultivo de tejidos vegetales se recomienda usar agar al 0.6-0.8%. La pureza del agar es importante, se recomienda usar Bacto agar Difco y para el cultivo de protoplastos o células sencillas se recomienda usar un derivado más puro, la agarosa.

c) Azúcares: el azúcar es uno de los principales componentes del medio de cultivo, su adición es esencial para un buen crecimiento y desarrollo de la plantas, debido a que bajo las condiciones de cultivo *in vitro,* la fotosíntesis es insuficiente, dado que el tejido de color verde existente no es totalmente

autotrófico. Las concentraciones de sacarosa recomendadas usualmente varían de 1 a 5% dependiendo del tipo de planta, dado que este azúcar también es sintetizado y transportado en forma natural por la planta. También se puede usar otro tipo de carbohidratos como glucosa y fructuosa.

La concentración de azúcar a utilizar también depende de la edad del material y tipo de explante a utilizar, por ejemplo, el cultivo de embriones muy jóvenes requiere de elevadas concentraciones de carbohidratos.

d) Nutrientes minerales: después de los carbohidratos, los minerales son el segundo grupo de nutrientes más importante de los medios de cultivo. Hay una gran combinación de macro y micro nutrientes minerales que pueden ser empleadas *in vitro*. Aunque la mezcla de macro y micro sales depende del tipo de planta a utilizar, la mezcla formulada para el medio de Murashige-Skoog (1962) es ampliamente utilizada, debido a que responde favorablemente a las necesidades de la mayoría de las plantas. Sin embargo, debe tenerse presente que esta mezcla mineral no siempre es la óptima debido a su alto contenido de sales.

e) Reguladores de crecimiento: las hormonas por definición son compuestos orgánicos sintetizados en las plantas superiores, que influencian el crecimiento y desarrollo, son activos en muy bajas concentraciones en sitios diferentes a los lugares donde se sintetizan. Aparte de estos compuestos naturales, existe otro tipo de compuestos sintéticos que afectan el crecimiento relativo de órganos y tejidos vegetales; en conjunto ambos tipos de compuestos se denominan como reguladores de crecimiento.

En el cultivo de plantas superiores *in vitro,* los reguladores de crecimiento son muy importantes, especialmente las auxinas y citocininas. La adición de auxinas y/o citocininas al medio de cultivo, ya sea para obtener extensión y/o división celular, depende del tipo de explante y de la especie a cultivar. Las auxinas generalmente favorecen la elongación celular y la hinchazón de los tejidos, la división celular (formación de callos y raíces adventicias), la inhibición de rebrotes axilares y adventicios y con frecuencia provocan la embriogénesis en cultivos en suspensión. Las auxinas más utilizadas son: ácido indol acético (AIA), ácido indolbutírico (AIB), ácido naftalen-acético (ANA) y el 2,4-dicloro-fenoxi-acético (2,4-D). En lo que se refiere a las citocininas, éstas son usadas para estimular el crecimiento y desarrollo de los explantes, mediante un incremento en la división celular especialmente cuando se adicionan junto con auxinas. En altas concentraciones (de 1 a 10 mg/l), pueden inducir la formación de rebrotes adventicios y axilares, disminuir la dominancia apical, inhibir la formación de raíces y retardar el envejecimiento. Las citocininas más importantes, son: cinetina, zeatina, 6-benciladenina (BA o también llamada 6-bencilaminopurina BAP). y N-isopentenilaminopurina (2iP).

f) Vitaminas: en general son compuestos químicos que favorecen el crecimiento general, las más empleadas son tiamina, piridoxina, riboflavina y biotina.

g) Aminoácidos: generalmente como fuente de aminoácidos se utilizan: hidrolizados de caseina, peptona, triptona, extractos de malta y levadura.

h) Mezclas de origen natural: Este tipo de sustancias deben ser evitadas en los trabajos de investigación, ya que su composición es variable y en muchos de los casos desconocida. Sin embargo suelen usarse en otro tipo de trabajos

como enriquecedores del medio; entre los más usados están: agua de coco, pulpa de plátano y emulsión de pescado (Dodds and Roberts, 1990; Hurtado y Merino, 1988; Mantell, *et al*, 1985; Pierik, 1987).

Factores físicos

La importancia de los factores físicos *in vivo,* también es aplicable a las condiciones *in vitro.* Los principales factores físicos que deben considerarse son: temperatura, fotoperiodo, intensidad lumínica y calidad del espectro de luz (Dodds and Roberts,1990; Mantell, *et al*, 1985; Pierik, 1987).

Micropropagación

Las plantas únicamente pueden propagarse mediante dos vías: vegetativa o asexualmente (también llamada clonación) y generativa o sexualmente (mediante semillas). Bajo determinadas condiciones ambos tipos de propagación pueden fallar. Cuando la propagación generativa es insatisfactoria, ya sea porque la planta no produce o genera muy baja cantidad de semillas, o bien porque dichas semillas pierden su viabilidad muy rápidamente, se tiene que recurrir a la propagación vegetativa.

Algunas plantas superiores pueden ser propagadas o multiplicadas exclusivamente mediante procedimientos vegetativos (división, estacas, gemación o injertos). Durante muchos años la propagación vegetativa *in vivo,* ha jugado un papel muy importante en la agricultura; por ejemplo ha sido

utilizada con éxito en el cultivo comercial de hortalizas como papa y espárragos, frutales como pera y manzana, plantas ornamentales como crisantemos, orquídeas, etc. Esta técnica también es muy importante en los programas de mejoramiento genético, ya que las líneas paternales para la producción de semilla, con frecuencia son propagadas mediante clonación (Dodds and Roberts, 1990; Mantell, *et al*, 1985).

La palabra clon se usó inicialmente para describir a las plantas propagadas vegetativamente; clon en griego significa ramita o pedacito cortado como propágulo para su multiplicación. Shull en 1992 definió el término clon como una palabra para englobar a todos los grupos de individuos de plantas o animales genotípicamente idénticos obtenidos por cualquier forma de reproducción asexual, incluyendo la apogamia. Stout en 1940, estableció que un clon debe ser considerado como una unidad artificial usada para describir a un grupo de individuos genéticamente uniformes, obtenidos de un mismo individuo mediante propagación asexual (Dodds and Roberts, 1990; Mantell, *et al*, 1985).

Los métodos clásicos de propagación vegetativa *in vivo*, en ocasiones suelen ser muy lentos, muy caros, difíciles o completamente imposibles de llevar a cabo.

En los últimos 15 años, debido al descubrimiento de que las plantas pueden crecer más rápidamente *in vitro* que *in vivo,* el conocimiento concerniente a la propagación *in vitro* de ha desarrollado a pasos agigantados; en la actualidad mediante el uso de estas metodologías se ha logrado producir clones que difícilmente se hubieran podido obtener *in vivo.* Dado que

actualmente, mediante el cultivo de células o protoplastos en suspensión se puede producir varios miles de plantas derivadas a partir de una misma célula en un período de tiempo relativamente corto, los productos de esta propagación masiva deben ser considerados como clones simples. Sin embargo, esto no es muy aceptado, ya que los productos del cultivo de callos y células en suspensión generalmente son genéticamente distintos entre sí, presentándose un gran número de idiotipos, debido a las altas probabilidades de mutagénesis existentes en este tipo de cultivo. Actualmente los cultivos de callos, protoplastos y células en suspensión son de gran utilidad en los programas de selección y mejoramiento genético de los cultivos, particularmente porque pueden generar tipos novedosos de variación genética y epigenética, generalmente denominadas como variación somaclonal (Dodds and Roberts, 1990; Mantell, *et al*, 1985; Pierik, 1987; Rashid, 1988).

Los métodos de propagación vegetativa *in vitro,* utilizados hasta hoy son: a) el cultivo de nudos simples, b) multiplicación de meristemos existentes dentro de brotes axilares que proliferan en el explante después de ser removido de la planta maternal. c) multiplicación mediante el cultivo de ápices y meristemos apicales, obtenidos a partir de la planta materna, d) multiplicación mediante la inducción a la formación de órganos adventicios (raíces o rebrotes) y embriogénesis somática directamente en el explante y e) multiplicación mediante tejido de callo, obtenido a partir de órganos, tejidos, células o protoplastos, con la consecuente organogénesis o embriogénesis somática en cultivos sucesivos; en donde los brotes obtenidos son subdivididos usando los procedimientos b), c) o d). Estas técnicas en realidad son extensiones de los métodos convencionales de propagación clonal, pero llevadas a cabo a escala

miniatura, bajo condiciones asépticas, razón por la cual a la propagación clonal *in vitro* se le conoce como micropropagación.

Los métodos de micropropagación mas comunes consisten en la fragmentación de nudos, ápices y yemas axilares, los cuales son manipulados en condiciones asépticas y transferidos al medio de cultivo, para posteriormente inducir su proliferación y subcultivo de rebrotes *in vitro.* Estas metodologías permiten la obtención de plantas genéticamente idénticas (clones) y una velocidad de producción considerablemente superior a cualquiera de los métodos tradicionales (Dodds and Roberts, 1990).

Técnicas de Micropropagación

Multiplicación de nudos simples

Este es un método de aislamiento de yemas junto con un pedazo de tallo, con el propósito de formar un rebrote mediante el desarrollo de la yema. Es la forma más natural de propagación vegetativa de plantas *in vitro*, debido a que también es aplicable *in vivo*. En este caso las yemas en las axilas de las hojas, son capaces de formar nuevas hojas, las cuales pueden ser subcultivadas y alcanzar su desarrollo, y así sucesivamente hasta obtener un gran número de rebrotes, los cuales pasarán a un medio de enraizamiento y posteriormente serán transferidos al suelo.

Hay que tener en cuenta ciertas consideraciones para el uso de este método, por ejemplo: a) es prácticamente imposible usarlo en la propagación

de plantas roceteadas, ya que las probabilidades de contaminación son muy altas; para reducir las probabilidades de infección es mejor utilizar solo las yemas cerradas; b) si hay infecciones internas es preciso recurrir al cultivo de meristemos; c) la velocidad de propagación es dependiente del número de yemas disponibles; d) otro factor especialmente importante en el caso de plantas leñosas, es la dormancia, ya que éstas presentan problemas en climas templados; para romper la dormancia es necesario hacer una buena selección del material iniciador (es importante: la edad, la posición y la época del año en que se realiza su obtención), también influyen los factores físicos y la composición del medio de cultivo. Algunas de las formas para romper la dormancia durante el cultivo *in vitro*, son: el tratamiento a baja temperatura (0-5 ^{o}C), días largos (16 h por día) y la combinación de los dos. Por otra parte algunas giberelinas y/o citocininas pueden promover el rompimiento de la dormancia; e) Los brotes juveniles se desarrollan más rápidamente que los adultos, los cuales necesitan ser rejuvenecidos, aunque el enraizamiento de los rebrotes adultos es más fácil. Los primeros reportes en el aislamiento de yemas y su subsecuente enraizamiento, fueron realizados en espárragos, por Galston, 1947 y 1948. De ahí en adelante esta técnica se ha aplicado a un gran número de especies. El problema encontrado por los primeros investigadores fue la dificultad para el enraizado, encontrando que para un buen enraizado se requieren condiciones de oscuridad y la presencia de altas concentraciones de ácido naftalenacético (Pierik, 1987; Mantell, *et al*,1985).

Multiplicación mediante rebrotes axilares y apicales

En principio este método es muy similar al de cultivo de nudos simples; la gran diferencia estriba en que en este último método, los explantes incluyen

parte del tallo, por lo que generalmente no requieren de citocininas para el desarrollo de las yemas. Sin embargo en la práctica el método de nudos simples se usa en combinación con el de yemas axilares y con frecuencia también se utilizan citocininas para promover la formación de rebrotes axilares.

Los rebrotes axilares son aquellos que emergen a partir de su posición normal en la planta en las axilas de las hojas, mientras que los rebrotes apicales son aquellos que ocupan las puntas de crecimiento de la planta. Ambos tipos de rebrotes contienen meristemos (yemas) activos o en reposo dependiendo del estado fisiológico de la planta. La mayoría de las plantas vasculares tienen un crecimiento de tipo indeterminado, en el cuál las axilas de las hojas contienen meristemos subsidiarios, cada uno de los cuales es capaz de desarrollar un nuevo eje similar al eje principal. Dependiendo del grado de ramificación desplegado de la especie en particular, solo un pequeño número de meristemos axilares se desarrollan, la mayoría de ellos permanece inhibido por la dominancia apical. Sin embargo, en la mayoría de las plantas la expresión de los rebrotes axilares parece depender del suplemento de citocininas hacia el meristemo. Así, cuando las puntas de un rebrote son cultivadas en un medio basal libre de reguladores de crecimiento, desarrollan un solo rebrote típico de la dominancia apical. Pero cuando el mismo material se coloca en un medio con presencia de citocininas, las yemas axilares con frecuencia se desarrollan prematuramente, orientando el desarrollo hacia el crecimiento secundario, luego terciario, etc., esto ocasiona que los rebrotes proliferen en racimos. Una vez que los racimos se han formado, se dividen en pequeños segmentos amorfos o en rebrotes separados los que tomarán nuevamente la forma de racimos al ser cultivados en medio fresco. Si se provee una formulación adecuada de nutrientes básicos para el crecimiento

normal, este proceso de subdivisión puede continuar indefinidamente. Así, este procedimiento ha sido usado para mantener la proliferación de algunas especies sin deterioración aparente. Las velocidades de proliferación que pueden alcanzarse por este método obviamente varían con la capacidad relativa para la producción de hojas del genotipo a propagar. Sin embargo, si se emplean los niveles óptimos de citocininas (generalmente en un rango de 0.5 a 10 mg/l) y el cultivo se mantiene en las condiciones óptimas, pueden alcanzarse velocidades de multiplicación de 0.1 a 3.0 millones de rebrotes al año. En general las técnicas de proliferación por rebrotes axilares son aplicables a cualquier tipo de planta que produzca brotes axilares y que responda favorablemente a citocininas tales como: 6-bencilaminopurina (BAP), N-isopentenilaminopurina (2-iP) y zeatina. Los brotes apicales (normalmente de 1 a 5 mm de tamaño), generalmente se cultivan en un medio que contiene mezclas de auxinas y citocininas (por ejemplo de 0.01 a 0.1 mg/l y de 0.05 a 0.5 mg/l respectivamente). El uso de citocininas generalmente se eleva en los subcultivos sucesivos, a fin de alcanzar una velocidad aceptable de proliferación, tratando de evitar a la vez el amarillamiento o distorsión de los rebrotes (Mantell, *et al*,1985; Pierik, 1987; Rashid, 1988).

Cultivo de Meristemos

El uso de pequeñas puntas de brotes o meristemos apicales que incluyen solo una pequeña parte del primordio foliar es una extensión de este tipo de micropropagación apical y es la base para muchos procedimientos de eliminación de virus.

Debido a la aplicación extensiva del cultivo de ápices de brotes en horticultura y patología de plantas, se han introducido nuevos términos botánicos como cultivo de meristemos y mericlones, para el cultivo de puntas de tallos relativamente grandes (de 5-10 mm).

Los meristemos apicales se refieren exclusivamente a la porción distal por debajo del primordio foliar más jóven; mientras que los rebrotes apicales se refiere al meristemo apical más parte del primordio foliar subyacente.

El uso de meristemos apicales como explantes, debido a su diminuto tamaño presenta ciertas desventajas como: dificultades en su corte y manejo, además de muy bajas probabilidades de supervivencia, esto los hace imprácticos para usarse en la propagación *in vitro* de plantas; sin embargo como ya se estableció en párrafos anteriores, el cultivo de meristemos es una técnica de suma importancia en la obtención de plantas libres de patógenos (Mantell, *et al*, 1985; Pierik, 1987; Rashid, 1988).

Multiplicación de brotes adventicios

La regeneración de órganos que no están presentes en el explante al momento del aislamiento, es un proceso extremadamente complicado ya que:
1) Consiste en una serie de eventos que deben ser inducidos:

- desdiferenciación de células diferenciadas (posiblemente orientadas hacia la redeterminación y rejuvenecimiento de células)
- división celular
- iniciación y formación de órganos
- desarrollo de los órganos.

2) Está limitado tanto cualitativamente como cuantitativamente por un gran número de factores:

- inherentes al material vegetal, como: las condiciones de crecimiento de la planta, posición original de la planta en el explante, época del año, niveles endógenos de hormonas y tamaño del explante.
- inherentes a las condiciones de cultivo, como: presencia de reguladores de crecimiento, nutrientes disponibles, factores físicos de crecimiento y la adición de otras sustancias al medio de cultivo.

Uno de los factores mas importantes que afectan la formación de brotes adventicios es la relación auxina-citocinina. La determinación de los requerimientos auxina-citocinina en la formación de brotes adventicios, es algo complicado:

1) Hay plantas que en principio no necesitan de fuentes exógenas de citocininas o auxinas para la formación de brotes adventicios (por ejemplo ***Cardamine pratensis*** y ***Streptocarpus sp***); sin embargo esto no significa que la adición de estos reguladores afecte positiva o negativamente la formación de brotes.

2) La mayoría de las plantas requieren de citocininas para la formación de brotes.

3) Hay un grupo reducido de plantas que requieren de auxinas para la formación de brotes.

4) Pero la conclusión general en la mayoría de los trabajos de formación de brotes adventicios es que para provocar este efecto, en la mayoría de los casos, se requieren de altas concentraciones de citocininas y bajas

concentraciones de auxinas, y que la relación entre estos 2 reguladores, es un factor determinante para el proceso de formación de brotes.

El hecho de que la formación de brotes adventicios no sea un método tan popular como el de brotes axilares, es debido a que:

1) El número de plantas que pueden formar brotes adventicios *in vivo* y/o *in vitro* es mucho mas pequeño que aquellas que son capaces de formar raíces adventicias.

2) La probabilidad de obtener mutantes aumenta con este método, mucho mas que en el de nudos simples o en el de brotes axilares.

A pesar de no ser un método muy popular, la formación de brotes adventicios ha sido usada en la horticultura como una forma de propagación vegetativa para un gran número de plantas. Algunas especies de los géneros ***Nerine***, ***Begonia y Saintpulia***, ya han sido clonadas por este método (Pierik, 1987; Rashid, 1988).

Los brotes adventicios son tallos y estructuras foliares que se dan en forma natural en sitios distintos a las regiones axilares. Este tipo de estructuras incluyen tallos, bulbos, cormos, tubérculos y rizomas entre otros. Estructuras similares pueden ser obtenidas *in vitro,* mediante la manipulación correcta de los niveles en los reguladores de crecimiento y el pre-acondicionamiento de las plantas y explantes. Cuidando de no crear condiciones que favorezcan el desarrollo de callos. La técnica consta de los siguientes pasos: a) promover la formación de rebrotes en forma de racimos sobre los explantes; b) podar los

rebrotes a 2-3 mm de la base en el explante, en ángulos rectos o en corte transversal c) propagar bulbillos y/o minicormos cortados, por ciclos repetidos (Dixon, 1985; Mantell, *et al*, 1985; Pierik, 1987).

Multiplicación a través de tejido de callo

La proliferación de callos a partir de un explante en particular, es el resultado de la activación mitótica de un pequeño grupo de células colocadas normalmente en la superficie de corte del explante. Todos los vegetales por sí mismos poseen un potencial endógeno para la formación de callo, dado que en forma natural, al recibir una lesión en algún órgano, ésta puede ser reparada por este tipo de tejido. Sin embargo dichas respuestas se manifiestan en diferentes grados, entre las distintas especies (Evans, *et al*, 1981).

El proceso de desarrollo de callos a partir de un fragmento vegetal, puede ser dividido en 3 fases: inducción, división y diferenciación. Durante la fase de inducción se activa el metabolismo celular y las células se preparan para su división, manteniendo constante su tamaño. En la fase de división, conjuntamente con una activa síntesis metabólica decrece el tamaño celular y ocurre un cambio regresivo al estado meristemático (desdiferenciación) de las células de las capas exteriores del explante. Hay un incremento en el contenido de proteínas y ácidos nucleicos, además de la acumulación de paredes celulares que contribuyen también al incremento de materia seca. En el cultivo de callos la división celular ocurre en todas direcciones, sin seguir patrones de polaridad definidos. Finalmente en la fase de diferenciación, ocurre la maduración de algunas células y la expansión de otras, con la formación de estructuras organizadas. La división y la diferenciación celular no son eventos

excluyentes y pueden presentarse a un mismo tiempo, caracterizándose ambas por el crecimiento en el tejido.

El cultivo de células y tejidos vegetales que derivan en la formación de callo con la posterior organogénesis o embriogénesis, es una técnica menos apreciada como método de micropropagación. Esto es debido a la alta incidencia de aneuploidía y poliploidía. Sin embargo esto no significa que la micropropagación vía callos sea incapaz de producir regenerantes uniformes; en la primera fase de aparición de los rebrotes, el investigador debe darse cuenta de la presencia de rebrotes aberrantes, por su apariencia vitrificada o vidriosa y eliminarlos. No obstante éste no es un procedimiento confiable como para garantizar la ausencia de rebrotes quiméricos o mutantes. A pesar de lo anterior, esta es una técnica que ha sido empleada en la propagación de ciertas especies económicamente importantes como: cereales, forrajes, legumbres, árboles y palmas tropicales (Dixon, 1985; Mantell, *et al*, 1985; Pierik, 1987).

Etapas de la Micropropagación

Según Wetherell (1992) y Mantell, *et al* (1985), los métodos de micropropagación involucran 3 etapas básicas:

Etapa I (establecimiento del cultivo). Implica: a) la obtención del explante de una planta maternal previamente seleccionada de una población, en base a sus características fenotípicas y genotípicas, b) la preparación del explante (poda, limpieza, esterilización y lavado) y c) Establecimiento y desarrollo inicial en un medio apropiado.

Etapa II (multiplicación). Se refiere a la transferencia de los rebrotes a un medio de cultivo apropiado para multiplicación masiva, o bien para la rápida formación de embriones o rebrotes.

Etapa III (transferencia a su ambiente normal). Involucra: a) la transferencia de los rebrotes a medios de enraizamiento y b) el paso de las plántulas obtenidas a suelos esterilizados o a medios artificiales, para su fortalecimiento y acondicionamiento gradual a las condiciones naturales (por ejemplo la reducción gradual de la humedad).

Otros autores han dividido el proceso en 4 y hasta 5 fases, sin embargo el procedimiento global es el mismo (Mantell, *et al*, 1985; Pierik, 1987; Wetherell, 1992).

Propagación *in vitro* de algunas especies del género *Agave*

Importancia de la propagación *in vitro* en agaves

Muchos de los agaves cultivados son clones estériles, con frecuencia son poliploides que raramente producen semillas viables y en los casos en que la reproducción sexual puede ocurrir, esta es evitada por los productores, quienes cortan el tallo floral apenas empieza a emerger, con el fin de destinar los azúcares, que normalmente se utilizarían en el proceso reproductivo, hacia el aumento en biomasa y síntesis de polisacáridos en la cabeza (inulina) y hojas (fibras), que son los productos de interés comercial. Por estas razones la

variabilidad genética es muy limitada; por ejemplo, toda la producción de fibras de Africa y América del Sur proviene de unos cuantos clones colectados en México a finales del siglo XIX (Dewey, 1973; Wienk, 1976; citados por Robert, *et al*, 1992) y la producción de tequila y henequén en México, aunque no existen registros de ello, se sabe que proviene de unos cuantos clones seleccionados hace mas de un siglo.

Debido a los prolongados tiempos requeridos para su reproducción, existen muy pocos programas de mejoramiento genético convencionales de especies del género ***Agave***. Actualmente solo existen reportes de un híbrido diploide interespecífico conocido como 11648, obtenido de la cruza de ***A. angustifolia*** con ***A. amaniensis*** y la posterior retrocruza con ***A. amaniensis***. Este híbrido tuvo una alta productividad en cuanto al contenido de fibras por hoja, número de hojas por año; más aún, las hojas carecieron de espinas, facilitando su cosecha; lamentablemente este híbrido fue extremadamente susceptible a algunas especies del hongo ***Phytophthora*** (Robert, *et al*, 1992).

Por otra parte, existe el problema de la sobrexplotación a la que han sido sometidas las especies tanto silvestres como cultivadas. En México, la demanda internacional del tequila ha ocasionado una severa disminución en las poblaciones cultivadas y una indiscriminada plantación de materiales de baja calidad, lo que ha traído como consecuencia una reducción en los rendimientos, actualmente, las cabezas de ***A. tequilana*** promedian entre 25-30 Kg, mientras que en la primera mitad del siglo las cabezas pesaban mas de 70 Kg. El caso del henequén es aún más dramático, no solo han disminuido la productividad y la producción total, sino que en 1989 por primera vez en su historia, México tuvo que importar fibras de sisal de Brasil, para poder

mantener su industria cordelera. Como solución a esta problemática, se ha propuesto propagación *in vitro*, ya que ha probado ser una metodología capaz de regenerar un gran número de plantas de agave en periodos relativamente cortos de tiempo (Robert, *et al*, 1992).

Tanto en los campos de cultivo de agave, como en condiciones silvestres, se puede notar la presencia de plantas con características morfológicas sobresalientes a las que se ha denominado variantes; estas variantes pueden ser la base para programas de propagación y mejoramiento genético, vía cultivo de tejidos. En forma adicional las mutaciones inducidas o las variantes somaclonales que aparecen en los métodos de cultivo de tejidos, pueden ser una fuente de variabilidad genética, capaz de proporcionar las características deseables, tales como: mayor tamaño en las cabezas, mayor contenido de fibras y carbohidratos, así como mayor tamaño de hojas (Robert, *et al*, 1987).

Micropropagación en *Agave*

Existen pocos reportes acerca de la micropropagación de plantas del género Agave. El primer reporte corresponde a Groenewald y colaboradores quienes en 1977, regeneraron plántulas de algunas especies indefinidas de ***Agave***. Ellos indujeron la formación de callo a partir de embriones de semilla utilizando el medio enriquecido de Linsmaier & Skoog, suplementado con 1 mg/l de 2,4-D y 5 mg/l de cinetina. La organogénesis fue obtenida después de 12 semanas y 2 subcultivos en el mismo medio con concentraciones menores de reguladores de crecimiento (0.2 mg/l de 2,4-D y 1 mg/l de cinetina), reportando la formación de brotes y raíces en el medio, pero no el número de plantas regeneradas (Nava, 1988; Robert, *et al*, 1992) .

Posteriormente la propagación *in vitro* de ***Agave fourcroydes***, ***A. sisalana, A. arizonica*** *y* ***A. cantala,*** ha sido estudiada por diversos autores (Binh, *et al,* 1990; Das, 1992; Frydrych, 1982; Huang y Backhaus, 1990; Nava, 1988; Powers y Backhaus, 1989; Robert, *et al,* 1987).

Robert y colaboradores en 1987, estudiaron las condiciones para la propagación *in vitro* de ***A. fourcroydes*** Lem. usando tejido de hojas, bulbillos, partes de semillas, rizomas y tallos como fuente de explante. Ellos probaron lo medios de MS, Gamborg y Schenk & Hildebrandt, suplementados con diferentes reguladores de crecimiento (2,4-D, AIB, AIA, ANA, BA y cinetina) y encontraron que en lo que se refiere a la producción de callos, los explantes más productivos fueron los rizomas y el tejido de tallo. Para la inducción de callos el medio más eficiente fue el de Gamborg, conteniendo 0.25 mg/l de 2,4-D y 1 mg/l de BA. Al cultivarse a luz continua (30-40 $/m^2$ s de radiación fotosintéticamente activa) los callos empezaron a hacerse visibles en la superficie de corte del explante después de 7 días. Además observaron la aparición de rebrotes directamente a partir de explantes de tallo y rizomas; en este aspecto el tratamiento mas efectivo fue en el que se utilizó el medio modificado de MS conteniendo 18 mM de $NaNO_3$, 5 mM de NH_4NO_3, 10 mg/l de BA y 0.025 mg/l de 2,4-D. En todos los casos los brotes formaron sistemas radiculares extensivos *in vitro* y al pasarse a cultivo en macetas, la sobrevivencia fue de 90%.

En otro trabajo, Binh y colaboradores (1990) desarrollaron un método rápido para la propagación de plantas de ***A. cantala*** Roxb., ***A. fourcroydes*** Lem. y ***A. sisalana*** Perrine. Ellos usaron estolones (hijuelos) colectados a partir de plantas adultas, los cuales fueron cortados en segmentos de 2 nudos

(aproximadamente 10 cm) y sembrados en arena. Se aplicaron riegos cada 2 días y al final de 2 meses de la porción meristemática nodal, emergieron plántulas jóvenes que fueron utilizadas como fuente de explante. A estas plántulas se les removieron las hojas y solo se usó un segmento de la parte basal, un cilindro de 1.5 cm de altura, el cual después de eliminar la superficie de exposición al tratamiento de esterilización, fue reducido a una pieza de 7-8 mm, el cual contenía los meristemos axial y apical. Este cilindro fue dividido en 8 partes iguales mediante cortes verticales y cada segmento fue plantado en forma individual. Ellos usaron el medio basal de MS, complementado con 2% de sacarosa, 10% de agua de coco, 0.8% de agar y varias combinaciones de reguladores de crecimiento. Los cultivos se incubaron a 28 ^{o}C y se iluminaron por un periodo de 16 horas diarias a 2000 lux. La combinación de reguladores de crecimiento más apta para el establecimiento de rebrotes múltiples fue la que contenía 0.075 mg/l de ANA, 0.1 mg/l de AIB y 0.05 mg/l de cinetina. Las velocidades de multiplicación, número de yemas regeneradas por cada yema inicial presente en el racimo, fueron de 3-4 en 4-5 semanas de subcultivo y los porcentajes de enraizamiento en medio de cultivo libre de hormonas fueron muy cercanos al 100%. Con esta técnica se logró producir e introducir al campo varias decenas de miles de plantas de los agaves ya mencionados.

La metodología empleada en estas 2 últimas investigaciones, fueron tomadas como base para el planteamiento de los trabajos de micropropagación de ***A. pacifica***, tema de la presente investigación.

MATERIAL Y METODOS

Material vegetal utilizado

Como fuentes de explante, se utilizaron plantas de ***Agave pacifica*** de aproximadamente un año de edad y 15-30 cm de altura, así como plántulas de 15 días de edad y 3-5 cm de longitud; ambas obtenidas mediante la germinación de semilla.

Obtención y esterilización superficial de los explantes

Explantes de hojas

Las plantas juveniles se lavaron cuidadosamente con agua corriente y jabón, luego se separaron las hojas y se dividieron en segmentos de aproximadamente 2 cm de longitud por 0.5 cm de ancho.

Explantes de tallo

Para la obtención del tejido de tallo se utilizó solo la parte basal conteniendo el meristemo apical (una pieza cilíndrica de 1.5 cm de altura), la cuál se dividió longitudinalmente en 2 partes iguales.

Explantes de rizomas

En lo que respecta al tejido de rizoma, éste se obtuvo de plantas mas desarrolladas (aproximadamente 2 años de edad) y los explantes consistieron en discos de aproximadamente 0.5 cm de longitud y la parte apical del rizoma un segmento de aproximadamente 3 cm de longitud conteniendo la principal zona meristemática del rizoma.

Esterilización

La esterilización superficial se realizó por inmersión en una solución de hipoclorito de sodio al 1.25 %, manteniendo los explantes por un periodo de 30 minutos, posteriormente estos se lavaron 3 veces con agua destilada-deionizada estéril. Se eliminó la superficie de exposición del tejido y cada una de estas secciones fue colocada en un recipiente conteniendo el medio de cultivo correspondiente.

Obtención de explantes a partir de plántulas

Las semillas para la obtención de las plántulas se colectaron a partir de una población silvestre de ***A. pacifica*** localizada en el Municipio de Cumpas Sonora. La extracción de las semillas se hizo a partir de frutos inmaduros (cápsulas verdes cerradas, de aproximadamente 5 cm de largo por 2.5 cm de diámetro).

Ya en el laboratorio se seleccionaron las semillas con características viables (bien formadas, rígidas y de color negro) y se sometieron a un proceso de esterilización que incluyó las siguientes operaciones: inmersión por 10 minutos en una solución al 70% de alcohol etílico, seguida de una inmersión en

hipoclorito de sodio al 2.5% por espacio de 30 minutos y 3 lavados consecutivos en agua destilada-deionizada estéril.

Una vez esterilizadas las semillas se colocaron en cajas de petri conteniendo el medio base de MS (1962), adicionado con 30 g/l de sacarosa y 8 g/l de agar. Enseguida las cajas se pasaron a incubación bajo condiciones de oscuridad y 28 °C.

Una vez que las plántulas emergieron, desarrollaron sus primer par de hojas y alcanzaron una talla de 3-5 cm, se procedió a tomar los explantes y colocarlos en su respectivo medio de cultivo. Las hojas se dividieron en 3 partes de aproximadamente 0.5 cm de longitud y se colocaron 5 segmentos por cada caja de petri (repetición). Los hipocotilos se seccionaron en 2 partes de aproximadamente 1 cm de long., mientras que los tallos y las raíces se dividieron en 3 partes.

Sembrado

La siembra de los explantes se realizó en condiciones de asepsia utilizando una cámara de flujo laminar marca Veco, la cuál provee de capas de aire esterilizado por filtración, impidiendo el acceso de microorganismos a la cabina de trabajo.

Métodos de multiplicación en estudio

Las técnicas de multiplicación estudiadas fueron la regeneración de brotes a partir de tejido de callo y la proliferación de brotes adventicios, mediante la organogénesis directa a partir del explante.

Proliferación de brotes adventicios

En esta fase se utilizó el medio modificado de MS conteniendo una relación de 18 mM de NO_3^-, 5 mM de NH_4^+ y 0.025 mg/l de 2,4-D. Aplicando un diseño completamente al azar en arreglo factorial 3 x 5, para evaluar el efecto de 3 niveles de BA: 5, 10 y 15 mg/l y 5 tipos de explantes: trozos de tallo y rizomas de plantas jóvenes, así como raíces, tallos, e hipocotilos de plántulas.

Variable respuesta. Como variable respuesta se midió la velocidad de proliferación de los brotes generados en cultivos sucesivos (número de brotes/semana de cultivo).

Multiplicación a través de tejido de callo

Para la obtención de callo, también se utilizó un diseño completamente al azar en arreglo factorial 5 x 2 x 3 x 3. Como explantes se utilizaron: trozos de hoja de plantas juveniles, segmentos de raíces, tallos, hojas e hipocotilos de

plántulas. Probándose en 2 medios de cultivo (Gamborg y MS), además de 3 concentraciones de 2,4-D (1.13, 2.26 y 3.39 μM) y BA (2.22, 4.44 y 6.66 μM).

Variable respuesta. En este método como variable respuesta se analizó el tiempo de aparición y la biomasa de callo producida, así como la capacidad de desarrollo de brotes u organogénesis. En los 3 casos, para el análisis de los resultados se utilizó el paquete estadístico Statgraphics Plus, versión 5.2, 1985-1991. Debido al tipo de variables respuesta (no normales) y al tipo de diseño experimental, dichos análisis se realizaron mediante pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis y la separación de medias se realizó mediante la prueba de Tukey a un nivel de significancia de 5% (Infante y Zarate, 1984; Steel y Torrie, 1985).

En el Cuadro 1, se presenta la composición de los medios de cultivo y en la Figura 5 se muestran las fuentes de explante y algunos de los explantes utilizados para los 2 métodos de propagación estudiados este trabajo.

Incubación

Los explantes se cultivaron a una calidad de luz para fotosíntesis de 56.5 μmol / m^2 s, a temperatura de 28 ± 2 °C y fotoperiodo de 12 h.

Enraizamiento y Aclimatación

Parte de los rebrotes generados, se pasaron a medios libres de citocininas, pero con 0.025 mg/l de 2,4-D, para su enraizamiento y posteriormente se trasladaron a macetas conteniendo suelo inerte, descubiertas, las cuales fueron colocadas bajo condiciones de invernadero para su aclimatación.

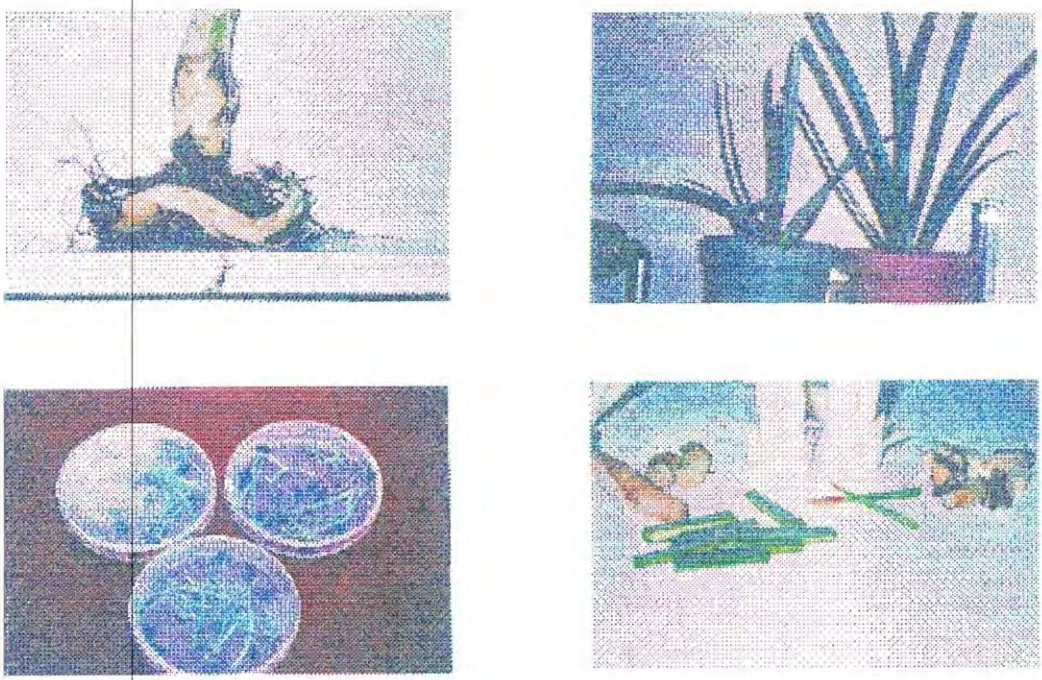

Figura 5.- Fuentes de explante y algunos de los explantes probados en el presente estudio.

RESULTADOS Y DISCUSION

Proliferación de callo

Velocidad de aparición o inducción

En general el desarrollo de callos está influenciado por el genotipo, el tipo de explante utilizado, la composición del medio de cultivo y las condiciones ambientales durante su incubación. Además la mayoría de los tejidos utilizados como explante requieren de la adición de uno o mas factores de crecimiento al medio de cultivo, para estimular el desarrollo del callo (Dodds and Roberts, 1990). En este sentido, se sabe que las auxinas y citocininas en conjunto con el pH, juegan un papel muy importante en la regulación de los procesos bioquímicos de la morfogénesis, promoviendo y modificando los mensajes químicos que regulan las reacciones bioquímicas responsables de un programa particular del desarrollo (Albersheim and Darvill, 1985; citado por Nava, 1988).

En el presente trabajo la inducción a la formación de callo duró aproximadamente de 5 a 11 días (dependiendo del tratamiento) tiempo en el cual se empezó a notar la formación del callo e inició el periodo de división celular en los bordes de los explantes.

El análisis estadístico para la rapidez de aparición de callo, (Cuadro 2), indicó una diferencia altamente significativa entre los tratamientos,

encontrándose que las mejores respuestas se dieron en el tejido de raíz (R) cultivado en el medio MS, conteniendo 3.39 μM de 2,4-D y 2.22 o 4.44 μM de BA (media = 5 días y rango promedio = 6), es decir con altos niveles de auxina y bajos o medianos niveles de citocinina.

En el tejido de tallo (T) se observó una respuesta similar, ya que el medio MS conteniendo altos niveles de auxina y valores bajos o medios de citocinina fueron los que presentaron mayor rapidez para la formación de callo (MS, conteniendo 3.39 μM de 2,4-D y 2.22 y 4.44 μM de BA, en los que se tuvieron medias de 6.66 y 6.33 días y rangos de 39.83 y 32.5 respectivamente). En el medio de Gamborg, no se marcó una tendencia clara entre los niveles de los factores de crecimiento, siendo los mejores tratamientos en el tejido de raíz el de 2.26 μM de 2,4-D con 2.22 μM de BA y el de 3.39 μM de 2,4-D con 6.66 μM de BA (con medias de 5.33 días y rangos de 12.17), mientras que en tejido de tallo, los mejores resultados se tuvieron con las combinaciones de 2.26 μM de 2.4-D con 6.66 μM de BA y 3.39 μM de 2,4-D con 6.66 μM de BA (medias de 6.67 días y rangos de 39.83).

La prueba de Tukey, con un nivel de significancia de 5%, demostró que no hubo diferencia significativa para la rapidez de aparición del callo entre los 2 medios de cultivo probados (Cuadro 3). Sin embargo hubo diferencias estadísticamente significativas entre los 2 tipos de explantes siendo mayor la rapidez de formación de callo en tejido de raíz que en tallo (Cuadro 4); asimismo se encontraron diferencias significativas entre los niveles de 2,4-D, en donde a medida que se incrementó el contenido de esta auxina en el medio de cultivo, se redujo el tiempo necesario para la aparición del callo (Cuadro 5), pero no se detectaron diferencias entre los 3 niveles de BA (Cuadro 6).

Groenewald *et al*, 1977 (citado por Robert, *et al*, 1992) reportaron la formación de callos de ***Agave* sp**. a partir de fragmentos de semillas, después de 6 semanas de cultivo en el medio de Linsmaier & Skoog (1965) adicionado con 1 mg/l (4.5 μM) de 2,4-D y 5 mg/l (23.2 μM) de BA. En oposición con esto, Robert, *et al* (1987), reportaron que los tejidos de semilla de ***A. fourcroydes***, no presentaron formación de callo bajo diferentes concentraciones de hormonas; lo cual indica que las respuestas a la formación de callo varían con el genotipo.

En lo que respecta a los otros explantes evaluados en el presente estudio, se observó que los tejidos de hojas provenientes de plántulas, tuvieron una respuesta relativamente pobre (en comparación con las respuestas de tallo y raíz), tanto en la velocidad de formación de callos como en la biomasa producida, observándose solo pequeños callos en la superficie de corte. En el caso de segmentos de hojas de plantas jóvenes e hipocotilos de plántulas, la respuesta fue nula. Debido a sus respuestas estos explantes no se tomaron en consideración para el análisis estadístico. Para el ***A. pacifica***, al igual que lo reportado por Robert y colaboradores (1987) en henequén, los explantes de hojas provenientes de plantas jóvenes no mostraron ninguna tendencia hacia la formación de callo. Sin embargo, en segmentos de hojas de plántulas si se observaron respuestas; aunque en menor grado que en tallo y raíz de la misma fuente. Esto tiene que ver, entre otras cosas, con el hecho de que los explantes mas jóvenes poseen mayor capacidad para la división celular, por tener mayor actividad meristemática (Pierik, 1987).

En forma adicional, Robert y colaboradores (1987), encontraron que en tejidos de rizoma de ***A. fourcroydes*** cultivados en los medios de Gamborg y

MS conteniendo 0.25 mg/l (1.13 μM) de 2,4-D y 1 mg/l (4.44 μM) de BA, la presencia de callo se manifestó a los 7 días, sin embargo, en el caso de ***A. pacifica***, los explantes de tallo y rizoma de plantas juveniles, evaluados en pruebas preliminares, no formaron callo en ninguno de los tratamientos probados, lo cual reafirma el hecho de que el genotipo, influencia el tipo de respuesta; o quizás las diferencias observadas sean debidas al tamaño y forma de tomar el explante. Evans, *et al*, (1981) señalaron que estos son factores muy importantes que deben ser considerados para obtener una buena respuesta. Aún así, la elección del explante es un punto que no ha sido bien documentado, normalmente el investigador elige el tamaño del explante dependiendo de los propósitos experimentales y del tejido donador. En el caso del maguey de bacanora, los explantes de tallo consistieron en solo la parte basal (una pieza cilíndrica de 1.5 cm de altura), la cuál se dividió longitudinalmente y transversalmente en 4 partes iguales, para el tejido de rizoma, los explantes consistieron en discos de corte transversal, de aproximadamente 0.5 cm de longitud; mientras que en el caso del henequén se tomó solo un cubo de 5 x 5 x 5 cm del tejido blanco, proveniente del centro del tallo.

En el caso de las monocotiledóneas, se sabe que carecen de crecimiento secundario y que por lo tanto carecen de cámbium (tejido asociado con la división celular *in vivo* e *in vitro* en las dicotiledóneas); sin embargo esto no es totalmente aplicable a la familia Agavaceae, ya que estas plantas poseen un crecimiento secundario derivado de un meristema (meristema de engrosamiento secundario, MES), el cual funciona en toda la parte del tallo que ha completado su elongación y origina haces vasculares hacia afuera del parénquima (Esau, 1976).

Con el fin de detectar el lugar donde se sitúa el MES, Nava (1988), demostró que en el tallo del maguey tequilero existe un "cilindro aprovechable" (CA), el cual, en plantas de aproximadamente 2 años de edad, consistió en una pieza cilíndrica central del tallo de aproximadamente 3 cm de diámetro por 2.5 cm de altura, a partir de la cual tomó diferentes tipos de cortes: extrajo un cilindro de la parte central, un cilindro intermedio y un cilindro de la periferia del CA. A cada uno de estas piezas le hizo 4 cortes laterales o longitudinales. Además cortó longitudinalmente todo el CA y por separado la cúpula del CA. Los explantes los llevó a un medio para callos (4.5 μM de 2,4-D y 4.44 μM de BA) y posteriormente a un medio para brotes (2.9 μMde AIA y 13.3 μM de BA). Aunque no pudo definir la ubicación del MES, observó un gradiente de mayor formación de brotes en los explantes obtenidos de los cilindros céntrico, intermedio y periférico de CA cortados longitudinalmente. En estos explantes el callo apareció en la parte inferior.

Las pobres respuestas observadas en los tejidos de hojas y tallos de plantas jóvenes, así como de hojas de plántulas, coincidieron con el encafecimiento u oxidación del tejido y el medio de cultivo, quizá debido a la emisión de compuestos fenólicos (inhibidores) del tejido hacia el medio de cultivo. Aún en explantes previamente tratados con soluciones antioxidantes de ácido cítrico - ácido ascórbico a diferentes concentraciones (1, 3 y 5 %) no hubo respuesta favorable.

Ziv and Halevy (1983), probaron que la adición de ácido cítrico y ascórbico al medio de cultivo (150 y 100 mg/l respectivamente) y la posterior inmersión de los explantes en ácido ascórbico al 1%, por lapsos de 12, 24, 48 y 72 h, probó

ser un método efectivo para prevenir las reacciones de encafecimiento oxidativo que limitan el desarrollo de callo y promueven la necrosis del tejido.

Se sabe que la emisión de compuestos fenólicos del explante hacia el medio de cultivo, promueve las reacciones de oxidación (redox) de los explantes (observándose un encafecimiento de los tejidos y el medio circundante), limitando la división celular y promoviendo la senescencia. Existe una interdependencia entre el oxígeno y la radiación ionizante que intensifica las reacciones redox y consecuentemente acelera los procesos de senescencia. Según la "hipótesis del Regulador-Antioxidante", se ha tratado de relacionar la regulación del crecimiento, el desarrollo y la edad, con el balance de oxidantes (receptores de electrones) y antioxidantes (donadores de electrones) a nivel celular, tejido u organismo (Siegel and Porto, 1961; citado por Nava, 1988; Pierik, 1987).

Por otro lado, según sus respuestas en relación a la formación de callo ante la presencia de auxinas y citocininas, se han establecido 4 categorías de tejidos vegetales: 1) tejidos que requieren solamente de una auxina, 2) tejidos que requieren solo de una citocinina, 3) tejidos que requieren de ambos reguladores y 4) tejidos que requieren de complejos naturales (Dodds and Roberts, 1990).

Un análisis estadístico por separado para explantes de raíz y tallo, indicó que tanto en tejido de tallo como en raíz a mayor contenido de 2,4-D hubo una respuesta significativamente mayor en la aparición del callo (Cuadros 7 y 8); lo cual indica que ambos tejidos requieren solo de 2,4-D para el desarrollo de callo; o bien, necesitan de esta auxina además de BA. Esta segunda

posibilidad, no fue posible de descartar, dado que no se probó el nivel de 0 μM de BA, pero los resultados sugieren que la BA no tiene influencia sobre la inducción a la formación de callo, ya que la concentración de BA no presentó efectos significativos.

Biomasa del callo formado

Para evaluar la respuesta de los diferentes tratamientos con respecto a la cantidad de biomasa del callo formado, se estableció una escala arbitraria, asignando los siguientes valores: 1 = respuesta muy mala, 2 = mala, 3 = regular, 4 = buena, 5 = muy buena y 6 = excelente.

La prueba de Kruskal-Wallis (Cuadro 9), indicó una diferencia altamente significativa entre tratamientos. Sin embargo no se detectó diferencia significativa entre los medios de cultivo (Cuadro 10), ni entre los explantes de raíz y tallo (Cuadro 11); pero si la hubo entre los diferentes concentraciones de 2,4-D, observándose que a medida que se incrementaba el contenido de esta hormona en el medio de cultivo, la respuesta fue mas favorable (Cuadro 12). Por el contrario la concentración de BA no tuvo efectos significativos en la cantidad de callo formada (Cuadro 13).

Así los tratamientos que presentaron mejores resultados fueron: el medio MS con tejido de tallo conteniendo 3.39 μM de 2,4-D con 2.22, 4.44 o 6.66 μM de BA (medias catalogadas en el rango de excelente de: 5.67, 6.00 y 6.00 respectivamente). En comparación con estos resultados, Robert, *et al* (1987) reportaron una elevada proliferación de callo, pero obtenido a partir de tejidos de tallo y rizoma de ***A. fourcroydes***, subcultivado en MS conteniendo 0.25 mg/l (1.13 μM) de 2,4-D y 1 mg/l (4.44 μM) de BA; en el caso de ***A. pacifica***, si bien

es cierto que este tratamiento produjo buena cantidad de callo en los explantes probados, no fue el que tuvo mejor respuesta.

El efecto positivo de concentraciones relativamente altas de 2,4-D sobre la producción de callo, fue observado por Nava (1988). El estableció que en segmentos de la porción no fibrosa del tallo de ***A. tequilana*** las mejores respuestas se observaron en MS conteniendo 5 μM de 2,4-D y 4.44 μM de BA, sin embargo niveles mayores de estas hormonas no resultaron en mayor producción de biomasa en el callo.

El efecto de la concentración de 2,4-D tanto en la velocidad de aparición como en la biomasa del callo producida, es totalmente lógica, si se toma en cuenta que Witham en 1968 (citado por Nava 1988), estableció que el 2,4-D es una auxina de alta eficiencia capaz de estimular la proliferación de callos, tanto en ausencia de citocininas como en combinación con éstas. Witham sugirió tres posibles mecanismos de acción, para esta auxina:

1) El 2,4-D actúa primariamente como auxina y secundariamente estimula la síntesis de citocininas, 2) las citocininas no necesariamente causan la división celular, sino que incrementan la sensibilidad de un tejido a reacciones estimuladas por el 2,4-D, 3) el 2,4-D actúa como citocinina además de actuar como auxina. No obstante, Witham se inclina mas por la segunda posibilidad, dado que el 2,4-D solo no es capaz de estimular la brotación, pero su presencia en el medio hace que algunas citocininas débiles (como la adenina, metiladenina o etiladenina) sean capaces de expresar su actividad.

Calidad del callo formado

La calidad del callo obtenido en los diferentes tratamientos se presenta en el Cuadro 14. En el se puede observar que los tejidos de raíz formaron en su mayoría callos friables, de color pardo a verde claro, con alta tendencia a la oxidación y escasa tendencia a la organogénesis, con excepción de los tratamientos en los que se utilizó el medio MS a altas concentraciones (3.39 μM) de 2,4-D. En estos tratamientos se observó la presencia de callos duros altamente organogénicos (formando estructuras similares a raíces y agrupaciones de células como embriones, pero sin llegar a brotes).

La dependencia de los tejidos a la presencia de auxinas y/o citocininas, es atribuida a su incapacidad para producir los factores de crecimiento en forma endógena, y la posterior independencia, autonomía o habituación exhibida por los explantes después de una serie de subcultivos, es consecuencia de la capacidad gradual adquirida por el tejido para sintetizar suficientes cantidades de reguladores de crecimiento, como para prescindir de las fuentes exógenas (Pierik, 1987). Como se mencionó en párrafos anteriores, Groenewald, *et al*, 1977 (citado por Robert, *et al*, 1992) reportaron la formación de callos de ***Agave* sp**. a partir de fragmentos de semillas, pero no señalaron datos cuantitativos ni cualitativos del proceso, pero por su parte, Madrigal y colaboradores (1981) reportaron la formación de callos suaves y friables en medios con auxina y callos compactos en medios con auxina y citocinina.

En lo que respecta a los tejidos de tallo (Cuadro 14), se observó que hubo mejores respuestas en color (verde claro a verde intenso) y apariencia de callo (blandos y duros), en comparación con el callo de raíz. También hubo una

mayor respuesta a la organogénesis, incluyendo la formación de yemas y brotes, cuando el callo se dejó de subcultivar por mas de 6 semanas.

La diferenciación celular es un proceso inevitable cuando el cultivo continúa en el medio original, y puede prevenirse manteniendo la proliferación del callo indefinidamente, mediante subcultivos consecutivos a corto plazo en medio fresco (Evans, *et al*, 1981; Pierik, 1987; Rashid, 1988).

Por otro lado, Nava (1988), encontró que la iluminación y el fotoperiodo son factores físicos que influencían significativamente el proceso de formación y la calidad de los callos, observando que los callos provenientes de tallo de ***A. tequilana***, mostraron una mayor tendencia al color verde en condiciones de luz, mientras que en oscuridad tendieron al color blanco. Sin embargo, como las condiciones de oscuridad favorecieron el incremento en peso fresco, y el ácido ascórbico añadido al medio de cultivo a razón de 1 μM, en condiciones de oscuridad mostró un buen control de la oxidación en la fase de establecimiento del callo (inducción), para compensar esos efectos, en la presente investigación se trabajó con fotoperiodo de 12 h.

En forma adicional, en este trabajo se observó también que el tejido de tallo sembrado en MS fue mas organogénico que el sembrado en el medio de Gamborg, mientras que la tendencia a la oxidación fue similar en ambos medios de cultivo. A este respecto Robert y colaboradores (1987), observaron que un factor controlante clave para el crecimiento de callo y posterior organogénesis fue el balance de iones nitrato:amonio, en el medio de cultivo. Ellos probaron distintos medios de cultivo: MS, Gamborg, y Schenk-Hildebrandt

suplementados con diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento: 2,4-D, AIB, AIA, ANA, BA, y cinetina.

Número de brotes regenerados a partir del callo

En cuanto al número de brotes obtenidos, la prueba de Kruskal-Wallis (Cuadro 15) indicó una diferencia altamente significativa entre los tratamientos, se observó que los tratamientos mas efectivos fueron: en el caso de tallo de plántulas, el medio de MS conteniendo 1.13 μM de 2,4-D y 4.44 μM de BA, MS con 1.13 μM de 2,4-D y 6.66 μM de BA, y el MS con 1.13 μM de 2,4-D y 2.22 de μM de BA en los cuales se obtuvieron medias de 12.33, 8.67 y 7.33 brotes/repetición respectivamente, durante 6 meses de subcultivo. En lo que respecta al medio de Gamborg, la mejor combinación de reguladores de crecimiento fue la de 1.13 μM de 2,4-D y 6.66 μM de BA, donde se obtuvo un promedio de 10 brotes/repetición, en 6 meses de subcultivo.

Las pruebas de Tukey con un nivel de significancia de 5%, indicaron diferencias estadísticamente significativas entre los 2 medios de cultivo, entre los 2 tipos de explantes, entre los 3 niveles de 2,4-D y entre los 3 niveles de BA.

Como se puede observar en el Cuadro 16, el callo subcultivado en el medio MS generó una mayor cantidad de brotes (promedio de 3.24) que el subcultivado en el medio de Gamborg (1.93). Este efecto probablemente haya sido debido a las diferencias en la relación de iones, existentes entre los 2 medios de cultivo, principalmente la proporción de NH_4^+: NH_3^-. Robert y colaboradores (1987), demostraron que la relación de estos iones, en presencia de 2,4-D y BA, juega un papel muy importante en la organogénesis

del callo producido por segmentos de rizomas de ***A. fourcroydes***, aunque no demostró tener un efecto significativo en los segmentos de tallo, esto evidencía las diferentes respuestas que pueden tener los distintos explantes.

En el caso del ***A. pacifica*** los segmentos de tallo de plántulas resultaron mas organogénicos que los de raíz (Cuadro 17). El callo de tallos generó en promedio 4.56 brotes, mientras que el de raíz apenas 0.61.

En lo que respecta al efecto de la concentración de 2,4-D (Cuadro 18), se observó que conforme disminuyó la cantidad de esta auxina en el medio de cultivo se produjo una mayor brotación. Los tratamientos que contenían 1.13 μM de 2,4-D fueron significativamente superiores, ya que tuvieron un promedio de 4.91 brotes, por 1.61 y 1.22 brotes para los tratamientos con 2.26 y 3.39 de la auxina respectivamente.

Por el contrario, en lo concerniente al efecto de la concentración de BA, se observaron resultados significativamente superiores en los tratamientos con 6.66 μM de BA (3.17 brotes por repetición). La tendencia fue a mayor concentración de esta citocinina, mayor brotación; aunque no hubo diferencia significativa entre los tratamientos con 2.22 y 4.44 μM de BA (Cuadro 19).

La figura 6, muestra la formación de brotes generados a partir de callo, un aspecto importante de resaltar es la presencia de raíces en los brotes a bajas concentraciones de 2,4-D y bajos niveles de BA.

La citocinina, benciladenina (BA), es con mucho el mas eficiente promotor de la formación de brotes adventicios en muchas plantas, aunque también la

cinetina, el 2-isopentiladenina (2-iP) y la zeatina, han probado tener un efecto notable (Pierik, 1987; Rashid, 1988). Nava (1988), demostró que la BA es mas eficiente promotor de brotes que el 2 iP y la cinetina, en tejido de callo proveniente de segmentos de tallos de ***A. tequilana***. Este mismo autor observó que a medida que se incrementaba la concentración de BA se aumentaba también el número de brotes, lo cual concuerda con los resultados reportados en la presente investigación. El encontró que en el medio MS conteniendo 100 μM de BA y 2.9 μM de AIA, se obtuvieron en promedio 7.1 brotes en 11 semanas de cultivo. Este autor encontró que los tratamientos conteniendo solo citocininas (sin auxinas), no dieron respuesta a la formación de brotes, dejando en claro que para esta especie es necesaria la presencia de auxinas para la morfogénesis en el callo.

Por su parte, Powers y Backhaus (1989), realizaron exitosamente la propagación *in vitro* de ***Agave arizonica***, usando el medio MS suplementado con altas concentraciones de BA (44.4 μM) y 5.4 μM de ANA, lograron la proliferación de brotes a partir del callo después de 12 semanas de cultivo. Inicialmente obtuvieron una masa de brotes verdes y cada brote fue subcultivado por separado en este mismo medio, formando de 5 a 10 nuevos brotes después de 3 meses de cultivo.

Proliferación de brotes adventicios

Como se mencionó con anterioridad la formación de brotes adventicios está influenciada por un gran número de complejos factores, entre los que se

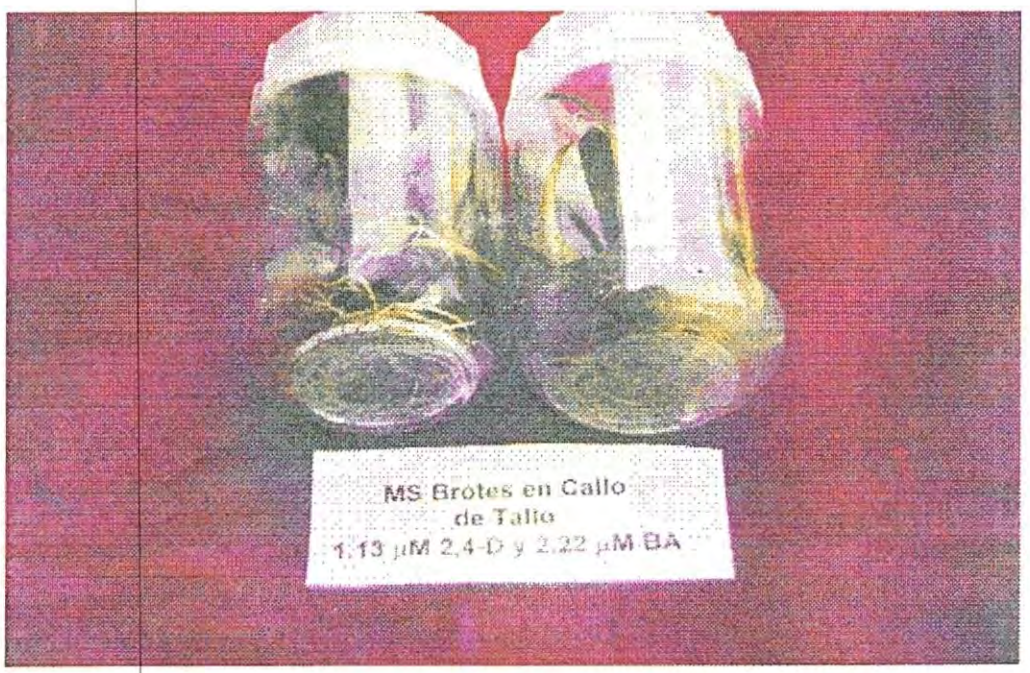

Figura 6.- Brotes de ***A. pacifica***, regenerados a partir de callo proveniente de segmentos de tallos de plántulas

puede destacar la relación auxina-citocinina. La conclusión general en la mayoría de los trabajos de formación de brotes adventicios, es que para provocar este efecto, casi siempre se requieren de altas concentraciones de citocininas y bajas concentraciones de auxinas y la relación entre estos 2 reguladores es un factor determinante para el proceso de formación de brotes (Pierik, 1987; Rashid, 1988).

En el caso de las plantas del género ***Agave***, la proliferación de brotes adventicios directamente del explante ha sido investigada por varios autores. Se ha demostrado que la naturaleza y forma de tomar el explante es otro aspecto importante para la generación de brotes adventicios. Nava (1988), observó que el cilindro céntrico del centro aprovechable (CA) del tallo de ***A. tequilana*** cortado en plano longitudinal fue el mas efectivo para la formación de brotes adventicios. En este tejido, los brotes aparecieron en una zona inmediata a los lados de, y por debajo del meristema apical del vástago.

Por su parte, como se indicó en secciones anteriores, Binh y colaboradores en 1990, desarrollaron una metodología para la proliferación de brotes adventicios en plantas de ***A. cantala***, ***A. fourcroydes*** y ***A. sisalana***. Ellos usaron una pieza cilíndrica de 7-8 mm (proveniente de los brotes obtenidos de estolones cultivados en arena), el cual contenía los meristemos axial y apical. Este cilindro fue dividido en 8 partes iguales mediante cortes verticales y cada segmento fue sembrado en forma individual en el medio basal de MS, complementado con 2% de sacarosa, 10% de agua de coco, 0.8% de agar y varias combinaciones de reguladores de crecimiento. La combinación de reguladores de crecimiento más apta para el establecimiento de rebrotes múltiples fue la que contenía 0.075 mg/l de ANA, 0.1 mg/l de AIB y 0.05 mg/l de

cinetina. Las velocidades de multiplicación (número de yemas regeneradas por cada yema inicial presente en el racimo) fueron de 3-4 en 4-5 semanas de subcultivos.

Robert y colaboradores (1987), observaron la aparición de rebrotes directamente a partir de explantes de tallo y rizomas; en este aspecto el tratamiento mas efectivo fue en el que se utilizó el medio modificado de MS conteniendo 18 mM de $NaNO_3$, 5 mM de NH_4NO_3, 10 mg/l (46.4 μM) de BA y 0.025 mg/l (0.115 μM) de 2,4-D. En explantes de tallo al cultivarse a altas concentraciones de citocininas, se indujo la formación de brotes adventicios directamente del explante y cuando estos fueron cortados y subcultivados, dichos brotes formaron callo en su base y a partir de ahí se regeneraron nuevos rebrotes.

En otro trabajo, Frydrych (1982), logró la formación de brotes en segmentos de tallo provenientes de bulbillos de ***A. sisalana***, usando el medio MS, suplementado con 0.2 mg/l de AIA y 2 mg/l de BA.

En lo que respecta al maguey de bacanora, aunque en esta investigación, no se pudo establecer un experimento con suficientes repeticiones para hacer el análisis estadístico, se observó que el tejido de rizoma y tallo de plantas juveniles respondieron bien a los diferentes tratamientos, mostrando una proliferación de brotes a las 4-5 semanas después de iniciado el cultivo. En el caso de los segmentos de tallo de plántulas, la proliferación de los brotes se inició entre las 5-6 semanas iniciales de cultivo. En las Figuras 7, 8 y 9 se observa la respuesta de los explantes a las diferentes concentraciones de BA. En los 3 casos aparentemente la mejor respuesta se observó con los niveles de

En los 3 casos aparentemente la mejor respuesta se observó con los niveles de 5 y 10 mg/l de BA. Por otro lado, se observó además, que las raíces tendieron al encallado en los 3 niveles de citocinina probados y que en el caso del tejido de hipocotilo la respuesta fue prácticamente nula.

La Figuras 10 y 11, muestran la presencia de brotes adventicios, creciendo directamente de los explantes.

Enraizamiento y aclimatatación

El enraizamiento se realizó con éxito en los medios de cultivo originales conteniendo 0.025 mg/l de 2,4-D, pero libres de citocininas, obteniéndose un 100% de brotes enraizados.

La aclimatación de las plantas enraizadas se realizó en una mezcla de suelo inerte Peat-most-arena (50-50%), manteniéndose bajo condiciones de invernadero.

Las plantas del género ***Agave***, son bastante resistentes y fácilmente aclimatables a las condiciones de su hábitat natural, en todos los estudios de microropagación reportados en este tipo de especies, se ha observado que los

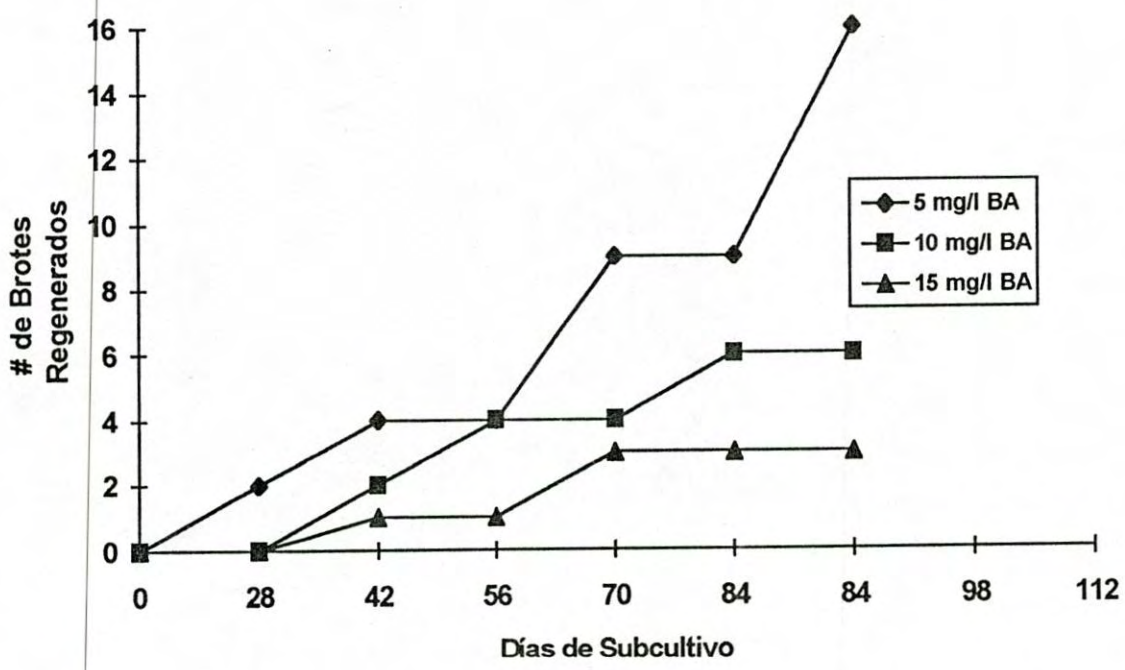

Figura 7.- Número de brotes adventicios regenerados a partir de tejido de tallo de plantas juveniles

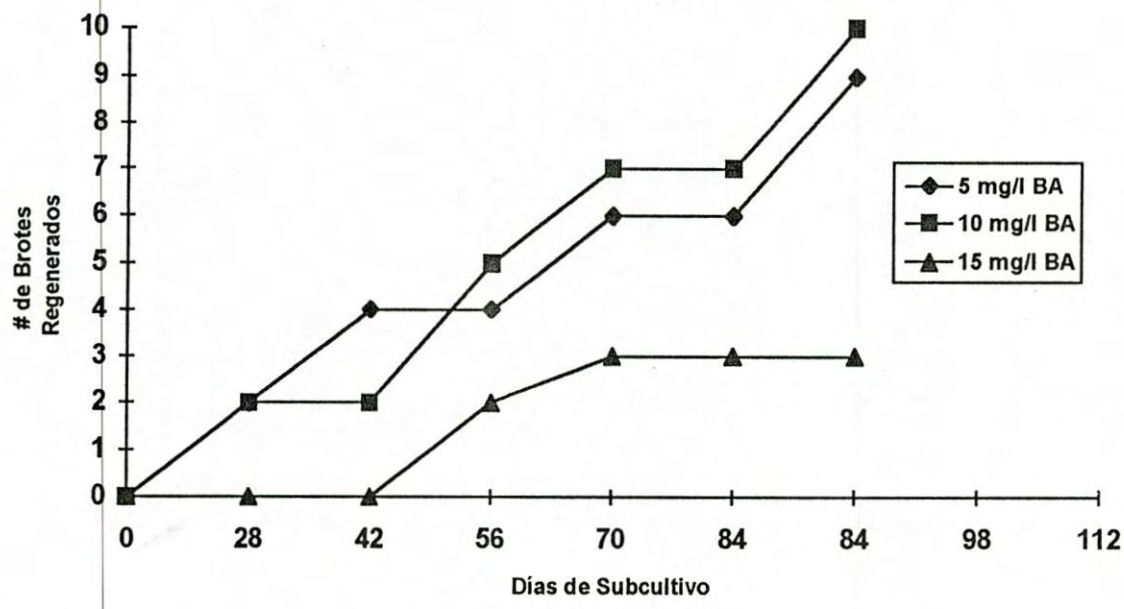

Figura 8.- Número de brotes adventicios regenerados a partir de tejido de rizoma de plantas juveniles

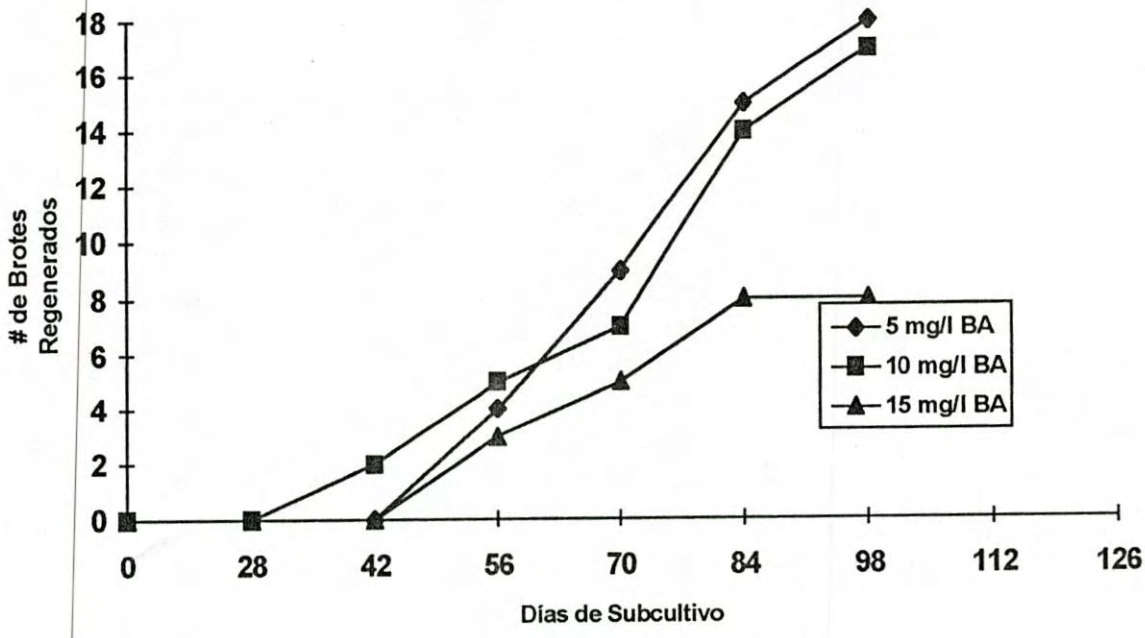

Figura 9.- Número de brotes adventicios regenerados a partir de tejido de tallo de plántulas.

Figura 10.- Brotes adventicios regenerados directamente de tejido de rizoma.

Figura 11.- Brotes adventicios regenerados directamente de tejido de tallo de plántulas.

rebrotes regenerados por vía callo u organogénesis directa formaron extensivos sistemas radiculares *in vitro* y al transferirse a cultivo en macetas, se ha obtenido entre 90 y 100% de supervivencia (Binh, *et al*, 1990; Das, 1992; Frydrich, 1982; Huang y Backhaus, 1990; Nava, 1988; Powers y Backhaus, 1989; Robert, *et al*, 1987)

La figura 12 presenta algunas de las plantas aclimatadas creciendo en tierra colocada en vasos de poliestireno.

Figura 12.- Plantas regeneradas y aclimatadas, creciendo en tierra bajo condiciones ambientales de la región.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

1.- En el presente trabajo la inducción a la formación de callo duró entre 5 y 11 días (dependiendo del tratamiento), tiempo en el cual se empezó a notar la formación del callo e inició el periodo de división celular en los bordes de los explantes.

2.- Para la velocidad de aparición de callo se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los 2 tipos de explantes, siendo mayor la rapidez de formación de callo en tejido de raíz que en tallo, así como entre los niveles de 2,4-D, observándose que a medida que se incrementó el contenido de esta auxina en el medio de cultivo, se redujo el tiempo necesario para la aparición del callo.

3.- Los mejores resultados se presentaron con tejidos cultivados en el medio de MS , conteniendo 3.39 μM de 2,4-D y 2.22 o 4.44 μM de BA, en el cual los segmentos de raíz necesitaron de 5 días para la aparición del callo, mientras que los trozos de tallo, necesitaron entre 6 y 7 días.

4.- En lo referente a la biomasa del callo, no se detectó diferencia significativa entre los medios de cultivo, ni entre los explantes de raíz y tallo de plántulas. Tampoco hubo diferencias significativas entre los niveles de benciladenina; pero si entre los diferentes niveles de 2,4-D, observándose que a medida que se incrementó el contenido de hormonas en el medio, la respuesta fue mas favorable. Los tratamientos que presentaron mejores

resultados fueron: el medio MS con tejido de tallo conteniendo 3.39 μM de 2,4-D con 2.22, 4.44 o 6.66 μM de BA. Otro tratamiento que presentó buenos resultados fue el medio de Gamborg conteniendo 2.26 μM de 2,4-D y 2.22 μM de BA.

5.- En cuanto a la calidad del callo obtenido en los diferentes tratamientos se observó que los tejidos de raíz formaron en su mayoría callos friables, de color pardo a verde claro, con alta tendencia a la oxidación y escasa hacia la organogénesis, con excepción de los tratamientos en los que se utilizó el medio MS a altas concentraciones (3.39 μM) de 2,4-D, en estos tratamientos se observó la presencia de callos duros altamente organogénicos (formando estructuras similares a raíces y agrupaciones de células como embriones, pero sin llegar a formar brotes). Por el contrario en los tejidos de tallo, se observaron mejores respuestas en cuanto a color (verde claro a verde intenso) y textura de callo (blandos y duros). También hubo una mayor respuesta a la organogénesis incluyendo la formación de yemas y brotes. El callo proveniente de tejido de tallo sembrado en MS, fue mas organogénico que el sembrado en el medio de Gamborg; mientras que en lo referente a la oxidación la respuesta fue similar en ambos medios de cultivo.

6.- Según los resultados obtenidos, se puede establecer que los explantes de raíz y tallo de plántulas requieren tanto de la presencia de auxinas como de citocininas para la formación de callo, y que los niveles de auxina ejercen un efecto directo sobre dicha respuesta.

7.- Se observó que los tejidos de hojas provenientes de plántulas, tuvieron una respuesta relativamente pobre (en comparación con las respuestas de tallo

y raíz), tanto en la velocidad de formación de callos como en la biomasa producida, observándose solo pequeños callos en la superficie de corte. Los segmentos de hojas de plantas jóvenes e hipocotilos de plántulas, tuvieron respuestas nulas. Estas respuestas se asociaron con la emisión de compuestos fenólicos (inhibidores) observada del tejido hacia el medio de cultivo, los cuales promueven las reacciones de oxidación (redox) de los explantes, limitan la división celular y aceleran la senescencia.

8.- En cuanto al número de brotes obtenidos, se encontraron diferencias significativas entre los niveles de todas las variables (medios de cultivo, tipos de explantes, niveles de 2,4-D y niveles de BA). Se observó un mayor número de brotes en el medio MS, en tejido de tallo, bajos niveles de 2,4-D (1.13 μM) y altos niveles de BA(6.66 μM); así, los tratamientos mas efectivos fueron: en el caso de tallo de plántulas, el medio de MS conteniendo 1.13 μM de 2,4-D y 4.44 μM de BA, MS con 1.13 μM de 2,4-D y 6.66 μM de BA, y el MS con 1.13 μM de 2,4-D y 2.22 de μM de BA en los cuales se obtuvieron medias de 12.33, 8.67 y 7.33 brotes/repetición respectivamente, durante 6 meses de subcultivo. En lo que respecta al medio de Gamborg, la mejor combinación de reguladores de crecimiento fue la de 1.13 μM de 2,4-D y 6.66 μM de BA, donde se obtuvo un promedio de 10 brotes/repetición, en 6 meses de subcultivo.

9.- En lo que respecta a la proliferación de brotes adventicios, aunque no se pudo establecer un experimento con suficientes repeticiones para hacer el análisis estadístico, se observó que el tejido de rizoma y tallo de plantas juveniles responden bien a los diferentes tratamientos, mostrando una proliferación de brotes a las 4-5 semanas después de iniciado el cultivo. En el caso de los segmentos de tallo de plántulas, la proliferación de los brotes,

inició entre las 5-6 semanas iniciales de cultivo. En los tres casos las mejores respuestas se observaron a los niveles de 5 y 10 mg/l (23.2 y 46.4 μM) de BA.

10.- Se observó que las raíces tendieron al encallado en los 3 niveles de citocinina probados y que en el caso del tejido de hipocotilo, la respuesta fue nula.

11.- En el presente trabajo, el contenido de hormonas se mantuvo constante en cada tratamiento durante todas las fases de micropropagación. Sin embargo, es probable que las respuestas puedan ser optimizadas si se utilizan formulaciones específicas para cada etapa.

De acuerdo a los resultados obtenidos, para la propagación in vitro de ***A. pacifica*** se puede recomendar lo siguiente:

1.- Para la multiplicación vía callos, se recomienda:

a) Utilizar explantes de tejido de raíz y tallo de plántulas.

b) En las dos primeras fases (inducción a la formación del callo y la división celular para la obtención de biomasa), para los dos tipos de explantes usar indistintamente el medio de MS o el medio de Gamborg, conteniendo 3.39 μM de 2,4-D y 2.22 μM de BA.

c) Para la regeneración de brotes a partir del callo, es conveniente usar el medio MS a bajas concentraciones de 2,4-D y altas de BA.

2.- Para el caso de la proliferación directa de brotes adventicios, se recomienda:

a) Utilizar explantes de rizoma y tallo provenientes de plantas jóvenes y tallos de plántulas provenientes de semillas germinadas.
b) Utilizar el medio de MS modificado, conteniendo de 5 a 10 mg/l de BA y 0.025 mg/l de 2,4-D.

3.- La multiplicación vía callos se recomienda como un método de micropropagación, para inducir la variación somaclonal en brotes creciendo en condiciones de estrés (sequía, agroquímicos, temperatura, irradiación, etc.) y producir variantes resistentes a dichas condiciones.

4.- La proliferación directa de brotes adventicios es un método aceptable de micropropagación, dado que reduce las posibilidades de variabilidad en los brotes. Se recomienda trabajar mas en la etapa de selección y esterilización de los explantes, dado que para el maguey de bacanora, los altos índices de contaminación observados al trabajar con plantas silvestres, no permitieron el establecimiento de un estudio que pudiera ser respaldado estadísticamente.

5.- La implementación de las técnicas de cultivo *in vitro* para la propagación del maguey de bacanora, permitirá la recuperación de la población silvestre de este sobrexplotado recurso; pudiendo obtener además material vegetal para su cultivo intensivo y aprovechamiento industrial a mediano plazo.

6.- Con el desarrollo de la industria regional del bacanora, se diversificarán las actividades productivas de las zonas serranas y se generarán nuevas alternativas de ingreso para sus habitantes, así como una mayor derrama económica en la región.

BIBLIOGRAFIA

Binh, L. T., L. T. Muoi, H. T. K. Oanh, T. D. Thang and D. T. Phong. 1990. Rapid propagation of agave by *in vitro* tissue culture. Plant Cell Tiss.Org. Cult. 23(1): 67-70.

Canizales, G. 1995. Estudio para la selección de la tecnología de producción de bacanora. Tesis de licenciatura. Universidad de Sonora. Hermosillo Son., México. pp. 64.

Canizales, G., S. S. F. Moreno, B. R. León y H. D. Martínez. 1995. Proceso tradicional de elaboración de bacanora y estudio de las condiciones a nivel laboratorio. Memorias de la IX Conferencia Internacional Sobre Jojoba y sus Usos y III Conferencia Internacional Nuevos Cultivos y sus Productos. Catamarca. Argentina.

Colunga, P. and F. May. 1993. Agave studies in Yucatan, Mexico. I. Past and present germoplasm diversity and uses. Econ. Bot. 43(3): 312-327.

Das, T. 1992. Micropropagation of Agave sisalana. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 31 (3): 253 -255.

Dixon, R. A. 1985. Plant cell culture-A practical aproach. Ed. IRL press Limited. England. pp 236.

Dodds, J. H.and L.W. Roberts. 1990. Experiments in plant tissue culture.2a. ed. Ed. Cambridge University Press. U.S.A. pp. 231.

Essau, K. 1976. Anatomía vegetal. Traducido del inglés por J. Pons-Rosell. Ed. Omega. Barcelona. pp 779.

Evans, D. A., W. R Sharp, and C. E. Flick 1981. Growth and behavior of cell cultures: embriogenesis and organogenesis. In: Plant tissue culture-methods and applications in agriculture U.S.A. Ed. Academic Press, Inc. pp. 45-113.

Freeman, C. E. and W. H. Reid. 1985. Aspects of the reproductive biology of ***Agave lechuguilla*** Torr. Desert Plants. 7 (2): 75 - 80.

Frydrych, D. 1982. Induction *in vitro* de bourgeons adventifs á partir du sisal. Premier résultats. Cot. Fib. Trop. 37(3): 295-303.

García, E. and P.S. Nobel. 1990. Leaf unfolding rates and responses to cuticle damaging for pulque agaves in México. Desert Plant. 10 (2): 55-57.

Gentry, H. S. 1972. The Agave famili in Sonora. Agriculture handbook Nº 399. Ed. USDA. Washington, D. C. U.S.A. pp.240.

Gentry, H. S.1982. Agaves of Continental North America. Ed. The University of Arizona Press. pp. 630.

Huang, D. S. and R. Backhaus. 1990. Micropropagation of selected desert adapted species-gum tragacant, candelilla, guayule, clifrose, bottle tree, red squil, Arizona agave and spider lily propagation from tissue culture. Hortsci. 25 (9): 124.

Hurtado, M. D. y M. M. Merino. 1988. Cultivo de tejidos vegetales. 1ª ed. Ed. Trillas. México, D. F. pp. 232.

Idrayanto, G., L. Rahayu, A. Rahman and P. E. Noereani. 1993. Effect of calcium, strontium, and magnesium ions on the formation of phytosteroids in callus cultures of ***Agave amaniensis***. Planta Medica. 59: 97-98.

Infante, S. y G. P. Zárate. 1984. Métodos estadísticos. Un enfoque interdisciplinario. Ed. Trillas. México, D. F. pp. 643.

Madrigal, R., Pineda, F. y J. L. Rodriguez de la O. 1983. ***Agave***. In: Handbook of plant cell culture. Ed. Mc Graw-Hill Publishing Co.New York. USA. 5(9):206-227.

Mantell, S. H., J. A. Matthews and R. A. Mckee. 1990. Principles of plant biotechnology. An introduction to genetic engineering plants. Ed. Blackwell Scientific Publications. pp. 130-157.

McLaughlin, S. P. and S. M. Schuck. 1991. Fiber properties of the species of Agavaceae from the southwestern United States and Nothern México. Econ. Bot. 45 (4): 480-486.

Muñoz, G. 1994. La industria del tequila. Revista del Consumidor. Ed. PROFECO. México D. F. junio: 9-16.

Nava, A. 1990. Micropropagación de agaves. En Micropropagación vegetal en México. Avances y resultados II. FIRA Boletín informativo. 22(217): 35.

Nava, A. 1988. ***Agave tequilana*** Weber azul in vitro: un modelo para estudios en morfogénesis. Tesis de Maestría. Colegio de postgraduados. Centro de Genética. Montecillos, México. pp. 233.

Nobel, P. S. 1992. Annual variations in flowering percentage, seedling stablisment, and ramet production for a desert perennial. Int Jour. Plant Sci. 153 (1): 102-107.

Nobel, P. S. 1990. Enviromental influences on CO_2 uptake by agaves, CAM plants with high productivities. Econ. Bot. 44(4): 488-502.

Nobel, P. S. 1983. Nutrients levels in cacti-relation to nocturnal acid accumulation and growth. Amer. Jour. Bot. 70(8):1244-1253.

Nobel, P. S. 1976. Water relations and photosynthesis of a desert CAM plant, Agave deserti. Plant Physiol. 63: 63-66.

Nobel, P. S. and T. L. Hartsock. 1981. Shifts in the optimal temperature for nocturnal CO_2 uptake caused by changes in growth temperature for cacti and agaves. Plant Physiol. 53: 523-527.

Osborne, J. F. and D. P. Singh. 1980. Sisal and other long fiber agaves. In Hybridization of crop plants.Ed. Amer. Soc. Agron. Crop Sci. 565-575.

Perea, D. M. y A. W. Navarro. 1988. Técnicas *in vitro* para la producción y mejoramiento de plantas. 2ª. ed. Ed. Universidad Nacional Heredia de Costa Rica. pp. 104.

Pierik, R. L. M. 1987. *In vitro* Culture of Higher Plants. 2ª ed. Ed. M. N. P. Dordretch, Holanda. pp. 331.

Powers, D. E. and R. A Backhaus. 1989. *In vitro* propagation of ***Agave arizonica*** Gentry and Weber. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 16 (1): 57 -60.

Rashid, A. 1988. Cell physiology and genetics of higher plants. Ed. CRC Press, Inc. USA.(1): pp. 159.

Robert, M. L., J. L. Herrera, J. L. Chan and F. Contreras. 1992. Micropropagation of ***Agave*** sp. In: Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 19. High-Tech and Micropropagation III by Y. P. S. Bajaj. Ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp. 206-252.

Robert, M. L., J. L. Herrera, F. Contreras, and K. N. Scorer. 1987. *In vitro* propagation of ***Agave fourcroydes*** Lem. (henequen). Plant Cell Tiss. Org. Cult. 8 (1): 37-48.

Robert, M. L. 1985. El cultivo de tejidos vegetales en México. En Prospectivas de la Biotecnología en México. Ed. CONACYT. México, D. F. pp. 367-393.

Sharma, O. P. and P. Khana. 1980. Studies on steroidal sapogenins from tissue cultures of ***Agave wightii***. Jour. Nat. Prod. 43 (4): 459-462.

Shreve, F. and I. F. Wiggins,. 1964. Vegetation and Flora of the Sonoran Desert. 1ª ed. Ed. Stanford, Univ. Press. 2. pp. 1740.

Steel, R. G. D. y J. H. Torrie. 1985. Bioestadística: Principios y procedimientos. Traducido de la segunda ed. en inglés por R. Martínez B. Ed. McGraw-Hill. México, D. F. pp 622.

Texeira, Z. M. A., A. Azzini, S. A. L. Barros e D. Ciaramello. 1989. Sapogeninas esteroídicas em sisal. Bragantia, Campinas. 48 (1): 21-25.

Wetherell, D. F. 1992. In vitro propagation. Ed.Avery Publishing Group. New Yersey U.S.A. pp.77.

Ziv, M. and H. A. Halevy. 1983. Control of oxidative browning and in vitro propagation of ***Strelitzia reginae***. HortSci. 18 (4): 434-436.

APENDICE

Cuadro 1.- Composición de los medios de cultivo evaluados en la propagación *in vitro* de ***A. pacifica***.

Sales (mg/l)	Vía callo Gamborg-Miller y Ojima (B-5, 1968)	Vía callo Murashige & Skoog (MS,1962)	Brotes adventicios Murashige & Skoog Modificado (MS,1962)
Nitrato de amonio	-	1650	1440
Sulfato de amonio	134	-	-
Acido bórico	3	6.3	6.3
Cloruro de calcio	150	440	440
Cloruro de cobalto	0.025	0.025	0.025
Sulfato cúprico	0.025	0.025	0.025
Sulfato ferroso	27.8	27.8	27.8
Sulfato de magnesio	250	370	370
Sulfato de manganeso	10	16.9	16.9
Fosfato de sodio	150	-	-
Ioduro de potasio	0.75	0.83	0.83
Molibdato de sodio	0.25	0.25	0.25
Nitrato de potasio	2500	1900	1440
Fosfato de potasio	-	170	170
EDTA	37.3	37.3	37.3
Sulfato de zinc	2.0	8.6	8.6
Vitaminas y aminoácidos			
m-Inositol	100	100	100
Acido nicotínico	1	5	5
Tiamina-HCl	10	0.5	0.5
Piridoxina	1	0.5	0.5
Glicina	-	2	2
d-biotina	-	0.05	0.05
Acido fólico	-	0.5	0.5

Cuadro 2. Prueba de Kruskal-Wallis para evaluar el efecto de 2 medios de cultivo (Gamborg y MS), 3 niveles de 2,4-D, 3 niveles de BA y 2 tipos de explantes (raices y tallos de plántulas), sobre el número de días requeridos para la aparición de callo.

Tratamientos				Medias	Error Estándar	Rango promedio
Medio Explante	2,4-D		BA			
G	1.13	2.22	R	6.33	0.33	32.50
G	1.13	4.44	R	7.33	0.88	54.00
G	1.13	6.66	R	5.67	0.33	38.33
G	2.26	2.22	R	5.33	0.33	12.17
G	2.26	4.44	R	7.00	0.00	48.50
G	2.26	6.66	R	6.33	0.33	32.50
G	3.39	2.22	R	7.33	0.88	54.00
G	3.39	4.44	R	7.67	0.67	62.00
G	3.39	6.66	R	5.33	0.33	12.17
G	1.13	2.22	T	8.67	0.88	79.83
G	1.13	4.44	T	8.33	0.88	73.67
G	1.13	6.66	T	7.33	0.88	54.00
G	2.26	2.22	T	8.00	0.58	69.33
G	2.26	4.44	T	8.00	0.00	70.50
G	2.26	6.66	T	6.67	0.67	39.83
G	3.39	2.22	T	9.67	0.88	93.50
G	3.39	4.44	T	8.00	1.00	67.50
G	3.39	6.66	T	6.67	0.67	39.83
MS	1.13	2.22	R	8.00	0.00	70.50
MS	1.13	4.44	R	8.00	0.58	69.33
MS	1.13	6.66	R	7.33	0.33	55.83
MS	2.26	2.22	R	7.33	1.33	50.33
MS	2.26	4.44	R	6.67	0.33	40.50
MS	2.26	6.66	R	7.33	0.67	55.17
MS	3.39	2.22	R	5.00	0.00	6.00
MS	3.39	4.44	R	5.00	0.00	6.00
MS	3.39	6.66	R	7.33	0.67	55.17
MS	1.13	2.22	T	10.00	0.00	102.00
MS	1.13	4.44	T	10.00	0.00	102.00
MS	1.13	6.66	T	9.00	0.00	89.00
MS	2.26	2.22	T	8.33	0.88	73.67
MS	2.26	4.44	T	8.66	0.33	82.83
MS	2.26	6.66	T	7.66	0.88	61.33
MS	3.39	2.22	T	6.66	0.66	39.83
MS	3.39	4.44	T	6.33	0.33	32.50
MS	3.39	6.66	T	7.33	0.33	55.83

Estadística de Prueba = 71.5849 Nivel observado de significancia = 0.0002586

Cuadro 3.- Prueba de Tukey con un nivel de significancia de 5% para medir la influencia de los 2 medios de cultivo, sobre el número de días requeridos para la aparición de callo.

Medios de Cultivo	Repeticiones	Medias	Grupos homogéneos
Gamborg	54	7.2037	❶
Murashige & Skoog	54	7.5556	❶

Contraste	Diferencia (±)	DSH
Gamborg - MS	-0.3518	0.4060 **NS**

NS Denota que no existe diferencia estadísticamente significativa entre niveles.

Cuadro 4.- Prueba de Tukey con un nivel de significancia de 5% para medir la influencia de los 2 tipos de explante, sobre el número de días requeridos para la aparición de callo.

Explante	Repeticiones	Medias	Grupos homogéneos
Segmentos de Raíz	54	6.6852	❶
Segmentos de tallo	54	8.0741	❷

Contraste	Diferencia (±)	DSH
Raíz - Tallo	-1.3889	0.4060 ☒

❶, ❷ y ☒ Denotan diferencia estadísticamente significativa entre niveles.

Cuadro 5.- Prueba de Tukey con un nivel de significancia de 5% para medir la influencia de las 3 concentraciones de auxina (2,4-D), sobre el número de días requeridos para la aparición de callo.

Concentración de 2,4-D (μM)	Repeticiones	Medias	Grupos homogéneos
3.39	36	6.8611	❶
2.26	36	7.2778	❶
1.13	36	8.0000	❷

Contrastes	Diferencia (±)	DSH
1.13 - 2.26	0.7222	0.5971 ☒
1.13 - 3.39	1.1339	0.5971 ☒
2.26 - 3.39	0.4167	0.5971 **NS**

❶, ❷ y ☒ Denotan diferencia estadísticamente significativa entre niveles.

NS Denota que no existe diferencia estadísticamente significativa entre niveles.

Cuadro 6.- Prueba de Tukey con un nivel de significancia de 5% para medir la influencia de las 3 concentraciones de citocinina (BA), sobre el número de días requeridos para la aparición de callo.

Concentración de BA (μM)	Repeticiones	Medias	Grupos homogéneos
6.66	36	7.0000	❶
2.22	36	7.5556	❶
4.44	36	7.5833	❶

Contrastes	Diferencia (±)	DSH
2.22 - 4.44	-0.0278	0.5971 **NS**
2.22 - 6.66	0.5556	0.5971 **NS**
4.44 - 6.66	0.5833	0.5971 **NS**

NS Denota que no existe diferencia estadísticamente significativa entre niveles.

Cuadro 7.- Prueba de Tukey con un nivel de significancia de 5% para medir la influencia de las 3 concentraciones de auxina (2,4-D), sobre el número de días requeridos para la aparición de callo en tejido de raíz.

Concentración de 2,4-D (μM)	Repeticiones	Medias	Grupos homogéneos
3.39	18	6.2778	❶
2.26	18	6.6667	❶❷
1.13	18	7.1111	❷

Contrastes	Diferencia (±)	DSH
1.13 - 2.26	0.4444	0.79968 **NS**
1.13 - 3.39	0.8333	0.79968 ☒
2.26 - 3.39	0.3889	0.79968 **NS**

❶, ❷ y ☒ Denotan diferencia estadísticamente significativa entre niveles.

NS Denota que no existe diferencia estadísticamente significativa entre niveles.

Cuadro 8.- Prueba de Tukey con un nivel de significancia de 5% para medir la influencia de las 3 concentraciones de auxina (2,4-D), sobre el número de días requeridos para la aparición de callo en tejido de tallo.

Concentración de 2,4-D (μM)	Repeticiones	Medias	Grupos homogéneos
3.39	18	7.1111	❶
2.26	18	7.8889	❶
1.13	18	8.8889	❷

Contrastes	Diferencia (±)	DSH
1.13 - 2.26	1.0000	0.9905 ☒
1.13 - 3.39	1.7778	0.9905 ☒
2.22 - 3.39	0.7778	0.9905 **NS**

❶, ❷ y ☒ Denotan diferencia estadísticamente significativa entre niveles.

NS Denota que no existe diferencia estadísticamente significativa entre niveles.

Cuadro 9.- Prueba de Kruskal-Wallis para evaluar el efecto de 2 medios de cultivo (Gamborg y MS), 3 niveles de 2,4-D, 3 niveles de BA y 2 tipos de explantes (raices y tallos de plántulas), sobre la biomasa de callo producida en 5 semanas de subcultivo.

Tratamientos				Media	Error estándar	Rangos promedio
Medio	2,4-D	BA	Explante			
G	1.13	2.22	R	2.33	1.33	22.50
G	1.13	4.44	R	5.00	0.58	63.83
G	1.13	6.66	R	4.33	0.88	48.83
G	2.26	2.22	R	5.33	0.33	72.50
G	2.26	4.44	R	3.67	0.88	35.50
G	2.26	6.66	R	5.67	0.33	82.50
G	3.39	2.22	R	4.00	1.15	45.50
G	3.39	4.44	R	4.67	0.88	57.50
G	3.39	6.66	R	5.00	1.00	67.50
G	1.13	2.22	T	2.67	0.88	18.83
G	1.13	4.44	T	4.33	0.33	45.17
G	1.13	6.66	T	3.00	1.00	25.17
G	2.26	2.22	T	6.00	0.00	92.50
G	2.26	4.44	T	4.00	0.58	38.83
G	2.26	6.66	T	5.67	0.33	82.50
G	3.39	2.22	T	4.67	0.33	53.83
G	3.39	4.44	T	5.00	1.00	67.50
G	3.39	6.66	T	5.67	0.33	82.50
MS	1.13	2.22	R	4.67	0.33	53.83
MS	1.13	4.44	R	5.00	0.00	62.50
MS	1.13	6.66	R	3.00	0.00	17.50
MS	2.26	2.22	R	4.67	0.33	53.83
MS	2.26	4.44	R	5.33	0.33	53.83
MS	2.26	6.66	R	5.67	0.67	73.83
MS	3.39	2.22	R	4.33	0.33	82.50
MS	3.39	4.44	R	4.33	0.33	45.17
MS	3.39	6.66	R	4.33	0.88	48.83
MS	1.13	2.22	T	3.00	0.33	45.17
MS	1.13	4.44	T	3.67	1.00	25.83
MS	1.13	6.66	T	3.33	0.33	30.17
MS	2.26	2.22	T	3.00	0.33	23.83
MS	2.26	4.44	T	4.33	0.58	20.50
MS	2.26	6.66	T	5.67	1.20	54.17
MS	3.39	2.22	T	5.67	0.33	82.50
MS	3.39	4.44	T	6.00	0.00	92.50
MS	3.39	6.66	T	6.00	0.00	92.50

Estadística de Prueba = 59.9733 Nivel Observado de Significancia = 0.0053778

Cuadro 10.- Prueba de Tukey con un nivel de significancia de 5% para medir la influencia de los 2 medios de cultivo, sobre la biomasa de callo producida en 5 semanas de subcultivo.

Medios de Cultivo	Repeticiones	Medias	Grupos homogéneos
Gamborg	54	4.5000	❶
Murashige & Skoog	54	4.5000	❶

Contraste	Diferencia (±)	DSH
Gamborg - MS	0.0000	0.4367 **NS**

NS Denota que no existe diferencia estadísticamente significativa entre niveles.

Cuadro 11.- Prueba de Tukey con un nivel de significancia de 5% para medir la influencia de los 2 tipos de explante, sobre la biomasa de callo producida en 5 semanas de subcultivo.

Explante	Repeticiones	Medias	Grupos homogéneos
Segmentos de Raíz	54	4.4630	❶
Segmentos de tallo	54	4.5370	❶

Contraste	Diferencia (±)	DSH
Raíz - Tallo	0.0740	0.4060 **NS**

NS Denota que no existe diferencia estadísticamente significativa entre niveles.

Cuadro 12.- Prueba de Tukey con un nivel de significancia de 5% para medir la influencia de las 3 concentraciones de auxina (2,4-D), sobre la biomasa de callo producida en 5 semanas de subcultivo.

Concentración de 2,4-D (μM)	Repeticiones	Medias	Grupos homogéneos
1.13	36	3.7778	❶
2.26	36	4.6388	❷
3.39	36	5.0833	❷

Contrastes	Diferencia (±)	DSH
1.13 - 2.26	-0.8611	0.6423 ☒
1.13 - 3.39	-1.3056	0.6423 ☒
2.26 - 3.39	-0.4444	0.6423 **NS**

❶, ❷ y ☒ Denotan diferencia estadísticamente significativa entre niveles.

NS Denota que no existe diferencia estadísticamente significativa entre niveles.

R.S. T. 2,126

Cuadro 13.- Prueba de Tukey con un nivel de significancia de 5% para medir la influencia de las 3 concentraciones de citocinina (BA), sobre la biomasa de callo producida en 5 semanas de subcultivo.

Concentración de BA (μM)	Repeticiones	Medias	Grupos homogéneos
6.66	36	4.3889	❶
2.22	36	4.4444	❶
4.44	36	4.6667	❶

Contrastes	Diferencia (±)	DSH
2.22 - 4.44	0.0556	0.6423 **NS**
2.22 - 6.66	-0.2222	0.6423 **NS**
4.44 - 6.66	-0.2778	0.6423 **NS**

NS Denota que no existe diferencia estadísticamente significativa entre niveles.

Cuadro 14.- Características de calidad observadas en los callos obtenidos en los diferentes tratamientos.

Tratamientos				Color y apariencia	Tendencia la Oxidación	Organogénesis
Medio	2,4-D	BA	Explante			
G	1.13	2.22	R	Pardo, friable	+++	-
G	1.13	4.44	R	Verde claro, blando	+++	-
G	1.13	6.66	R	Verde claro, friable	++	++
G	2.26	2.22	R	Pardo, friable	+++	-
G	2.26	4.44	R	Pardo, friable	+++	-
G	2.26	6.66	R	Verde claro, friable	+++	-
G	3.39	2.22	R	Pardo, friable	+++	-
G	3.39	4.44	R	Pardo, friable	+++	-
G	3.39	6.66	R	Verde claro, friable	++	-
G	1.13	2.22	T	Verde claro, friable	++	+
G	1.13	4.44	T	Verde claro, blando	+	+
G	1.13	6.66	T	Verde claro, blando	+	++
G	2.26	2.22	T	Verde intenso, blando	+++	+++
G	2.26	4.44	T	Verde claro, blando	+++	+++
G	2.26	6.66	T	Verde claro, blando	+++	+++
G	3.39	2.22	T	Verde intenso, blando	+	+
G	3.39	4.44	T	Verde intenso, duro	-	+
G	3.39	6.66	T	Verde intenso, duro	-	++
MS	1.13	2.22	R	Verde claro, blando	++	-
MS	1.13	4.44	R	Verde claro, friable	++	-
MS	1.13	6.66	R	Verde intenso, blando	+	++
MS	2.26	2.22	R	Verde claro, blando	++	+
MS	2.26	4.44	R	Verde intenso, friable	++	+
MS	2.26	6.66	R	Verde claro, blando	++	+
MS	3.39	2.22	R	Verde intenso, duro	++	+++
MS	3.39	4.44	R	Verde intenso, duro	++	+++
MS	3.39	6.66	R	Verde intenso, duro	+	+++
MS	1.13	2.22	T	Verde claro, blando	+++	+++
MS	1.13	4.44	T	Verde intenso, blando	+	++
MS	1.13	6.66	T	Verde intenso, blando	+	++
MS	2.26	2.22	T	Verde intenso, blando	+	+++
MS	2.26	4.44	T	Verde intenso, duro	+	+++
MS	2.26	6.66	T	Verde claro, blando	+++	+++
MS	3.39	2.22	T	Verde intenso, duro	+	++
MS	3.39	4.44	T	Verde intenso, duro	++	+++
MS	3.39	6.66	T	Verde intenso, duro	++	+++

Cuadro 15.- Prueba de Kruskal-Wallis para evaluar el efecto de 2 medios de cultivo (Gamborg y MS), 3 niveles de 2,4-D, 3 niveles de BA y 2 tipos de explantes (raices y tallos de plántulas), sobre el número de brotes regenerados a partir de callo, a los 5 meses de subcultivo.

Tratamientos				Media	Error estándar	Rangos promedio
Medio	2,4-D	BA	Explante			
G	1.13	2.22	R	0.00	0.00	27.50
G	1.13	4.44	R	3.00	0.58	69.67
G	1.13	6.66	R	0.00	0.00	27.50
G	2.26	2.22	R	0.00	0.00	27.50
G	2.26	4.44	R	0.00	0.00	27.50
G	2.26	6.66	R	0.00	0.00	27.50
G	3.39	2.22	R	0.00	0.00	27.50
G	3.39	4.44	R	0.00	0.00	27.50
G	3.39	6.66	R	0.00	0.00	27.50
G	1.13	2.22	T	5.33	0.33	86.67
G	1.13	4.44	T	6.33	0.33	92.67
G	1.13	6.66	T	10.00	0.58	103.67
G	2.26	2.22	T	4.00	0.58	77.33
G	2.26	4.44	T	0.00	0.00	27.50
G	2.26	6.66	T	0.00	0.00	27.50
G	3.39	2.22	T	2.00	0.58	62.50
G	3.39	4.44	T	1.00	0.58	48.50
G	3.39	6.66	T	3.00	0.58	69.67
MS	1.13	2.22	R	0.00	0.00	27.50
MS	1.13	4.44	R	0.00	0.00	27.50
MS	1.13	6.66	R	6.00	1.15	89.00
MS	2.26	2.22	R	2.00	1.00	63.67
MS	2.26	4.44	R	0.00	0.00	27.50
MS	2.26	6.66	R	0.00	0.00	27.50
MS	3.39	2.22	R	0.00	0.00	27.50
MS	3.39	4.44	R	0.00	0.00	27.50
MS	3.39	6.66	R	0.00	0.00	27.50
MS	1.13	2.22	T	7.33	0.88	95.83
MS	1.13	4.44	T	12.33	0.67	106.83
MS	1.13	6.66	T	8.67	0.88	100.00
MS	2.26	2.22	T	4.00	0.58	77.33
MS	2.26	4.44	T	2.33	1.45	57.83
MS	2.26	6.66	T	7.00	1.00	94.17
MS	3.39	2.22	T	2.00	1.00	55.50
MS	3.39	4.44	T	3.33	0.33	72.33
MS	3.39	6.66	T	3.33	0.88	71.83

Estadística de Prueba = 101.037 Nivel Observado de Significancia = 2.514×10^{-8}

Cuadro 16.- Prueba de Tukey con un nivel de significancia de 5% para medir la influencia de los 2 medios de cultivo, sobre el número de brotes regenerados a partir de tejido de callo.

Medios de Cultivo	Repeticiones	Medias	Grupos homogéneos
Gamborg	54	1.9260	❶
Murashige & Skoog	54	3.2407	❷

Contraste	Diferencia (±)	DSH
Gamborg - MS	-1.3148	0.3818 ☒

❶, ❷ y ☒ Denotan diferencia estadísticamente significativa entre niveles.

Cuadro 17.- Prueba de Tukey con un nivel de significancia de 5% para medir la influencia de los 2 explantes, sobre el número de brotes regenerados a partir de tejido de callo.

Explante	Repeticiones	Medias	Grupos homogéneos
Segmentos de Raíz	54	0.6111	❶
Segmentos de Tallo	54	4.5556	❷

Contraste	Diferencia (±)	DSH
Raíz - Tallo	-3.9444	0.3818 ☒

❶, ❷ y ☒ Denotan diferencia estadísticamente significativa entre niveles.

Cuadro 18.- Prueba de Tukey con un nivel de significancia de 5% para medir la influencia de las 3 concentraciones de 2,4-D, sobre el número de brotes regenerados a partir de tejido de callo.

Concentración de 2,4-D (μM)	Repeticiones	Medias	Grupos homogéneos
3.39	36	1.2222	❶
2.26	36	1.6111	❶
1.13	36	4.9167	❷

Contrastes	Diferencia (±)	DSH
1.13 - 2.26	3.3056	0.5615 **NS**
1.13 - 3.39	3.6944	0.5615 ☒
2.26 - 3.39	0.3889	0.5615 ☒

❶, ❷ y ☒ Denotan diferencia estadísticamente significativa entre niveles.

NS Denota que no existe diferencia estadísticamente significativa entre niveles.

Cuadro 19.- Prueba de Tukey con un nivel de significancia de 5% para medir la influencia de las 3 concentraciones de BA, sobre el número de brotes regenerados a partir de tejido de callo.

Concentración de BA (μM)	Repeticiones	Medias	Grupos homogéneos
2.22	36	2.2222	❶
4.44	36	2.3611	❶
6.66	36	3.1667	❷

Contrastes	Diferencia (±)	DSH
2.22 - 4.44	-0.1389	0.5615 ☒
2.22 - 6.66	-0.9444	0.5615 ☒
4.44 - 6.66	-0.8056	0.5615 **NS**

❶, ❷ y ☒ Denotan diferencia estadísticamente significativa entre niveles.

NS Denota que no existe diferencia estadísticamente significativa entre niveles.