

**UNIVERSIDAD DE SONORA**  
**DEPARTAMENTO DE AGRICULTURA Y GANADERIA**

**“ORGANOGÉNESIS INDIRECTA DE *Agave parviflora* Torr., UNA  
ESPECIE EN PELIGRO Y CON ALTO POTENCIAL  
ECONÓMICO”**

**T E S I S**

**JOSÉ MARÍA ANAYA DYCK**

**JULIO DEL 2011**

# 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

**UNIVERSIDAD DE SONORA**  
**DEPARTAMENTO DE AGRICULTURA Y GANADERIA**

**“ORGANOGÉNESIS INDIRECTA DE *Agave parviflora* Torr., UNA  
ESPECIE EN PELIGRO Y CON ALTO POTENCIAL  
ECONÓMICO”**

**T E S I S**

**JOSÉ MARÍA ANAYA DYCK**

**JULIO DEL 2011**

“ORGANOGÉNESIS INDIRECTA DE *Agave parviflora* Torr., UNA ESPECIE EN PELIGRO Y CON ALTO POTENCIAL ECONÓMICO”

**TESIS**

Sometida a la consideración del  
Departamento de Agricultura y Ganadería

de la

Universidad de Sonora

Por

José María Anaya Dyck

Como requisito parcial para obtener  
el título de ingeniero agrónomo

Julio del 2011.

Esta tesis fue realizada bajo la Dirección del Consejo Particular, aprobada y aceptada como requisito parcial para la obtención del grado de:

## INGENIERO AGRÓNOMO

### CONSEJO PARTICULAR:

DIRECTOR:




DR. SERGIO FRANCISCO MORENO SALAZAR

ASESOR:



DR. ANDRÉS OCHOA MEZA

ASESOR:



M.C. DAMIÁN MARTÍNEZ HEREDIA

ASESOR:

*Ma. Eugenia Rentería Mtz.*

M. C. MARÍA EUGENIA RENTERÍA MARTÍNEZ

## **DEDICATORIA**

Le dedico esta tesis a todos los que creyeron en mí, a toda la gente que me apoyó, a mis amigos y familiares y a esta Institución que me ha formado, pero en especial se la dedico a mi abuela que nunca dejó de preocuparse por mí. Gracias por haberme amado, gracias por haberme educado, y también por haberme retado. Sé que ya te has ido, pero yo te llevo en lo más profundo de mi corazón para mí nunca fuiste una simple abuela, fuiste toda una madre.

## **AGRADECIMIENTOS**

Hago extensivo mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que de una u otra forma, colaboraron en la realización de esta investigación.

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

Al Dr. Sergio Francisco Moreno Salazar por su asesoría y dirección en el trabajo de investigación

Al Dr. Andrés Ochoa Meza por su colaboración en la elaboración de este escrito.

## TABLA DE CONTENIDO

	<b>Pág.</b>
<b>ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS</b>	<i>vi</i>
<b>RESUMEN</b>	<i>vii</i>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>OBJETIVOS</b>	4
<b>LITERATURA REVISADA</b>	5
El Genero Agave y Sus Características	5
Clasificación taxonómica	5
Descripción Botánica	8
Reproducción	9
Metabolismo y adaptación a los ambientes áridos	10
Generalidades históricas del Agave	11
Usos e importancia económica de las plantas de Agave	12
Fuente de Fibras	13
Construcción	13
Doméstico	14
Alimentación	14
Ornato	14
Forraje	15
Usos Medicinales	16
Fuente de Bebidas Alcohólicas	16
Agave parviflora	17
Aspectos generales sobre el cultivo de tejidos in vitro	19
Etapas de la Micropropagación	20
Tipos de explantes utilizados	22
Esterilización de los explantes	23
Factores que afectan el crecimiento y desarrollo de plantas in vitro	24
Constitución genética de las planta	24
Composición de los medios de cultivo	24
Factores Físicos	26
Reguladores de Crecimiento	27



Auxinas	28
Efectos fisiológicos de las auxinas	29
Mecanismos de acción	30
Citoquininas o citocininas	30
Giberelinas	32
Efectos fisiológicos de las giberelinas	32
Ácido abscísico	32
Efectos fisiológicos del ABA	33
Técnicas de Micropropagación	33
Multiplicación de nudos simples	33
Multiplicación mediante rebrotes axilares y apicales	34
Cultivos de meristemos	36
Multiplicación de brotes adventicios	36
Multiplicación a través de tejido de callo	38
<b>MATERIALES Y METODOS</b>	40
Material vegetal utilizado	40
Métodos de multiplicación en estudio	40
Sembrado y crecimiento	42
Variables Respuesta	42
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	44
<b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b>	49
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	50

## ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

	Pag.
Cuadro 1 Compendio de especies de Agave	7
Cuadro 2 Tratamientos usados para organogénesis en Agave Parviflora	41
Cuadro 3 Modificación al ensayo de organogénesis en Agave Parviflora	41
Cuadro 4 Reguladores de crecimiento, producción de biomasa de callo y sus características en Agave parviflora	45
Cuadro 5 Reguladores de crecimiento y organogénesis de Agave parviflora	46
Figura 1 Los dos tipos de estructuras florales en el género Agave. A) Inflorescencia espiculada, B) inflorescencia paniculada	6
Figura 2 Estructura Química de auxinas naturales	28
Figura 3 Estructura química de auxinas sintéticas	29
Figura 4 Estructura química de la kinetina	31
Figura 5 Estructura química del ácido giberelico	32
Figura 6 A) Proceso de sembrado en cámara de flujo laminar. B) Trasplante de masa de callo a un nuevo medio de cultivo. C) Cámara de crecimiento utilizada. D) Cámara de crecimiento vista por dentro	42
Figura 7 A) Masa de callo en proceso de multiplicación, B) Callo nodular con tejido embriogénico y brotes. C) Embriones somáticos globulares. D) Tejido de callo con 2 hojas bien diferenciadas. E) Tejido de callo altamente embriogénico, y con varias estructuras diferenciadas F) Tejido de callo con estructuras bien diferenciadas. G) Plantas jóvenes obtenidas, en proceso de aclimatación	47

## RESUMEN

*Agave parviflora* es una planta endémica del desierto de Sonora y actualmente se encuentra bajo status de protección especial debido a lo limitado de sus poblaciones naturales. En este trabajo se desarrolló una metodología para la propagación masiva de dicha especie, con la que se estará en posibilidades de obtener plantas para futuros programas de repoblación y cultivo intensivo. La técnica empleada fue la multiplicación a través de tejido de callo. Inicialmente se trabajó con la proliferación de tejido de callo y posteriormente con la organogénesis en dicho callo.

Para la formación del callo, se utilizó un diseño completamente al azar en arreglo factorial  $3^3$ , evaluándose 3 niveles de benciladenina, 3 niveles de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y tres tipos de explantes que fueron segmentos de raíces, tallos y hojas, todos de plántulas provenientes de semilla. Se utilizó el medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS). En base a los resultados obtenidos se pudo concluir que a mayor concentración de reguladores de crecimiento hubo mayor producción de biomasa, callos mejor formados y de color verde intenso. De los tres tipos de explantes utilizados los mejores resultados se observaron en el tejido de tallo. El tratamiento más efectivo fue el de  $11.1 \mu\text{M}$  de benciladenina y  $5.61 \mu\text{M}$  de ácido 2,4-diclorofenoxiacético.

En lo que respecta a la diferenciación y formación de brotes, se empleó un diseño  $3 \times 3 \times 2$ , evaluando el efecto de 3 concentraciones de benciladenina, 3 de cinetina y 2 de ácido 2,4-diclorofenoxiacético. Se observó mayor cantidad de embriones e índice de brotación con  $22.2 \mu\text{M}$  de BA y  $1.13 \mu\text{M}$  de 2,4-D. Los brotes generados se enraizaron en medio MS libre de reguladores de crecimiento y las plántulas se aclimataron en charolas con peat moss, dentro de una cámara de crecimiento con luz continua y fotoperiodo de 12 h. La supervivencia de las plantas enraizadas fue cercana a 100%.

## INTRODUCCIÓN

De las múltiples plantas de México que benefician al ser humano, el maguey ha sido una de las más aprovechadas, tanto por los antiguos mesoamericanos como por los actuales habitantes del altiplano central. Pocos son los vegetales que proporcionan al hombre casa, vestido, sustento y salud, además de ser un medio para la transmisión de conocimientos. No obstante que el maguey no es solo de México, en ningún otro lugar del mundo esta tan identificado con la cultura, el paisaje y el pueblo como en nuestro país.

Diversos estudiosos coinciden en que México es el centro de origen y dispersión de la familia *Agavaceae*, a la que pertenecen ocho géneros, entre ellos el género *Agave*. De las 273 especies descritas de esta familia, las cuales se distribuyen en el continente americano desde Dakota del Norte, EUA, hasta Bolivia y Paraguay, 205 se encuentran en México y de ellas 151 son endémicas.

*Agave parviflora* Torr., es una especie endémica a nuestra región. Esta especie se encuentra en estatus de protección especial, debido a que a principios del siglo pasado, se explotaba de manera indiscriminada en la elaboración del que se supone era uno de los destilados más finos de agave, la tahuta, tahutita ó sóbari en dialecto ópata.

Testimonios de antiguos vinateros han revelado que la tahuta era una bebida de calidad superior a cualquier otro destilado de agave. Incluso se ha mencionado que algunos productores agregaban una cierta cantidad de *Agave parviflora* a un lote de cabezas de *Agave angustifolia* (maguey de bacanora) a fin de mejorar las propiedades organolépticas del bacanora, la bebida tradicional por excelencia en Sonora.

Aunque el hábitat de *A. parviflora* abarca todo el Desierto de Sonora, en diversos recorridos de campo realizados por Moreno-Salazar y Ochoa-Meza (Com. Pers.), se han

detectado solo pequeñas poblaciones aisladas, de unos cuantas decenas de individuos, en Moctezuma, Ures, Mazatán y Nácori Chico. Esto se debe a uso indiscriminado que anteriormente se le daba para la elaboración de bebidas, al sobrepastoreo de agostaderos y al deterioro de su hábitat por el desmonte de terrenos para caminos y establecimiento de pastizales. Adicionalmente, esta especie es la más pequeña del género *Agave* y por sus características peculiares, ha resultado ser muy atractiva para los coleccionistas, lo que ha motivado su extracción inmoderada a partir de su hábitat natural. Todos estos factores, han reducido drásticamente sus poblaciones (Moreno-Salazar, com. pers.).

Por otro lado, la deprimida economía de las zonas serranas del Estado de Sonora, hace imperante el desarrollo de nuevos productos de calidad y alto valor comercial, que sean reconocidos por el mercado nacional e internacional. Unos de estos productos podrían ser tanto el *Agave parviflora*, como la bebida que se obtiene de él. Por lo tanto es importante desarrollar su tecnología de cultivo, para lo cual es requisito indispensable el implementar las técnicas de propagación que permitan una rápida reproducción de plantas. Una alternativa viable para generar cientos de miles de plantas en tiempos relativamente cortos, es el cultivo de tejido *in vitro* (Zimmerman, 1993).

Los métodos de cultivo de tejidos *in vitro* más 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, mediante una concentración adecuada de reguladores de crecimiento, su proliferación y posterior subcultivo de brotes *in vitro*. Estas metodologías permiten la obtención de plantas genéticamente similares a una velocidad de producción considerablemente superior a cualquiera de los métodos tradicionales. Además, son extensiones de los métodos convencionales de propagación clonal, pero llevadas a cabo a escala miniatura, bajo condiciones asépticas, razón por la cual a este tipo de propagación clonal, se le conoce como micropropagación.

También se han desarrollado técnicas como la organogénesis directa a partir de células somáticas no apicales del explante y la embriogénesis/organogénesis indirecta

pasando por tejido de callo. La organogénesis indirecta, implica la producción masiva de plántulas a partir de embriones u órganos inducidos en 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 si 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 diferente grado entre las distintas especies. El cultivo de callo con la consecuente organogénesis o embriogénesis somática es una herramienta valiosa para la obtención de variación somaclonal en diferentes especies.

En base a lo anterior, este trabajo tiene como finalidad establecer una metodología para la propagación masiva de la planta de *Agave parviflora*, mediante las técnicas de cultivo de tejidos, con el fin de obtener germoplasma para su posterior manipulación genética, cultivo intensivo y explotación industrial, así como para repoblación en su hábitat natural.

## OBJETIVOS

### GENERAL:

Establecer una metodología para la propagación masiva de la planta de *Agave parviflora*, mediante la proliferación de tejido de callo y posterior organogénesis.

### PARTICULARES:

Evaluar el efecto de benciladenina (BA) y ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y tres tipos diferentes de explantes (raíz, tallo y hoja) sobre la inducción a la formación y producción de biomasa de callo.

Evaluar el efecto de los reguladores de crecimiento (BA, cinetina y 2,4-D) sobre la formación de callo y la posterior formación de brotes a partir de tejido de callo.

Enraizar y aclimatar las plantas obtenidas, a las condiciones ambientales de la región.

## LITERATURA REVISADA

### El Genero Agave y Sus Características

#### Clasificación taxonómica

REINO	• Plantae
DIVISION	• Magnoliophyta
CLASE	• Liliopsida
SUBCLASE	• Liliidae
ORDEN	• Asparagales
FAMILIA	• Agavaceae
GENERO	• <i>Agave</i>

El género *Agave* está compuesto por plantas suculentas pertenecientes a una extensa familia botánica del mismo nombre *Agavaceae* (Robert, *et al.*, 1992). Se les conoce con los nombres comunes de agave, pita, maguey, cabuya, fique y mezcal.

Su centro de origen está en México, aunque actualmente se distribuyen desde el sur de Estados Unidos hasta el norte de Venezuela y Colombia. 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). No existe ningún trabajo de clasificación que abarque todas las especies del género *Agave*. El sistema de clasificación más reciente, a nivel infragenérico, fue elaborado por Howard Gentry en 1982; sin embargo, su obra sólo incluye los agaves de Norteamérica continental, dejando fuera las especies del Caribe y Sudamérica.



Gentry organizó el género por sus características florales y vegetativas, dividiéndolo en dos subgéneros, con base en el tipo de inflorescencia y la disposición de las flores (Figura 1). El subgénero *Agave* está dividido en doce grupos con 83 especies, y el subgénero *Littaea* en ocho grupos con 53 especies, como se muestra en el cuadro 1. El grupo no es una categoría taxonómica de acuerdo con el Código de Nomenclatura Botánica, sin embargo su uso le permitió agrupar especies de una manera práctica.



Figura 1.-Los dos tipos de estructuras florales en el género *Agave*. A) Inflorescencia espiculada, B) inflorescencia paniculada.

Actualmente, la taxonomía de *Agave* dista de estar completa. Ha habido propuestas de cambios en la nomenclatura y en la estructura de varios taxones, se siguen describiendo nuevas especies que han hecho crecer los grupos, pero no se ha avanzado en la delimitación de los mismos. Las nuevas propuestas de subdivisión tendrán que considerar todas las especies del género para formarse una idea adecuada de sus límites. Esto contribuye favorablemente a una mejor exploración del territorio nacional, lo cual ha redundado en un conocimiento biológico más detallado, mejores colecciones de

plantas vivas y de herbario, que es la base de estudios taxonómicos, biogeográficos, etnobotánicos, bioquímicos y moleculares.

La biología molecular es una herramienta que permite visualizar de otra manera la clasificación de los organismos y, en el caso de *Agave*, se han iniciado estudios que permitirán tener una mejor comprensión, no sólo a nivel subgenérico, sino también intergenérico, ya que su delimitación con respecto a los géneros herbáceos cercanos, como *Manfreda* y *Polianthes* aún no ha sido resuelta. Todo esto nos permite seguir adentrándonos en el conocimiento de estas plantas emblemáticas de nuestro país.

Cuadro 1.-Compendio de especies de *Agave*

Subgénero	Grupo o Sección	Número de especies	Ejemplos	
Littaea	Amolae	8	<i>A. attenuata</i> Salam., <i>A. pedunculifera</i> Trel., <i>A. vilmoriniana</i> Berger	
	Choritepalae	3	<i>A. ellemeetiana</i> Jacobi	
	Filiferae	8	<i>A. filifera</i> Salam., <i>A. multifilifera</i> Gentry	
	Marginatae	21	<i>A. lechuguilla</i> Torr., <i>A. xylonacantha</i> Salam.	
	Parviflorae	4	<i>A. parviflora</i> Torr. Subsp. <i>parviflora</i> . <i>A. schottii</i> Engelm., <i>A. toumeyana</i> Trel.	
	Polycephalae	5	<i>A. celsii</i> Hook	
	Striatae	3	<i>A. dasylirioides</i> Jacobi & Bouché, <i>A. stricta</i> Zucc.	
	Urceolatae	2	<i>A. utahensis</i> var. <i>Nevadensis</i> Engelm.	
	Agave	Americanae	6	<i>A. americana</i> L., <i>A. lurida</i> Aiton, <i>A. scabra</i> Salm-Dyck
		Campaniflorae	3	<i>A. promontorii</i> Trel.
Crenatae		6	<i>A. bovicornuta</i> Gentry	
Deserticolae		10	<i>A. cerulata</i> Trel., <i>A. deserti</i> Engelm., <i>A. sobria</i> Brandeg.	
Ditepalae		10	<i>A. murpheyi</i> F. Gibson, <i>A. palmeri</i> Engelm.	
Hiemiflorae		12	<i>A. atrovirens</i> Karw. Ex Salm, <i>A. lagunae</i> Trel.	
Marmoratae		4	<i>A. zebra</i> Gentry	
Parryanae		6	<i>A. parryi</i> Engelm., <i>A. parry</i> var. <i>huachucensis</i> (Baker) Little ex Benson, <i>A. patonii</i> Trel.	
Rigidae		12	<i>A. angustifolia</i> Haw., <i>A. fourcroydes</i> Lem., <i>A. macroacantha</i> Zucc., <i>A. rhodacantha</i> Trel., <i>A. Tequilana</i> Weber	
Salmianeae		5	<i>A. salmiana</i> Otto ex Salm ssp. <i>Crassispina</i> (Trel.) Gentry	
Sisalaneae	6	<i>A. sisalana</i> Perrine, <i>A. weberi</i> Cels ex Poisson		
Umbelliflorae	2	<i>A. shawii</i> Engelm.		

(Gentry 1982, Nobel 1988).

### Descripción Botánica

Las plantas de agave tienen un tallo corto, grueso y leñoso, oculto tras sus numerosas hojas gruesas y carnosas llamadas pencas que a menudo viven alrededor de 5 años. Estas están colocadas en forma de espiral formando una roseta basal. En varias especies el tallo se dobla hacia el sustrato y reptar sobre el suelo o las rocas, por lo que es difícil observarlo, ya que pueden surgir rosetas a lo largo y además, quedar cubiertos por las hojas secas.

Las hojas por lo general son suculentas, fibrosas, con la base dilatada y carnosa y su forma varía de lineal a lanceolada u ovada, casi siempre tiene una espina al final del ápice que puede medir desde algunos milímetros hasta cinco centímetros. El envés muestra la huella de los dientes de la hoja que le antecedió, lo que es muy notorio en las especies con hojas suculentas. El color de las mismas se presenta en tonos de verde y glauco o amarillos, rojizos o violetas.

Las hojas subsecuentes son producidas alrededor del eje de la roseta a ángulos promedio de  $137.5^\circ$ , el llamado *ángulo de Fibonacci*, el cual vamos a considerar brevemente. Cerca del inicio del siglo XVII, Fibonacci, también llamado Leonardo de Pisa, descubrió una secuencia de números formados al añadir los dos números previos en la serie: 1, 1, 2, 3, 5, 8, 13, 21, 34, ... Esta secuencia tiene relevancia con muchos patrones naturales así como con los ángulos de las hojas de agave. En particular si son elegidos pares de números apartados por 2 espacios en la secuencia en progresión, las siguientes fracciones pueden ser formadas:  $2/5$ ,  $3/8$ ,  $5/13$ ,  $8/21$ ,  $13/34$ , ... Cada fracción describe la filotaxia, o el arreglo de las hojas a lo largo del tallo. Por ejemplo, una filotaxia de  $3/8$  significa que una espiral de ocho hojas se va a encontrar en tres vueltas completas alrededor del tallo. La secuencia de fracciones rápidamente converge en el valor de 0.382, que multiplicado por  $360^\circ$  resulta en  $137.5^\circ$ , el *ángulo de Fibonacci*. El arreglo de hojas resultante tiende a minimizar el auto sombreado por las hojas (Nobel, 1988).

El crecimiento en *Agave* es muy lento, la mayoría de las especies son multianuales con un ciclo de vida entre 5 y 20 años. Mientras crecen acumulan una gran

cantidad de azúcar (principalmente en forma del polisacárido llamado inulina) en el "tejido de corazón" de la planta. Estos carbohidratos son el suministro de energía que alimenta el rápido desarrollo de la inflorescencia, que a menudo es enorme en comparación con la planta que lo produce. Los agaves florecen sólo una vez emitiendo un largo tallo (ramificado o no) que nace del centro de la roseta, con numerosos grupos de flores tubulares. Las inflorescencias de los agaves miden entre 2 y 10 metros de altura. Estas pueden crecer bastante rápido, incrementos diarios de entre 10 y 20 cm son comunes en algunas especies. (Nobel, 1988). La planta muere tras desarrollar el fruto pero por lo general produce retoños en su base a través de rizomas. Los rizomas son comúnmente carnosos y gruesos, pero las raíces tienden a ser numerosas, delgadas, fibrosas y superficiales.

### **Reproducción**

Los agaves se reproducen de manera sexual y asexual. La reproducción sexual se logra mediante la polinización que efectúan algunos animales. Los agaves con inflorescencias paniculadas (subgénero *Agave*) son polinizadas por los murciélagos, mientras que los agaves con inflorescencias espigadas (subgénero *Littaea*) son polinizadas principalmente por insectos, lo que hace que la transferencia de polen de una flor a otra sea nocturna en los magueyes polinizados por murciélagos y diurna en los magueyes polinizados por insectos o aves.

En la mayoría de las especies de agave el sistema de reproducción es de tipo semélparo o monocárpico, es decir, las plantas mueren después de reproducirse; la semelparidad es una forma de reproducción poco común en las plantas con flores y pudo haber evolucionado debido a la altura de la inflorescencia, ya que las flores a mayor altura son más atractivas para los polinizadores; subsecuentemente, al incrementar las plantas progresivamente su esfuerzo reproductivo, los recursos asignados al despliegue floral alcanzaron un máximo, causando la muerte de la planta. Otras especies pueden ser consideradas iteróparas o policárpicas, pues sólo muere la roseta que tiene la inflorescencia pero no el individuo.

La mayoría de los agaves se propaga de manera asexual, produciendo clones en diferentes partes de la roseta o la inflorescencia. Los hijuelos se desarrollan en la base de la planta, o mediante estolones que emergen a alguna distancia de la planta madre, producen raíces y, con el tiempo, crecen de manera independiente. Los hijuelos intrafoliares se originan entre las hojas de la roseta y se desarrollan cuando se desprenden de la planta madre o ésta muere. Los bulbilos, en cambio, se originan en la inflorescencia junto a las flores. La producción de clones es un mecanismo que permite a las plantas una mayor capacidad de ampliar su área de distribución. El establecimiento de las plántulas provenientes de semilla es un fenómeno raro debido a que ésta es la fase más vulnerable en el ciclo de vida de los agaves, pues tienen una cantidad limitada de reservas, baja capacidad para absorber agua y están expuestos a grandes variaciones de temperatura en la superficie del suelo, por lo que dependen de manera crítica de plantas nodrizas; además, constituyen un alimento succulento y nutritivo para los insectos y roedores (Gentry, 1982; Nobel, 1988).

### **Metabolismo y adaptación a los ambientes áridos**

Aunque el grado de adaptación varía considerablemente, la mayoría de los agaves poseen estrategias para sobrevivir en ambientes secos o periódicamente secos ya que la forma y distribución de sus hojas les ayuda a capturar la poca agua de lluvia disponible de una manera más eficiente (Gentry, 1982).

El sistema de la raíz de los agaves es superficial, lo cual facilita la absorción de agua de lluvia, generalmente escasa, que sólo humedecen la superficie del suelo; de tal manera que la probabilidad de supervivencia de una roseta en sequías prolongadas depende del volumen de agua y de los carbohidratos almacenados durante la época favorable. Así mismo, en época seca el agua almacenada ayuda a mantener las reacciones bioquímicas y la apertura de estomas para la asimilación de carbono ( $\text{CO}_2$ ), aun en condiciones prolongadas de sequía, que pueden durar hasta siete años. El abundante desarrollo de fibras en los tejidos de las hojas mantiene su rigidez durante los periodos de pérdida de agua, logrando con esto que no se deformen los tejidos; esta función se complementa con la presencia de dientes en el margen y una espina terminal.

Son varias las características de los agaves que les permiten evitar una excesiva transpiración como lo son una reducción en la superficie que transpira en relación con el volumen total del órgano, la presencia de una cutícula gruesa en la epidermis de la hoja, la acumulación de cera en la superficie y la presencia de estomas de naturaleza compleja que aseguran una protección adicional contra la evaporación durante los periodos de sequía.

Sin embargo la principal característica de adaptación de este género es que poseen el metabolismo ácido de las crasuláceas (MAC), el cual 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 se abran durante la noche para fijar el CO<sub>2</sub> atmosférico con el ácido fosfoenolpirúvico y formar ácido málico, mientras que durante el día los estomas se cierran para evitar la transpiración excesiva y así el ácido málico se transforma en ácido pirúvico, que luego pasa a carbohidratos y a almidón mediante el proceso fotosintético (Nobel, 1988).

### **Generalidades históricas del Agave**

Las evidencias arqueológicas hacen referencia a que hace más de diez mil años los grupos nómadas y seminómadas hacían uso de distintos tipos de agaves. Aproximadamente hacia el año 200 a.c. el maguey ya se cultivaba en Tula, Tulancingo y Teotihuacán (Oliver, 1995).

Según la mitología mesoamericana el descubrimiento del maguey fue un hecho muy importante para ellos. Ellos aprovechaban el maguey de distantes maneras; Con los quiotes elaboraban sus estructuras habitacionales y con las pencas se encargaban de cubrir sus techos y paredes, las cuales a su vez se utilizaban como canales conductores de agua, platos, Además se extraían las fibras necesarias para elaborar el papel con que se hacían los códices, para la producción de calzado y elaboración de telas.

Es importante señalar que cada parte del maguey se aprovechaba, las púas servían como agujas de coser para la elaboración de las mantas y telas y, las flores para

la creación de ricos platillos. El protomédico Francisco Hernández afirma que: *“El maguey está compuesto de varias propiedades, las cuales pueden aprovecharse no solo para elaborar telas, mantas y demás, sino también para uso medicinal”*. Ya que por ejemplo las pencas asadas y aplicadas calientes sobre el vientre de una persona enferma no solo calmaban los dolores, sino que desbarataban los cálculos renales y desalojaban las vías urinarias. Asimismo, el jugo de las pencas asadas servían para curar malestares, y con la tela que cubre la hoja, la gente cicatrizaba rápidamente sus heridas. (Oliver, 1995).

Durante la conquista europea y con la llegada de los españoles a América llega también el conocimiento de la destilación, mismos que al observar el alto contenido de azúcares del agave cocido así como de sus beneficios comenzaron a ensayar su destilación logrando así que los derivados del maguey tuvieran un incremento, ahora el pulque se consideraba libre para su consumo y esto fue lo que hizo que su venta fuera aun mayor.

A principios del siglo XXI, debido a la irracional explotación, a las siembras inadecuadas y a las políticas que van dirigidas a sustituir el uso de fibras naturales por sintéticas y del pulque por otras bebidas como cerveza, vino o ron, el maguey y sus derivados tienden a desaparecer. No obstante, se continúan las investigaciones a nivel de laboratorio para seguir aprovechándolo ahora a nivel industrial, como fibras celulósicas, papel para la elaboración de billetes bancarios, aglomerados, fructuosa, acetona, saponina, sueros glucosados e insulina, plásticos y forrajes (Oliver, 1995).

### **Usos e importancia económica de las plantas de Agave**

Como ya se mencionó, el maguey representa uno de los recursos naturales de mayor importancia desde el punto de vista económico, social y agroecológico en México. La importancia del uso del maguey se remonta a la época prehispánica, cuando los pueblos indígenas del centro y norte del país encontraron en esta planta una fuente de materia prima para elaborar una gran cantidad de productos.

### **Fuente de Fibras**

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 sisal (*A. sisalana*) es un agave que se cultiva especialmente para la extracción de fibras. Y es originaria de Yucatán. En el siglo XIX su cultivo se trasladó también a Florida, las Antillas y Brasil y posteriormente a algunos países de África como Tanzania o Kenya.

La producción anual de fibra del sisal es la segunda, después del algodón. Esta especie, actualmente aporta el 70% de las fibras duras largas a nivel mundial. La planta de sisal produce por 7 a 10 años y produce 200 a 250 hojas comerciales. Cada hoja tiene un promedio de 1,000 fibras. La fibra, que representa el 4 % del peso de la planta, se extrae con el proceso de decorticación. Las hojas se transportan a una planta central de descortezado, y luego la fibra se seca, cepilla y embala para exportar. La calidad superior de sisal se encuentra en el África oriental.

Las fibras de agaves, pueden ser ampliamente utilizadas en la confección de diversos productos como: hilos, cordelería, tejidos, redes, bolsas, cestos, costales, petates, mantas, vestimenta, tapetes, sandalias, cinchos, sudarios, hamacas, pencas para tortillas, sombreros, soportes de alfarería, cuerdas para arcos de casa, cuerdas para sogas y reatas, 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, 1938; citado por Gentry, 1982).

### **Construcción**

Los materiales producidos por los agaves pueden ser utilizados en la construcción. Los quiotes (inflorescencias) sirven como vigas, barrotos y pilotes. Y las pencas (hojas) son utilizadas para construir cercas para delimitar terrenos, techos a modo de tejado, canales para colectar agua de lluvia, bateas para mezcla, aditivo para mezcla. Además de los residuos de fibra pueden ser extraídas resinas termoplásticas o termófilas.



### **Doméstico**

De los derivados del agave podemos obtener una gama de productos que son utilizados para fines domésticos como son: jabón para ropa, cepillo para lavar, cepillos y escobas, canastas, clavos, aguja con hilo incluido, recipiente para comida, bateas para masa y otros alimentos, recipiente para agua y como cubierta para barbacoa.

### **Alimentación**

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 saponinas 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 cocinando las "cabezas" (parte basal de la planta a la cual previamente se le han eliminado sus hojas) sobre rocas calentadas por brasas y colocadas en grandes fosas, para obtener un producto dulce y nutritivo. También se prepara una bebida dulce, hirviendo en agua los pedazos de agave cocido y en ocasiones esta bebida se deja fermentar para obtener un licor (Canizales, 1995).

### **Ornato**

Algunas plantas del género agave se usan en interiores y exteriores como decoración. También se usa al agave como adornos navideños, base para adornos de pluma y oro, fibras para arcos florales, adornos corporales, juguetes para niños, sonajas y tocado para mujeres (Oliver, 1995).

## Forraje

Los Agaves son una de las mejores opciones forrajeras, debido a la alta eficiencia en el uso del agua y a la adaptación del recurso a diferentes hábitats, sobre todo en las zonas semidesérticas (Oliver, 1995).

Del agave se utilizan las hojas e incluso la piña para darlo como suplemento a los animales ya que les proporcionan: altos niveles de energía digestible, minerales y agua, los cuales cubren los requisitos de mantenimiento y producción de ganado. Se hace notar que para lograr obtener el beneficio del potencial de su alta digestibilidad, es necesario suplementar con nitrógeno, mismo que las bacterias del rumen necesitan para digerir la fibra. Los ganaderos acostumbran picarlo en el campo o en el corral y combinarlo con otras fuentes de alimentos como los residuos de cosecha. Con esta práctica se reduce la tasa de mortalidad de ganado, se reduce el consumo de agua, se reduce la compra de forraje, pudiéndose tener mayor carga animal en los predios, así como una mejor distribución y consumo de sales minerales lo que redundará en una mejor condición física del ganado. También el agave usado como forraje para rumiantes, tiene importancia por su alta productividad, su empleo en periodos críticos del año (estiaje) y sus ventajas nutrimentales, como son su alto contenido de azúcares, material mineral y fibra cruda, lo cual se aprovecha si se emplea una base regular de alimentación del ganado durante todo el año.

La calidad forrajera del maguey depende de la parte que sea utilizada, aunque el uso más común son las hojas. En hojas de *Agave salmiana*, se determinó que los niveles de minerales como Ca, Mg, Zn, Fe y Cu, satisfacen los requerimientos diarios de ganado lechero (Silos *et al.*, 2005). En animales con raciones bien formuladas, donde se combinan diversos alimentos para que se logre una óptima digestión, hay una digestibilidad del maguey arriba del 80 %, dependiendo de la parte de la planta (penca, piña, y quiole), de su edad y del estado fisiológico. Así, el ensilaje del maguey es una opción práctica para administrarlo finamente picado y apropiadamente balanceado.

### Usos Medicinales

Solo algunos componentes químicos presentes en las hojas de ciertas plantas del genero *Agave* han sido identificados, pero se sabe que las hojas contienen saponinas, esteroides, 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 productos 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).

### Fuente de Bebidas Alcohólicas

Los agaves producen dos clases distintas de bebidas. La primera de ellas comprende a un extracto obtenido de plantas vivas y consumidas 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.

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 fue una motivación para el cultivo de los agaves.

El Tequila y el Mezcal son obtenidas de la 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 (Gentry, 1982).

A través de los años, la producción de tequila se ha consolidado como una de las principales industrias de Jalisco. 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 lo que respecta al mezcal, es un producto destilado obtenido principalmente de la fermentación alcohólica de las cabezas de *Agave potatorum* y *Agave angustifolia* cultivados 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, 1982). Una bebida tipo mezcal es el bacanora, la bebida representativa del estado de Sonora. Ésta, al igual que el mezcal, también es obtenida mediante las operaciones de destrozamiento y rectificación de los mostos y fibras fermentadas, provenientes de rosetas (*cabezas o piñas*) de *Agave angustifolia* previamente cocidas.

### **Agave parviflora**

*Agave parviflora* es la más pequeña de las especies de agave. Se compone de un pequeño rosetón que mide de 10 a 25 cm de alto, de 15 a 20 cm de ancho, sus hojas son de 6 a 20 cm de largo y de 0,8 a 2 cm de ancho. Estas son de color verde oscuro con un recubrimiento ceroso y vistosas marcas blancas en ambas superficies y márgenes de la hoja, dichas marcas, son solo el resultado de la impresión de las yemas en desarrollo de la hoja y se encuentran al centro de la roseta, mientras que en los bordes exteriores de los márgenes de las hojas se desprenden fibras blancas. Cabe mencionar que estas plantas tienen su floración entre los 10 y 15 años de edad.

Otra característica de *Agave parviflora* es que la inflorescencia mide entre 1 y 2 m de altura, y tiene flores de color crema en racimos de 1 a 4 en ramas muy cortas y sus frutos maduros son pequeñas capsulas ovoides de 6-10 mm de diámetro. *Agave parviflora* por ser una especie pequeña y por sus cualidades particulares ha resultado ser muy atractiva para los coleccionistas y debido a esto, son muy deseables en interiores o

colecciones de invernaderos, sus flores maduran desde fines de primavera al verano, y son polinizadas por abejorros y abejas carpintero. Las semillas son liberadas gradualmente de las capsulas secas de fruta durante el otoño y el invierno. Viven tan solo 15 años, más o menos, pero generalmente producen brotes libremente en el cultivo (Gentry, 1982).

Debido al metabolismo ácido de las crasuláceas, esta planta está muy bien adaptada al medio desértico en el que vive y posee alta tolerancia al calor. Resiste una exposición total al sol y requiere de poca agua para sobrevivir. Además, quizá debido a la acumulación de inulina (principal polisacárido de agaves), presenta alta resistencia al congelamiento, pudiendo sobrevivir hasta  $-12^{\circ}\text{C}$ . De igual forma que la mayor parte de plantas de su género, el *Agave parviflora* es monocárpica, lo que significa que toma varios años de desarrollo antes de su único evento de producción de flores y semillas, posterior al cual viene la senescencia y muerte.

La distribución de *Agave parviflora* oscila entre el sur de Arizona a Sonora, México. Hay aproximadamente dos docenas de poblaciones de *Agave parviflora* documentadas en el sur de Arizona. Estas plantas se producen en laderas rocosas del desierto de pastizales y bosques de roble a elevaciones de 1100 a 2400 msnm (Gentry, 1982).

Además de su explotación artesanal y ornamental, existen otras amenazas que han afectado seriamente la población silvestre de *Agave parviflora*; entre ellas, la pérdida de hábitat debido a la minería y la construcción de carreteras, la degradación del hábitat debido al pastoreo, la destilación en exceso, la recolección ilícita y debido a que las especies de agave generalmente forman híbridos cuando hay polinización cruzada entre sí, siempre hay un peligro de "contaminación" de genes de una especie de reserva genética con los de otra especie. Cada uno de estos factores agrava aún más la situación de la especie, si se toma en cuenta su baja tasa de crecimiento y de propagación.

### Aspectos generales sobre el cultivo de tejidos *in vitro*

La expresión cultivo *in vitro* de plantas, significa cultivar plantas dentro de un frasco de vidrio en un ambiente artificial. Esta forma de cultivar las plantas tiene dos características fundamentales: la asepsia y el control de los factores que afectan el crecimiento.

El avance alcanzado por las ciencias biológicas ha permitido en los últimos años el estudio detallado de las plantas tanto a nivel celular como molecular, y en condiciones de laboratorio es posible actualmente reproducir todos los factores que puedan incidir en el crecimiento y desarrollo de las plantas.

Este principio general se aplica también al cultivo *in vitro* de plantas. Haberlandt, un científico alemán, postuló a principios del siglo pasado que las plantas eran capaces de reproducir su crecimiento a partir de células aisladas, originando la hipótesis de la totipotencia celular en plantas. Sin embargo, este investigador no pudo demostrar en forma práctica su hipótesis, debido a que la mayoría de los componentes complejos que integran los medios de cultivo actuales todavía no habían sido descubiertos. Sería recién en la década de 1950 cuando se determina la importancia del balance hormonal en las plantas, con el descubrimiento de las hormonas vegetales más usadas en la actualidad.

El cultivo de tejidos vegetales *in vitro*, consiste en cultivar pequeños segmentos de las plantas sobre medios sintéticos estériles bajo condiciones controladas, con el propósito de regenerar plantas enteras y esto se puede lograr a partir de casi cualquier parte de la planta como meristemos, tallo, raíces, hojas, inflorescencias, pétalos, polen, embriones, entre otros. Estas metodologías permiten la obtención de plantas genéticamente similares a una velocidad de producción considerablemente superior a cualquiera de los métodos tradicionales, ya que 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 este tipo de propagación clonal, se le conoce como micropropagación (Dodds y Roberts, 1990,

citados por Moreno-Salazar 1995).

Reproducir en condiciones de laboratorio todos los factores que conforman el ambiente de la planta en la naturaleza es técnicamente muy complejo. Por esa razón se realiza una simplificación de la realidad escogiendo aquellos factores que se puedan mantener controlados. Cuando no se realiza el estudio con todo el ser vivo sino con solamente una parte del mismo, se utiliza el término explante para indicar la parte del órgano ó tejido vegetal que se cultiva *in vitro*.

La micropropagación o propagación clonal, es una de las aplicaciones más generalizadas del cultivo *in vitro*. A través de la micropropagación, a partir de un fragmento (explante) de una planta madre, se obtiene una descendencia uniforme, con plantas genéticamente idénticas, denominadas clones. El explante más usado para los procesos de propagación *in vitro* son las yemas vegetativas de las plantas. Los frascos que contienen las plantas se ubican en estanterías con luz artificial dentro de la cámara de crecimiento, en donde la temperatura es controlada así como la cantidad de horas de luz. Por su parte, el medio de cultivo se compone de una mezcla de sales minerales, vitaminas reguladores de crecimiento, azúcar, agua y agar. La composición del medio depende de la especie vegetal y de la etapa del proceso de micropropagación.

### **Etapas de la Micropropagación**

Dentro del proceso de micropropagación diferenciamos varias fases o etapas:

- **Fase 0.-** Preparación de la planta madre. Para poder establecer el cultivo en condiciones de asepsia, se deben obtener explantes con un nivel nutricional y un grado de desarrollo adecuado, por lo que es recomendable mantener a la planta madre, en un invernadero bajo condiciones sanitarias óptimas y con un control de la nutrición y riego adecuados, durante un período de tiempo que puede oscilar entre unas semanas o varios meses.
- **Fase 1.-** Desinfección del material vegetal. Una vez elegida la planta madre, se extraen los fragmentos a partir de los cuales se obtendrán los explantes. Antes de obtener los explantes se hará una desinfección de los fragmentos de planta madre para eliminar los contaminantes externos.

Los contaminantes más comunes son los hongos y las bacterias que habitan en forma natural en el ambiente. Generalmente la desinfección del

material se hace sumergiéndolo en una solución diluida de hipoclorito de sodio comercial, durante un tiempo de 5 a 15 minutos, seguido por 3 a 4 enjuagues en agua esterilizada. Una vez desinfectado el material vegetal, se debe mantener en condiciones de asepsia, preferentemente se debe trabajar en cámaras de flujo laminar. Los explantes serán obtenidos por corte de material vegetal y se introducirán en un recipiente conteniendo el medio de iniciación.

- **Fase 2.-** Introducción del material *in vitro*. Luego de la desinfección superficial del explante se pone en medio de cultivo estéril. En un período de una semana o quince días, comienza el proceso de germinación o regeneración de nuevos tejidos, iniciando el ciclo de cultivo *in vitro*.
- **Fase 3.-** Multiplicación de los brotes. Durante esta fase se espera que los explantes que sobrevivieron las fases 1 y 2 originen brotes. Periódicamente estos nuevos brotes se deben subcultivar en un nuevo medio mediante divisiones y resiembras en tubos de cultivo u otros recipientes adecuados. De esta forma aumenta el número de plantas en cada repique o división de las plantas. El número de plantas que se obtiene por la vía de la micropropagación permite alcanzar incrementos exponenciales, considerando que todos los factores que afectan el crecimiento hayan sido optimizados.
- **Fase 4.-** Elección de un medio de enraizamiento de los explantes. Los brotes obtenidos durante la fase de multiplicación se transfieren a un medio libre de reguladores de crecimiento o que solo contenga hormonas del tipo auxinas. Algunas especies de plantas no necesitan pasar por esta etapa y emiten sus raíces en el mismo medio de cultivo donde se desarrollan, por lo tanto el proceso de multiplicación y enraizamiento transcurren en forma simultánea.
- **Fase 5.-** Aclimatación de los explantes enraizados. Los explantes recién enraizados son muy sensibles a los cambios ambientales, de manera que el éxito o el fracaso de todo el proceso depende de la aclimatación. En esta etapa las plantas sufrirán cambios que permitirán la adaptación de las mismas a vivir en condiciones naturales. En el momento en que se extraen los explantes enraizados de los frascos, están poco adaptados a crecer en un invernadero, ya que estos explantes han enraizado y crecido en ambientes con una humedad relativa muy elevada y generalmente tienen estomas que no son completamente funcionales frente a descensos de la humedad relativa, y por lo tanto demasiado lentos para evitar la desecación del explante. Por otra parte, crecer en ambientes tan húmedos también suele implicar la falta de una cutícula con cera bien desarrollada, que representa la barrera física para evitar la pérdida de agua a lo largo de toda la superficie de la planta.

Esta secuencia de etapas abarca el ciclo completo de la multiplicación de plantas *in vitro* y puede ser aplicada a diferentes especies vegetales, en cada caso se podrán



incluir simplificaciones o cambios de acuerdo a las características de las plantas, pero en términos generales son comunes al proceso de propagación *in vitro*.

### **Tipos de explantes utilizados**

Como ya se mencionó con anterioridad, se puede regenerar plantas a partir de cualquier parte de la misma. 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 depende de si se desea realizar una propagación masiva, mejoramiento genético, mutagénesis, producción de metabolitos, entre otros.

En general se pueden distinguir dos tipos de explantes:

- a) Explantes organizados; como 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*. Sin embargo los factores relativos al material vegetal utilizado, que pueden llegar a afectar el crecimiento y desarrollo *in vitro* son: El genotipo, la edad de la planta, la edad del tejido u órgano, el estado fisiológico, condiciones climáticas y de crecimiento de la planta, así como de la posición, tamaño, método de corte e inoculación del explante (Pierik, 1987).

Los tallos de plantas viejas no son fuentes apropiadas de explantes para la iniciación de cultivo de tejidos de agave. Son duros, fibrosos, tienen un meristemo lignificado y muy probablemente estén infectados con algún tipo de microorganismo. Sin embargo la selección de materiales de elite solo puede ser llevada a cabo desde plantas viejas que han mostrado sus características superiores.

### **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 los siguientes:

- Destrucción física de microorganismos. Esto se hace usando aire caliente, vapor o radiaciones gamma o ultravioleta.
- Remoción física de microorganismos. Por medio de lavado y/o filtración.
- 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, oxido 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 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 cual 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 y Roberts, 1990, 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 crecimiento (temperatura, luz, pH y concentraciones de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>) y algunas sustancias orgánicas, tales como: reguladores de crecimiento, vitaminas, aminoácidos entre otros (Dodds y Roberts, 1990; Hurtado y Merino, 1988; 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 optima 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; Pierik; 1987).

### **Composición de los 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 en estas condiciones no son completamente autotróficas. 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 meristemas 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 de 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 Baeto 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 empleados *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 en esta mezcla mineral no siempre es la óptima debido a su alto contenido de sales.
- c) Reguladores de crecimiento: las hormonas por definición son compuestos orgánicos sintetizados en las plantas superiores, que influyen 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 dos, 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 indolacético (AIA), ácido indolbutírico (AIB), ácido naftalen-acético (ANA) el 2,4-dicloro-fenoxi-acético (2,4-D). En lo que se refiere a las citocininas, estas son usadas para estimular el crecimiento y desarrollo de los

- explantos, mediante un incremento en la división celular especialmente cuando se adicionan junto con auxinas. En altas concentraciones (de 1 a 10 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup>), 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 caseína, 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 son: agua de coco, pulpa de plátano y emulsión de pescado (Dodds y Roberts, 1990; Hurtado y Merino, 1985; Pierik, 1987).
  - i) Antibióticos: El uso de estas sustancias para controlar la contaminación *in vitro* no está recomendado por:
    - 1) El alto costo que implica
    - 2) La disponibilidad limitada
    - 3) La mayoría de ellos son tóxicos para los tejidos vegetales.
    - 4) No son efectivos contra la contaminación por hongos.

Además, antes de aplicar cualquier antibiótico a un sistema de cultivo de tejidos, aislamientos bacteriales y antibiogramas deben llevarse a cabo para asegurarse de su efectividad. El grado de toxicidad en el tejido vegetal también debe ser determinado previo a su uso (Robert *et al.*, 2006).

### 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 y Roberts, 1990; Pierik, 1987).

## **Reguladores de Crecimiento**

Anteriormente todos los reguladores de crecimiento eran considerados como hormonas vegetales, los cuales son sustancias orgánicas sintetizadas en alguna parte de la planta, capaces de translocarse a otra zona, donde en concentraciones muy bajas causan una respuesta fisiológica. Actualmente éstas se encuadran dentro de una denominación más amplia, la de “reguladores de crecimiento vegetal”, en razón de que existen otras sustancias, entre las que pueden mencionarse a poliaminas, brasinólidos, ácido salicílico y jasmonatos, que no cumplen con la característica de ejercer efecto a distancia propia de las hormonas vegetales, pero que pueden regular y alterar tanto el crecimiento como el desarrollo vegetal provocando en numerosos casos respuestas fisiológicas similares a las de las hormonas vegetales.

A medida que los reguladores de crecimiento fueron identificados comenzaron los estudios sobre sus efectos, mucho antes de poder determinar sus concentraciones endógenas debido a limitaciones instrumentales actualmente superadas. Estos desencadenan respuestas en muchas partes del vegetal mismas que varían con la especie, órgano que se estudie, estado de desarrollo, concentración e interacción hormonal y diversos factores ambientales. Por estos motivos resulta riesgoso generalizar acerca de los efectos de estos reguladores sobre los procesos de crecimiento.

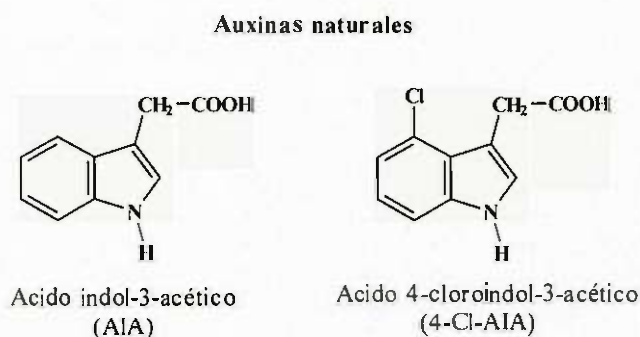
En la actualidad se considera que existe un sistema de respuesta que hace que los reguladores de crecimiento resulten activos y específicos. Este sistema, aplicable a un gran número de reguladores de crecimiento y consta de tres puntos; el regulador debe encontrarse en la cantidad adecuada, debe ser reconocido por los receptores de las células blanco y debe existir la presencia de mecanismos de amplificación de las señales del mensajero hormonal.

Como se mencionó anteriormente la concentración de los reguladores es fundamental para la acción de ellos mismos. Durante el desarrollo de un tejido la concentración endógena de las hormonas pueden sufrir variaciones, esto provoca cambios en el sistema de recepción afectando la sensibilidad del mismo.

La sensibilidad en el sistema de recepción puede ser afectada por diferentes factores; en el número de receptores (receptividad), la afinidad por el receptor (afinidad) así como en la capacidad de respuesta, en los eventos posteriores a la recepción. Los cambios que pudieran ocurrir sobre cualquiera de los factores descritos, durante el desarrollo de un tejido ocasionarían modificaciones sobre la sensibilidad de estos sistemas (Davies, 1995).

### Auxinas

Son compuestos caracterizados por su capacidad de inducir elongación en células de vástagos. La auxina natural de mayor distribución es el ácido 3-indolacético (AIA), aun cuando el ácido 4-cloroindol-3-acético ha sido aislado de plantas superiores. En general este grupo de hormonas afecta otras características fisiológicas, además de la elongación, pero esta acción es considerada crítica.

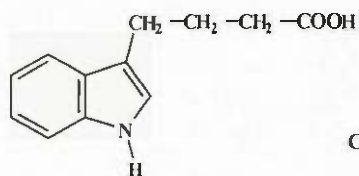
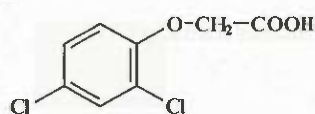
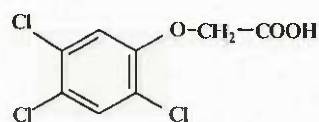


**Figura 2.-Estructura Química de auxinas naturales.**

La característica estructural principal de todas las moléculas con actividad auxina es que, a pH neutro, tienen una fuerte carga negativa en un carboxilo separada de una carga residual positiva por una distancia de 0.55 nm. Esta separación de carga parece ser esencial para la actividad de la auxina.

Son numerosos los ejemplos de auxinas sintéticas utilizados en cultivo de tejidos vegetales, fundamentalmente porque su acción es más prolongada que la de sus análogos naturales y su costo inferior.

## Auxinas sintéticas

Acido indol-3-butírico  
(AIB)Acido 2,4-diclorofenoxiacético  
(2,4-D)Acido 2,4,5-triclorofenoxiacético  
(2,4,5-T)**Figura 3.**-Estructura química de auxinas sintéticas

Las auxinas pueden ser transportadas por el floema de forma apolar. El AIA se sintetiza principalmente en el ápice de las yemas, y se transporta polarmente hacia la raíz a través de las células parenquimáticas asociadas al tejido vascular. Una vez llegada al tejido receptor, el transporte de las auxinas es a través de las células de forma polar, activa y unidireccional con el consiguiente consumo energético. De acuerdo con un modelo quimiosmótico, el gradiente de pH entre la pared celular (pH~5) y el citoplasma (pH~7) facilita la entrada de la forma reducida de las auxinas (AIAH) a través de la membrana citoplasmática, mientras que impide la salida de la forma oxidada de la auxina (AIA) de la célula. Esta se lleva a cabo a través de transportadores específicos situados en la parte basal de la membrana celular.

La respuesta de la planta a las auxinas para un tejido determinado depende de su concentración y sensibilidad a ellas. La degradación de las auxinas es irreversible, así, como la forma de control de su concentración. Las auxinas suelen encontrarse de forma conjugada o ligada con otras moléculas, estas formas son inactivas pero tienen varias funciones: almacenamiento, transporte, protección y desintoxicación. De esta manera, el nivel intracelular de auxina activa depende de su síntesis, transporte, degradación y compartimentación.

**Efectos fisiológicos de las auxinas**

Las auxinas afectan tanto a la división, como al crecimiento y diferenciación celular, por lo que están implicadas en numerosos procesos del desarrollo, muchos de



ellos en interacción con otras hormonas; regulan el fototropismo, el gravitropismo y el tigmotropismo mediante la redistribución lateral de la auxina, provocan la elongación celular mediante el incremento de la extensibilidad de la pared celular, estimulan el crecimiento de los tallos y los coleóptilos, inhiben el crecimiento de la raíz y estimulan la formación de raíces secundarias, inducen la formación de raíces adventicias a partir de esquejes, causan dominancia apical, retardan la abscisión de los órganos, inducen el desarrollo floral, contribuyen a la regulación del desarrollo del fruto e inducen la diferenciación vascular (Osborne y McManus, 2005).

### **Mecanismos de acción**

Las auxinas promueven el crecimiento principalmente por aumento de la expansión celular. De acuerdo con la hipótesis de crecimiento por acidificación, las auxinas estimularían la actividad  $H^+$ -ATPasa del plasmalema y provocarían el bombeo de protones hacia la pared celular (aún por dilucidar si por activación de las bombas existentes y/o por inducción de síntesis de nuevas  $H^+$ -ATPasas). Ello causaría una disminución del pH que provocaría la activación de expansinas, que rompen enlaces de hidrógeno y debilitan la pared, permitiendo el depósito de nuevos materiales, cuya síntesis y transporte también son activados por auxinas.

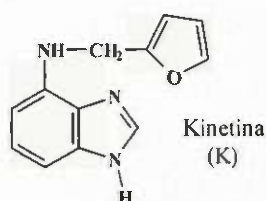
Se han detectado muchos genes cuya expresión se modifica por auxinas. Entre ellos, genes de respuesta a gravitropismo, genes reguladores del ciclo celular, proteínas moduladas por calcio de unión al ADN o asociadas a paredes celulares, así como algunos relacionados con metabolismo secundario y estrés. Las auxinas también inducen la síntesis de giberelinas, hormonas que promueven el crecimiento del tallo; por tanto, también estimulan de esta forma indirecta el crecimiento (Osborne y McManus, 2005).

### **Citoquininas o citocininas**

Se definen como citoquininas a los compuestos naturales o de síntesis que en presencia de adecuadas concentraciones de auxinas inducen la división celular en cultivos de tejidos vegetales. Estas son un grupo de fitohormonas que regulan la división celular y la diferenciación en tejidos vegetales, participan en el control del desarrollo y

la senescencia.

En 1956 se aisló una aminopurina, a partir del ADN de esperma de salmón autoclavado, con capacidad para inducir división celular en tejidos vegetales. Se le llamó quinina (cinetina). En estudios llevados a cabo en células aisladas de tabaco, se observó que las auxinas sólo podían estimular un alargamiento celular y era imprescindible la presencia de cinetina para inducir la división celular. En general, las citocininas (de citocinesis) no sólo inducen división celular, sino que, como el resto de hormonas, tienen otros efectos fisiológicos. La primera citocinina natural purificada fue la zeatina, que es la más abundante en plantas. Posteriormente, se han descubierto más de un centenar de productos con efectos parecidos.



**Figura 4.-**Estructura química de la kinetina

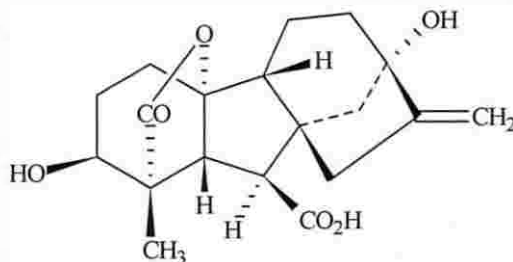
En la mayoría de los procesos en que están implicada, las citoquininas participan junto con otras hormonas, especialmente auxinas. Así, ambas controlan el ciclo celular, actuando de forma sinérgica: las auxinas inducen la expresión de genes de CDKs (genes *Cdc* o “cell division cycle”), que se sintetizan inactivas por la presencia de un grupo fosfato mientras que las citoquininas inducen la síntesis de fosfatasas encargadas de activar a las CDKs.

Además de la inducción de la división celular, las citocininas están implicadas, entre otros procesos, en diferenciación de las células indeterminadas de agallas y callos a órganos dependiente del cociente citocinina/auxina. Si es favorable a las citoquininas, se induce formación de yemas y tallos (caulogénesis), y si lo es a las auxinas, se inducen raíces (rizogénesis), la proliferación de yemas axilares (disminución de la dominancia apical), por una razón elevada citocinina/auxina, el retraso de senescencia foliar por

represión de genes promotores de la misma así como desarrollo de cloroplastos por inducción de síntesis de sus componentes de forma sinérgica con la luz.

### Giberelinas

Las giberelinas son terpenoides de 19 o 20 átomos de carbono, cuya estructura química está constituida por un anillo *ent*-giberelano. Su aplicación estimula el crecimiento en plantas mutantes deficientes en su producción, que suelen tener fenotipos enanos. No obstante, sólo un reducido número de giberelinas tiene realmente actividad hormonal en las plantas. Las demás son formas precursoras e inactivas.



ácido giberélico  
(GA<sub>3</sub>)

**Figura 5.**-Estructura química del ácido giberelico

### Efectos fisiológicos de las giberelinas

Los principales efectos de las giberelinas sobre el desarrollo son: la inducción del crecimiento del tallo, regulación de la transición entre la fase juvenil y adulta, inducción de la floración y determinación sexual de la flor, promoción de la producción de frutos así como la inducción de la germinación de semillas.

### Ácido abscísico

El ácido abscísico (ABA) reúne todas las condiciones para ser considerado una hormona, presenta efecto inhibitor sobre el crecimiento al ser aplicado a plantas intactas y antagoniza la acción de las hormonas promotoras del mismo; además ejerce una gran variedad de efectos sobre el metabolismo vegetal. El nombre de ácido abscísico deriva

del antiguo rol que se le atribuía a esta hormona en la abscisión de las hojas (Osborne y McManus, 2005).

### **Efectos fisiológicos del ABA**

Dentro de los numerosos efectos fisiológicos que el ABA presenta podemos citar su participación en el cierre estomático que preserva la reserva hídrica del vegetal, además de tener otras funciones en la planta. Muchas de ellas relacionadas con la maduración y protección de las semillas como por ejemplo: induce la acumulación de proteínas de reserva durante la embriogénesis, inhibe el viviparismo o germinación precoz en el fruto, induce tolerancia a la desecación de los embriones, promoviendo la síntesis de proteínas que favorecen la resistencia a la desecación y junto con las giberelinas, controla la dormición de las semillas que poseen esta característica, inhibe enzimas inducibles por giberelinas, induce el crecimiento de la raíz e inhibe el crecimiento del tallo en estrés hídrico, induce la senescencia foliar independientemente del etileno y se incrementa en respuesta a estrés, no sólo hídrico, sino de otros tipos, como salino, térmico, o heridas mecánicas, por lo que puede ser una señal anti-estrés bastante generalizada (Osbone y McManus, 2005).

## **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 las 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 pasaran 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 rosetadas, ya que las probabilidades de contaminación son muy altas; para reducir las probabilidades de infección es mejor utilizar solo las yemas cerradas; b) así hay infecciones internas es preciso recurrir al cultivo de meristemas; c) la velocidad de propagación es dependiente de número de yemas disponibles; otro factor especialmente importante en el caso de plantas leñosas, es la dormancia, ya que estas 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°C), días largos (16 hrs 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 maduros es más fácil. Los primeros reportes en el aislamiento de yemas y su subsecuente enraizamiento, fueron realizados en espárragos por Galston, 1947 y 1948 (Galston 1961). 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, encontrado que para un buen enraizado se requiere condiciones de oscuridad y la presencia de altas concentraciones de ácido naftalenacético (Pierik, 1987).

### **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 cual 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, sólo un pequeño número de meristemos axilares se desarrolla, 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 citocinina 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 citocinina (generalmente en un rango de 0.5 a 10 mg/l) y el cultivo se mantiene en las condiciones óptimas, pueden alcanzarse a 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 ( $0.01$  a  $0.1 \text{ mg l}^{-1}$  y de  $0.05$  a  $0.5 \text{ mg l}^{-1}$  respectivamente). El uso de citocininas generalmente se eleva en los subcultivos sucesivos, a fin de alcanzar una velocidad alcanzable de proliferación, tratando de evitar a la vez el amarillamiento o distorsión de los rebrotes (Pierik, 1987).

### **Cultivos 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 punta de tallos relativamente grandes (de 5-10 mm).

Los meristemos apicales se refieren exclusivamente a la porción distal por debajo del primordio foliar más joven; mientras que los rebrotes apicales se refieren 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 (Pierik, 1987).

### **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:

- Des-diferenciación de células diferenciadas (posiblemente orientadas hacia la re-determinación 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 más 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. El número de plantas que pueden formar brotes adventicios *in vivo* y/o *in vitro* es mucho más pequeña que aquellas que son capaces de formar raíces adventicias.
2. La probabilidad de obtener mutantes aumenta con este método, mucho más 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 *Saintpaulia*, ya han sido clonadas por este método (Pierik, 1987). 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 adecuada 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 (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 si mismos poseen un potencial endógeno para la formación de callo dado que en forma natural, al recibir una lesión en algún órgano, esta puede ser reparada por este tipo de tejido. Sin embargo dichas respuestas se manifiestan en diferentes grados, entre las distintas especies.

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 incluyentes 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 micro propagación. Esto es debido a la alta incidencia de aneuploidia y poliploidia. Sin embargo esto no significa que la micro propagación 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 este no es un procedimiento confiable como 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, arboles y palmas tropicales (Dixon, 1986).

## MATERIALES Y METODOS

### Material vegetal utilizado

Como fuentes de explante, se utilizaron plántulas de *Agave parviflora* de un mes y medio de edad obtenidas mediante la germinación de semilla. Dichas semillas fueron colectadas en el Rancho el Bajío situado en el municipio de Nácori Chico.

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: inmersiones 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 sembraron en cajas de Petri, conteniendo el medio base de Murashighe & Skoog (MS), conteniendo 3 g l<sup>-1</sup> de sacarosa y 8 g l<sup>-1</sup> de agar. En todos los casos se ajustó el pH a 5.8. Enseguida las cajas se pasaron a incubación bajo condiciones de oscuridad a 28°C. Una vez que las plántulas emergieron, desarrollaron su primer par de hojas y alcanzaron una talla de 3-5 cm, se procedió a tomar los explantes.

### Métodos de multiplicación en estudio

La técnica de multiplicación estudiada fue la regeneración de brotes a partir de tejido de callo. Para la producción de tejido de callo, se utilizó un diseño completamente al azar en arreglo factorial 3x3x3. Como explantes se utilizaron segmentos de: a) hoja, b) raíces y c) tallos, de las plántulas germinadas. En medio MS se probaron tres concentraciones (1.13, 3.39 y 5.61 µM) de Ácido 2-4 Diclorofenoxiacético (2,4-D) y tres concentraciones (2.22, 6.66, 11.1 µM) de Bencil Adenina (BA).

La producción de embriones e inducción de brotes se manejó inicialmente en un ensayo de 3x2, con las concentraciones de 2.4-D y BA que mostraron buena respuesta en la inducción de callo, posteriormente se eliminó BA del medio de crecimiento, adicionando cinetina en concentraciones de 5, 10 y 15 mg l<sup>-1</sup> (Cuadros 1 y 2).

Cuadro 2.-Tratamientos usados para organogénesis en *Agave parviflora*.

Tratamiento	2-4 D (μM)	BA(μM)
1	0	22.2
2	0	66.6
3	0	111.0
4	1.13	22.2
5	1.13	33.3
6	1.13	111.0

Cuadro 3.-Modificación al ensayo de organogénesis en *Agave parviflora*.

Tratamientos	2.4 D (mg/l)	Cinetina (mg/l)
7	0.25	5
8	0.25	15
9	0.25	25

### Sembrado y crecimiento

La siembra de los explantes se realizó en condiciones de asepsia utilizando una cámara de flujo laminar y el cultivo se desarrolló bajo una cámara de crecimiento controlado a 25 °C y fotoperiodo de 12 h (figura 6).

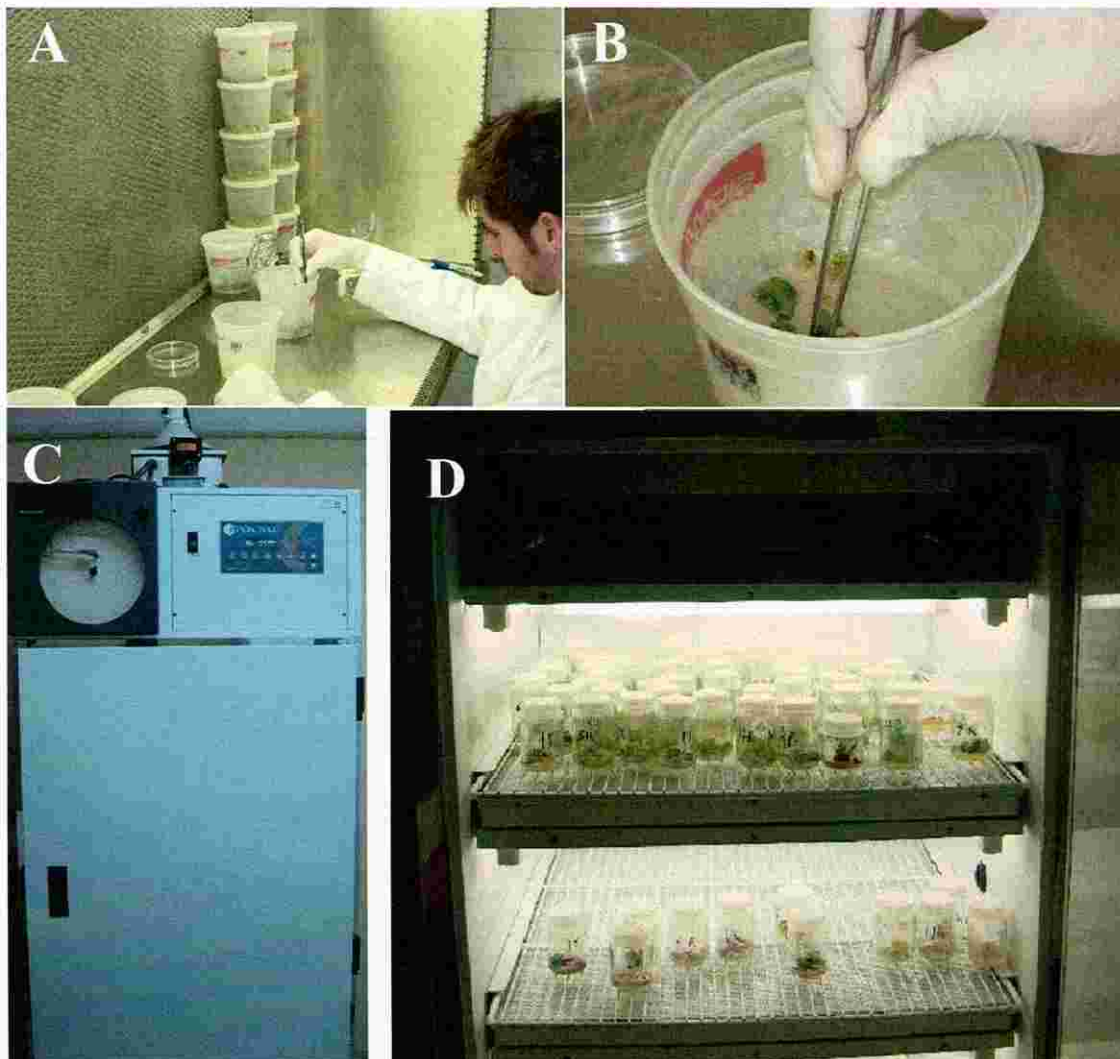


Figura 6.-A) Proceso de sembrado en cámara de flujo laminar. B) Trasplante de masa de callo a un nuevo medio de cultivo. C) Cámara de crecimiento utilizada. D) Cámara de crecimiento vista por dentro.

### Variables Respuesta

Como variables respuesta se analizaron, la biomasa de callo producido usando

una escala arbitraria donde se clasificó la cantidad de biomasa en tres rangos (mucho, medio y poco) de acuerdo con el crecimiento relativo al explante inicial. Se registraron también las características del callo producido en cuanto a coloración y apariencia. La capacidad de desarrollo de brotes u organogénesis, se evaluó contabilizando el número de brotes por explante.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se han desarrollado diferentes protocolos de técnicas de cultivo de tejidos para la propagación masiva para algunas especies del genero *Agave*. La investigación del cultivo de tejidos en agaves ha sido desarrollada principalmente con fines de propagación masiva para diferentes especies como *A. fourcroydes* (Robert *et al.*, 1987), *A. cantala* (Binh *et al.*, 1990), *A. tequilana* (Castro-Concha *et al.*, 1990), *A. angustifolia* (Moreno-Salazar, 1995), *A. parrasana* (Santacruz-Ruvalcaba *et al.*, 1999), *A. victoria-reginae* (Rodríguez-Garay *et al.*, 1996, y *A. sisalana* (Nikam, 1997; Hazra *et al.*, 2002; Nikam *et al.*, 2003) . Todos estos sistemas de regeneración son diferentes debido a las respuestas específicas de cada especie y no existen reportes del uso en *Agave parviflora*.

Los resultados del experimento de producción de callo, mostraron una relación directa entre la concentración de reguladores de crecimiento y la producción de masa de callo, Además el callo obtenido es más turgente y de un color verde más intenso (Cuadro 3). Este tipo de callo generó mayor número de embriones.

Para el caso de los explantes colocados en concentraciones más bajas de reguladores de crecimiento por lo general fueron menos compactos, de color amarillento o café y, no resultaron embriogénicos. Esto concuerda con el trabajo de Tejavathi *et al.*, (2007) en embriogénesis somática de *Agave Vera-cruz* Mill., en el que se menciona que el color del callo embriogénico también era de color verde oscuro y que a las 8 semanas de haber transferido el callo embriogénico a un medio de cultivo con varios reguladores de crecimiento hubo formación de brotes con raíz y subsecuentemente estos se separaron de la masa de callo y cayeron al medio de cultivo. No así en este experimento en el que si bien, hubo formación de brotes con raíz estos rara vez se desprendían de la masa de callo, motivo por el cual tuvieron que ser removidos manualmente para su posterior sub cultivo en un medio enraizador.

De acuerdo con Robert *et al.*, (1992), una alta concentración de reguladores de crecimiento y/o el potencial de agua del medio de cultivo pueden inducir un exceso de agua en las células, lo cual produce una apariencia vítrea en los tejidos conocida como vitrificación. En este trabajo de acuerdo con los niveles de concentraciones de reguladores en estudio, se observó que entre más alta fue la concentración de reguladores de crecimiento hubo mayor producción de callo fotosintético y aunque en ciertas partes se presentó una ligera incidencia de vitrificación, también se observó que este tipo de callos producían embriones sanos.

Por otra parte se observó que los segmentos de tallo resultaron ser mejores explantes que los de hojas, y éstos que los de raíz. Respecto de los segmentos de raíz, se encontró que la mayoría se oxidan y pierden su viabilidad antes de generar callo. Esta observación concuerda con lo que se encontró en los experimentos de embriogénesis somática en ajo, llevados a cabo por Fereol *et al.*, (2002), en los que mencionan que el callo proveniente de explantes de hoja jóvenes produjeron un número significativamente más alto de embriones comparado con el callo proveniente de secciones de raíz.

De acuerdo con los resultados mostrados en el cuadro 4, es posible observar que el mejor tratamiento para la producción de callo fue el correspondiente a 5.61  $\mu\text{M}$  de 2,4-D y 11.1  $\mu\text{M}$  de BA.

Cuadro 4.- Reguladores de crecimiento, producción de biomasa de callo y sus características en *Agave parviflora*.

Regulador de crecimiento ( $\mu\text{M}$ )			
2,4-D	BA		
1.13	2.22	Baja	Café necrótico
1.13	6.66	Baja	Café
1.13	11.1	Media	Verde amarillento
3.39	2.22	Baja	Café necrótico
3.39	6.66	Media	amarillo
3.39	11.1	Alta	Verde amarillento
5.61	2.22	Media	verde
5.61	6.66	Alta	Verde oscuro
5.61	11.1	Muy alta	Verde obscuro

Al finalizar la etapa de producción de callo, se modificó el medio de crecimiento,



con tratamientos diseñados para producir diferenciación como se indica en materiales y métodos. Respecto de la capacidad para generar nuevos órganos a partir del callo, se encontró que los tratamientos con 2,4-D son los que propician la mayor producción de hojas y raíces (Cuadro 4), mientras que los callos sin éste tratamiento por lo general se tornaron de color amarillento u oscuro y murieron.

Cuadro 5.-Reguladores de crecimiento y organogénesis de *Agave parviflora*.

Regulador de crecimiento (mgL )	Numero de Brotes
2,4-D	BA
0.25	5
0.25	15
0.25	25
a)	Promedio de al menos 3 repeticiones

Los resultados obtenidos muestran que es posible la organogénesis indirecta en *Agave parviflora*, donde los segmentos de tallo resultan ser los más apropiados para iniciar la propagación *in vitro*, además se tiene que el regulador 2,4-D es importante en este proceso. Respecto de la organogénesis resulta importante la adición de cinetina cuya interacción con 2,4-D resulta en una mayor diferenciación de brotes (Figura 7).

Se observó que al ser transferidos los brotes al medio enraizador, hubo proliferación de nuevos brotes a partir de la parte basal, aparentemente por producción lateral de brotes o por yemas axilares. Resultando en pequeños grupos de brotes pegados entre sí. Esto concuerda con lo observado en el trabajo de Robert *et al.*, (1987) para propagación *in vitro* de *Agave fourcroydes*, quienes mencionan que los brotes micropropagados son demasiado pequeños para ser sacados del cultivo *in vitro* y debe dárseles la oportunidad de desarrollar su aparato fotosintético y radicular, para la absorción de nutrientes, lo cual se logra dejándolos en el mismo medio de cultivo libre de hormonas a 27°C y con un fotoperiodo de 16 horas ( $70 \text{ mol m}^2 \text{ s}^{-1}$ ). Esto no solo les permite crecer sino también usar todos los reguladores de crecimiento que pudieron haber acumulado durante el proceso de multiplicación, Esto puede manifestarse con la formación de algunos brotes nuevos adicionales.

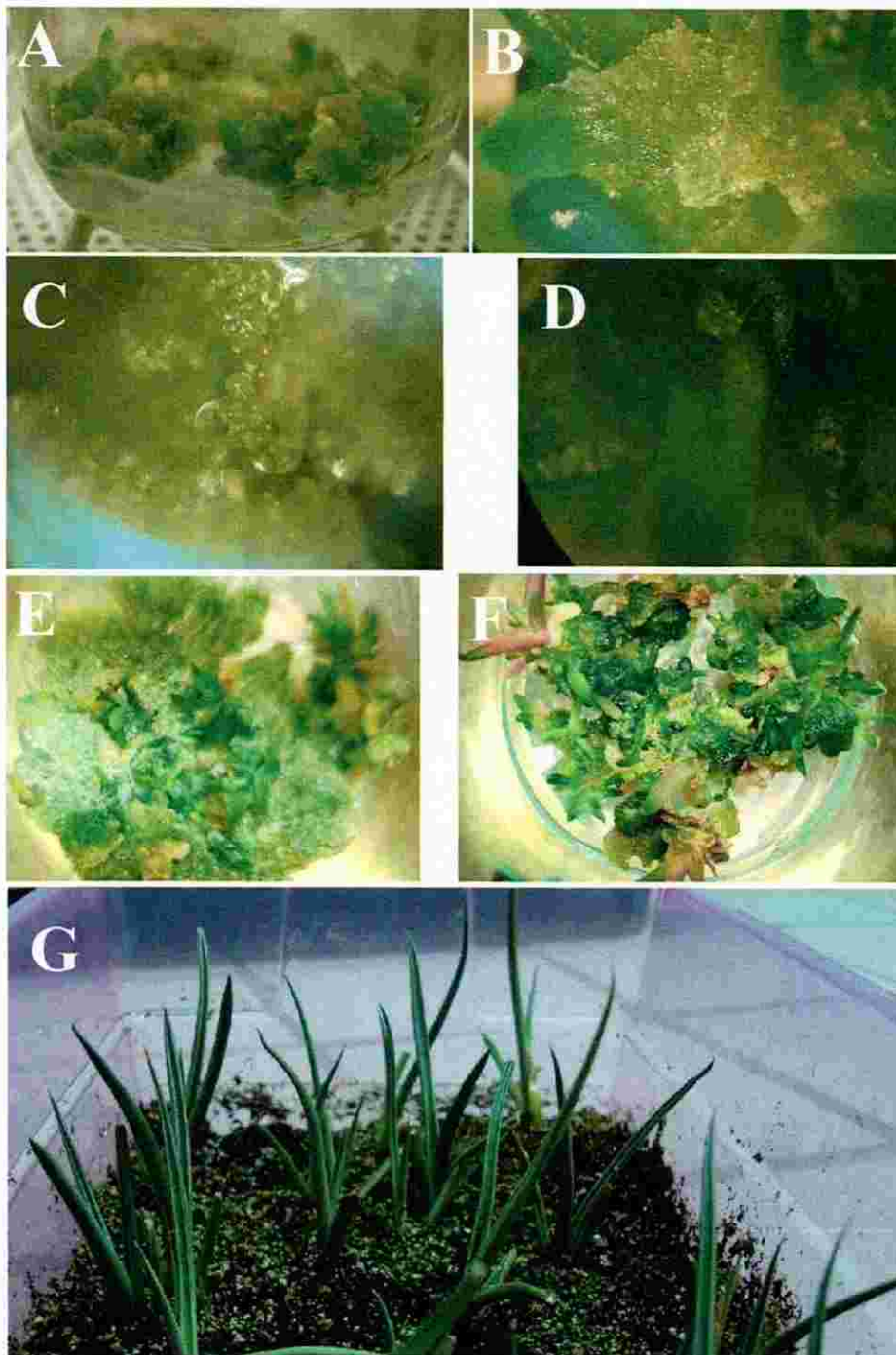


Figura 7.-A) Masa de callo en proceso de multiplicación, B) Callo nodular con tejido embriogénico y brotes. C) Embriones somáticos globulares. D) Tejido de callo con 2 hojas bien diferenciadas. E) Tejido de callo altamente embriogénico, y con varias estructuras diferenciadas F) Tejido de callo con estructuras bien diferenciadas. G) Plantas jóvenes obtenidas, en proceso de aclimatación.

Aún cuando ya se tienen brotes completamente enraizados, todavía no están

aptos para sobrevivir en condiciones naturales, Las hojas de los agaves cultivados *in vitro* no son normales, en la mayoría de los casos sus estomas no son funcionales, además de que carecen de cera epicuticular. Esto las hace muy susceptibles a la desecación. Además debido a la alta concentración de azúcares en el medio de cultivo, las plantas dejan de fotosintetizar eficientemente. Es por esto que las plantas sufren al cambiarlas del cómodo y aséptico medio de cultivo a tierra.

## CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Comparado a las técnicas de propagación vegetativa de plantas convencionales, donde el número de brotes producidos por los rizomas está limitado al número de yemas laterales disponibles, el cultivo de tejidos *in vitro* es una alternativa segura y eficiente para la propagación de uso comercial o con motivos ecológicos de *Agave parviflora*.

También es una técnica recomendable en el caso de las plantas cuyas semillas son susceptibles a las condiciones ambientales y a los depredadores naturales y por lo tanto sus poblaciones son muy escasas, como es en el caso de los agaves.

El cultivo *in vitro* a través de la formación de callo y posterior brotación es una técnica empleada ampliamente en transformación genética por lo tanto puede ser útil para el mejoramiento genético de agaves.

Es recomendable que su última etapa de crecimiento se lleve a cabo en un medio de pre adaptación sin azúcares y reguladores de crecimiento. Así, como una concentración de agar más alta que limitará la disponibilidad de agua. Además, estas plantas deben ser expuestas a luz de alta intensidad, de preferencia luz natural.

Se recomienda continuar investigando el efecto de los reguladores de crecimiento en el proceso de diferenciación. Para encontrar la concentración óptima que más produzca diferenciación a partir de masa de callo.

## BIBLIOGRAFÍA

- Binh, L. T., L. T. Muoi, H. T. K. Oanh, T. D. Thang, D. T. Pong. 1990. Propagación rápida de agave mediante cultivo de tejidos *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 23 (1): 67-70
- Canizales, G. 1995. Estudios para la selección de la tecnología de producción de Bacanora. Tesis de Licenciatura. Universidad de Sonora. Hermosillo, Son., México. pp. 64.
- Castro-Concha, L., V. M. Loyola-Vargas, J. L. Chan, M. L. Robert. 1990 Glutamate dehydrogenase activity in normal and vitrified plants of *Agave tequilana* Weber propagated *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 22: 147-151.
- Davies, P. J. 1995. *The Plant Hormones: Their nature, occurrence and factors in plant physiology, biochemistry and molecular biology*- 2nd Edition, Kluwer Academic Publishers. p. 545.
- Dixon, R. 1986. *Plant Cell Culture: A Practical Approach*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. IRL Press Limited, England. p. 235.
- Dodds J. H., L. W. Roberts, 1990. Técnicas de asepsia. En: *Experimentos en Cultivo de tejidos*. 2ª ed. Ed. Cambridge University Press. pp. 231.
- Fereol, L., Chovelon, V., Causse, S. Michaux-Ferriere N. Kahane R. 2005. Evidence of a somatic embryogenesis process for plant regeneration in garlic (*Allium sativum* L.) *Plant Cell Reports*. 21(3): 197-203.
- Galston A. W. 1967. *Vida de las plantas verdes*. México., Union Tipografica. Ed. Hispano Americana. pp. 194
- Gentry H. S. 1972. Familia del agave en Sonora. *Agriculture Handbook* N° 399. Ed. USDA, Washington, D. C. pp. 240.
- Gentry H.S. 1982. Neotropical floristic diversity: phytogeographical connections between Central and South America, Pleistocene climatic fluctuations, or an accident of the Andean orogeny. *Annals of the Missouri Botanical Garden*.

- Harza, S. K., S. Das y A. K. Das. 2002. Sisal plant regeneration via organogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 70: 235-240.
- Hurtado, M. D., M. M. Merino. 1988. *Cultivo de Tejidos Vegetales*. 1ª ed. Ed. Trillas, México, D.F. pp 232.
- Moreno-Salazar S. F. 1995. Tesis de Maestría, "Propagación in vitro de *Agave pacifica* Trel. (maguey de bacanora) para su conservación, repoblación y cultivo comercial". pp. 72.
- Murashige, T., Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiology Plant*. 15: 473-497.
- Nikam, T.D. 1997. High frequency shoot regeneration in *Agave sisalana*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 51: 225-228.
- Nikam, T. D., Bansude G. M., Kumar A. 2003. Somatic embryogenesis in sisal (*Agave sisalana* Perr. Ex. Engelm). *Plant Cell Reports*. 22: 188-194
- Oliver-Vega B. 1995. El uso del Maguey. México en el Tiempo No. 6.
- Osborne D. J., M. T. McManus. 2005. Hormones, signals and target cells in plant development. Cambridge: Cambridge University Press.
- Pierik, R.L.M. 1987. In vitro culture of higher plants. Dordrecht, The Netherlands Martinus Nijhoff Publishers. p.343.
- Nobel P. S. 1988. Environmental Biology of Agaves and Cacti, Cacti: Biology and Uses, University of California Press, P. S. Nobel (Eds.), New York Cambridge University Press. pp. 270.
- Robert M. L., J. L. Herrera-Herrera, E. Castillo, G. Ojeda, M. A. Herrera-Alamillo. 2006. An efficient method for the micropropagation of *Agave* species. *Methods Molecular Biology*. 318: 165-178.
- Robert, M. L., J. L. Herrera. F. Contreras, N. K. Scorer. 1987. In vitro propagation of *Agave fourcroydes* Lem. (Henequen). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 8(1): 37-48.

- Robert, M. L., Herrera J. L., Chan J. L., Contreras F. 1992. Micropropagation of *Agave* spp. In: Biotechnology in Agriculture and Forestry Vol 19. High-Tech and micropropagation III. Bajaj YPS Eds. Ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp. 206-252.
- Rodríguez-Garay B., A. Gutiérrez-Mora, B. a. Acosta. 1996. Somatic embryogenesis of *Agave victoria-reginae* Moore. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 46(1): 85-87.
- Santacruz-Ruvalcaba F., H. Gutiérrez-Pulido, B. Rodríguez-Garay .1999. Efficient in vitro propagation of *Agave parrasana* Berger. 56(3): 163-167.
- Silos, E. H., N. González, A. Carrillo, L. Guevara, M. E. Valverde, O. Paredes L. 2005. Composición química de aguamiel y pencas de *Agave salmiana* Gentry. V Congreso del Noroeste, I Nacional, en ciencias Alimentarias y Biotecnología. Centro de las Artes de la Universidad de Sonora Hermosillo. Son., México..
- Tejavathi, D. H., M. D. Rajanna., R. Sowmya., K. Gayathamma. 2007. Induction of somatic embryos from cultures of *Agave Vera-cruz* Mill. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant. 43: 423-428.
- Zimmerman J. L. 1993. Somatic Embryogenesis: A model for early development in higher plants. Plant Cell. 5:1411-1423.