

UNIVERSIDAD DE SONORA
DEPARTAMENTO DE AGRICULTURA Y GANADERIA

**INFLUENCIA DE LOS REGULADORES DE CRECIMIENTO
EN EL ESTABLECIMIENTO *in Vitro* DE *Agave angustifolia*
*Haw***

TESIS
MAESTRIA EN CIENCIAS

GUADALUPE OCAMPO RAMIREZ

NOVIEMBRE DEL 2006

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

**INFLUENCIA DE LOS REGULADORES DE CRECIMIENTO
EN EL ESTABLECIMIENTO in Vitro DE *Agave angustifolia*
*Haw***

T E S I S
MAESTRIA EN CIENCIAS

GUADALUPE OCAMPO RAMIREZ

NOVIEMBRE DEL 2006

INFLUENCIA DE LOS REGULADORES DE CRECIMIENTO EN EL
ESTABLECIMIENTO in Vitro DE *Agave angustifolia* Haw.

TESIS

Sometida a la consideración del
Departamento de Agricultura y Ganadería

de la

Universidad de Sonora

Por

Guadalupe Ocampo Ramírez

Como requisito parcial para obtener
El grado de Maestro en Ciencias en Horticultura

Noviembre de 2006

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

MAESTRO EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

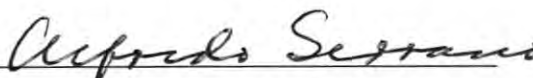
CONSEJO PARTICULAR

DIRECTOR:



M.C. DAMIAN MARTINEZ HEREDIA

ASESOR:



M.S. ALFREDO SERRANO ESQUER

ASESOR:



M.C. PATRICIO VALENZUELA CORNEJO

DEDICATORIA

A DIOS: Por todas las cosas maravillosas que me ha permitido realizar en la vida

A MIS PADRES:

FERNANDO Y ERNESTINA por tanto amor recibido de ellos y por ser el pilar de mi Vida.

A MI FAMILIA:

PATRICIO
LILIANA GUADALUPE
MANUEL
PATRICIA ELENA

A MIS HERMANOS:

SILVIA
FERNANDO
JOSE LUIS
JORGE
RUBEN ARTURO
CARLOS ENRIQUE
MARTÍN JAVIER
CECILIA

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Estudios Superiores del Estado de Sonora por las facilidades prestadas para la realización del presente trabajo.

Al Departamento de Agricultura y Ganadería de la Universidad de Sonora.

A la planta docente de la Maestría en Horticultura, especialmente a los integrantes del consejo de tesis.

A mis compañeros de trabajo, especialmente a Ing. Teresa Aguirre Fímbres e Ing. José Manuel Bernal Valenzuela por su valioso apoyo y colaboración en la realización del presente trabajo, así mismo a Lucía Josefina Preciado Gámez y Claudia Janeth Santacruz Madrid.

CONTENIDO

	Página
INDICE DE CUADROS.....	vii
INDICE DE FIGURAS.....	x
RESUMEN.....	xii
ABSTRACT.....	xiv
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. OBJETIVO.....	3
III. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA.....	4
Generalidades del género <i>Agave</i>	4
Historia del cultivo de <i>Agave</i>	4
Importancia económica.....	5
Agaves como fuente de bebida.....	6
Bacanora.....	7
<i>Agave angustifolia</i>	8
Reproducción de <i>Agave angustifolia</i>	9
Cultivo de tejidos vegetales.....	9
Macronutrientes.....	11
Nitrógeno.....	11
Fósforo.....	11
Potasio.....	11
Magnesio.....	12
Calcio.....	12
Cloro.....	12
Micronutrientes.....	13
Manganeso.....	13
Zinc.....	13
Boro.....	14
Cobre y Molibdeno.....	14
Cobalto.....	14
Agentes quelantes y fierro.....	15
Vitaminas.....	15

	Página
Reguladores de crecimiento.....	16
Efecto de las auxinas.....	17
Efecto de las citocininas.....	17
Aminoácidos y suplementos orgánicos.....	18
Fuente de carbono.....	18
Agua.....	18
Agentes solidificantes.....	19
Técnicas de esterilización y desinfección.....	19
Esterilización de los medios de cultivo.....	20
Autoclave.....	20
Esterilización por filtración.....	21
Desinfección del material vegetativo.....	21
Métodos y productos utilizados en la desinfección.....	22
Hipoclorito de sodio.....	22
Hipoclorito de calcio.....	23
Alcoholes.....	23
Fungicidas.....	23
Antibióticos.....	23
Micropropagación de Agaves.....	24
IV. MATERIALES Y METODOS.....	27
Localización.....	27
Material vegetativo utilizado.....	27
Explante.....	28
Desinfección del material vegetativo.....	30
Preparación de medio de cultivo.....	31
Siembra e incubación.....	32
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	34
Variables analizadas.....	34
Presencia de callo.....	34
Coloración verde claro.....	35
Coloración verde intenso.....	36
Presencia de brotes.....	37
VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	44
VII. BIBLIOGRAFIA.....	47

INDICE DE CUADROS

	<u>Página</u>
Cuadro 1.- Medio de Cultivo de Murashige y Skoog utilizado como medio básico, con nitratos reducidos a la mitad.	52
Cuadro 2.- Productos adicionados al medio de cultivo básico de Murashige y Skoog.	53
Cuadro 3.- Reguladores de Crecimiento utilizados en el medio de Cultivo de Murashige y Skoog.	54
Cuadro 4.- Proporciones de medias de las variable cada 10 días después de la siembra en los tratamientos 2,4-D/BA.	55
Cuadro 5.- Proporciones de medias de las variables cada 10 días después de la siembra en los tratamientos ANA/BA.	55
Cuadro 6.- Proporciones de medias de las variables cada 10 días después de la siembra en los tratamientos AIB/BA.	56
Cuadro 7.- Niveles de reguladores de crecimiento 2,4-D/BA	57
Cuadro 8.- Niveles de reguladores de crecimiento ANA/BA	58
Cuadro 9.- Niveles de reguladores de crecimiento AIB/BA	59
Cuadro 10.- Prueba de Tukey con un nivel de significancia de 5% para medir la Influencia del 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) y Benciladenina (BA) en la presencia de callo.	60

	Página
Cuadro 11.- Prueba de Tukey con un nivel de significancia de 5% para medir la Influencia del 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) y Benciladenina (BA) en la presencia de explantes verde claro.	61
Cuadro 12.- Prueba de Tukey con un nivel de significancia de 5% para medir la influencia del 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) y Benciladenina (BA) en la presencia de explantes verde intenso.	62
Cuadro 13.- Prueba de Tukey con un nivel de significancia de 5% para medir la influencia del 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) y Benciladenina (BA) en la presencia de brotes.	63
Cuadro 14.- Prueba de Tukey con un nivel de significancia de 5% para medir la influencia del Acido Naftalenacético (ANA) y Benciladenina (BA) en la presencia de callo.	64
Cuadro 15.- Prueba de Tukey con un nivel de significancia de 5% para medir la influencia del Acido Naftalenacético (ANA) y Benciladenina (BA) en la presencia de explantes verde claro.	65
Cuadro 16.- Prueba de Tukey con un nivel de significancia de 5% para medir la influencia del Acido Naftalenacético (ANA) y Benciladenina (BA) en la presencia de explantes verde intenso.	66
Cuadro 17.- Prueba de Tukey con un nivel de significancia de 5% para medir la influencia del Acido Naftalenacético (ANA) y Benciladenina (BA) en la presencia de brotes.	67
Cuadro 18.- Prueba de Tukey con un nivel de significancia de 5% para medir la influencia del Acido Indolbutírico (AIB) y Benciladenina (BA) en la presencia de callo.	68

	Página
Cuadro 19.- Prueba de Tukey con un nivel de significancia de 5% para medir la influencia del Acido Indolbutírico (AIB) y Benciladenina (BA) en la presencia de explante verde claro.	69
Cuadro 20.- Prueba de Tukey con un nivel de significancia de 5% para medir la influencia del Acido Indolbutírico (AIB) y Benciladenina (BA) en la presencia de explantes verde intenso.	70
Cuadro 21.- Prueba de Tukey con un nivel de significancia de 5% para medir la influencia del Acido Indolbutírico (AIB) y Benciladenina (BA) en la presencia de brotes.	71

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1.- Vivero de <i>Agave angustifolia</i> INIFAP, Moctezuma, Sonora.....	27
Figura 2.- Rancho Nuevo, Moctezuma, Sonora.....	28
Figura 3.- Limpieza de material vegetativo para la extracción de piñas de Agave.....	29
Figura 4.- Cilindro central de las cabezas de agave.....	30
Figura 5.- Material vegetativo desinfectado	31
Figura 6.- Siembra de material vegetativo	33
Figura 7.- Presencia de callo	35
Figura 8.- Explantes con coloración verde claro.....	36
Figura 9.- Explantes color verde intenso.....	37
Figura 10.- Influencia del 2,4-Diclorofenoxiacético y Benciladenina en la presencia de brotes.....	39
Figura 11.- Influencia del Acido naftalenacético y Benciladenina en la presencia de brotes.....	39
Figura 12.- Influencia del Acido indolbutírico y Benciladenina en la presencia de brotes.....	40
Figura 13.- Influencia del 2,4-Diclorofenoxiacético y Benciladenina en la presencia de brotes.....	41
Figura 14.- Influencia del Acido naftalenacético y Benciladenina en la presencia de brotes.....	42

Figura 15.-	Influencia del Acido indolbutírico y Benciladenina en la presencia de brotes.....	43
-------------	---	----

RESUMEN

El agave tiene una gran importancia económica, social y cultural, debido a los usos tan diversos que el hombre le ha dado de acuerdo con la necesidad y su capacidad se lo han permitido. El *Agave angustifolia* enfrenta hoy en día una crisis productiva por su excesiva explotación, dada la alta demanda del tequila denominado bacanora, tanto del interior como del exterior del país. La afectación y pérdida de plantas silvestres por la incidencia de plagas y enfermedades es resultado de la escasa investigación y transferencia de tecnología. También se ve afectado por una falta de estrategia sustentable para el mantenimiento e incremento de las escasas superficies de cultivo. Por todo lo anterior y con el propósito de desarrollar un método de propagación masiva se planteó el estudio de la influencia de los reguladores de crecimiento en el establecimiento in vitro de *Agave angustifolia*, directamente de explantes de la región meristemática de plantas silvestres de aproximadamente dos años de edad. Se utilizó el medio de Murashige y Skoog modificado con nitratos reducidos a la mitad de su concentración original y se evaluó la capacidad de respuesta del explante a cuatro niveles de citocininas, específicamente a Benciladenina: 0, 10, 15 y 20 mg l⁻¹ y a tres diferentes tipos de auxinas; Acido naftalenacético, 2-4 diclorofenoxiacético y Acido indolbutírico a niveles de 0, 0.025, 0.05 y 0.075 mg l⁻¹. La aparición de callo se presentó en la mayor parte de los tratamientos que se probaron, y su presencia empezó a ser visible a partir de las dos semanas de cultivo. En la aparición de callo en los explantes, el 2,4-D a bajas concentraciones (0.025 mg l⁻¹) influyó de manera directa en su formación; para ácido naftalenacético, el tratamiento que presentó un mejor comportamiento fue ligeramente mayor su concentración (0.05 mg l⁻¹) (superior al 2,4-D); en el caso de la aplicación de ácido indolbutírico esta fue aún mayor, (0.075 mg l⁻¹) para poder ejercer el mismo efecto.

Aunque fueron algunos los tratamientos que no mostraron diferencia significativa dentro de cada una de las auxinas que se probaron, indicando que fueron estas las que influyeron en la aparición de callo. La aparición de coloración verde claro en los explantes de médula, se presentó de manera general en todos los tratamientos, no se presentó un patrón de comportamiento en cuanto a la adquisición de esta coloración. Comportamiento muy similar se pudo observar en los tratamientos para la aparición de la coloración verde intenso, indicando en ambos casos que las auxinas y citocininas actúan ayudando a la aparición progresiva de estas coloraciones a las concentraciones manejadas en los 16 tratamientos. En el medio de cultivo donde se adicionó 2,4-Diclorofenoxiacético la respuesta a la formación de brotes, no mostró tendencia uniforme, encontrándose que el T13 (0 mg l⁻¹ de 2,4-Diclorofenoxiacético y 15 mg l⁻¹ de Benciladenina) fue el mejor, seguido del T7, T2, T3, T9, T15. Además en los tratamientos T7 y T15 (0.05, 20; 0 y 20 mg l⁻¹), respectivamente, se dio la presencia de brotes directamente de los explantes, sin pasar por la etapa de callo. Se observó que a concentraciones mayores se empezó a disminuir el crecimiento, llegando a causar en algunos casos toxicidad. En el caso en donde se aplicó Acido naftalenacético y Benciladenina, se pudo observar como mejores tratamientos en la aparición de brotes a T5, T4, T8, T16, no mostrando diferencia significativa entre ellos y siendo a los 40 días donde se presentó la mayor cantidad de explantes con brotes, aunque se vió una disminución a los 60 días que duró el experimento, ya que estos empezaron a mostrar una pérdida de vigor. La mayor presencia de brotes en el explante, en los medios de cultivo que contenían Acido indolbutírico y Benciladenina se presentó en los tratamientos T7, T3, T12, T1, T2, T9, T10 y T14, no mostrando diferencias significativas entre ellos, esto nos indica que la respuesta a la formación de brotes es muy amplia, respondiendo tanto a bajas como a altas concentraciones de Acido indolbutírico y de Benciladenina sin presentar ningún efecto de toxicidad en el explante.

ABSTRACT

The Agave has a great importance economic, social and cultural because so many uses as the man's need and capacity had allowed. Nowadays *Agave angustifolia* faces a productive crisis because of its excessive exploitation, due to the high demand of a tequila called bacanora, to the in and out of the country. The damage and loss of the wild plants for the incidence of pests and diseases are the result of the limited research and technology transference. It is also affected for a lack of sustainable strategy for the maintenance and increase of the limited cultivation surfaces. For all the previously mentioned it was planned at the present work the study of the growth regulators influence in the in vitro establishment of the Agave, directly of the explants of the meristematic region of two years old wild plants. A modified medium of Murashige and Skoog was used with nitrates that were reduced at the half of its natural original concentration and it was evaluated the response capacity of the explant at four levels of cytokinins specifically of Benciladenin: 0, 10, 15 and 20 mg l⁻¹ and three different types of auxins; naftalenacetic acid, 2-4 diclorofenoxiacetic and indolbutiric acid at levels of 0, 0.025, 0.05 and 0.075 mg l⁻¹. The appearance of callo was presented at most of the treatments that were tested, and its presence started to be visible at the two weeks of cultivation. The appearance of callo in the explants, the 2,4-D at low concentrations (0.025 mg l⁻¹) influenced its formation; with the naftalenacetic acid, the treatment that presented a better behaviour was a little greater concentration (0.05 mg l⁻¹) if it compare with 2,4-D; and in the case of the indolbutiric acid application it was also greater (0.075 mg l⁻¹) to have the same effect, perhaps there were many treatments that didn't show a significant difference into every each one of the auxins that were tested pointing that the callo. The appearance of the green light coloration in medulla explants, was generally present at all treatments, it wasn't a behaviour, acquisition of this coloration.

Similar behaviour was observed at the treatments with the intense green color apparition indicating in both cases that the auxins and citocinins perform helping the progressive of this colorations at the managed concentrations in the 16 treatments. In the culture medium was added 2-4- Diclorofenoxiacetic the response at the buds formation was very selective, finding that the T13 (0 mg l⁻¹ of 2-4-Diclorofenoxiacetic and 15 mg l⁻¹ of Benciladenin) was the best, following T7 and T15 (0.05, 20; 0 and 20 mg l⁻¹), respectively, was observed the presence of buds directly of the explant, without passing to the callo stage; at high concentrations growth decreased, leading to toxicity cases. In the case where Naftalenacetic acid and Benciladenine were applied, it was observed as better treatments in the bud apparition at T5, T4, T8, T16, no showing any significant difference between them and at the forty day more quantity of explant with buds were presented, although sixty day of the experiments, because they started to loose strength. The most buds in the explant, among the cultivation that contained Indolbutiric acid and Benciladenine, were presented in the treatments T7, T3, T12, T1, T9, T10 and T14, not showing any significative difference between them. This indicates that the respond to the bud formation is very weird, responding to the low and high concentrations of Indolbutiric acid and Benciladenine without showing any toxic effect in the explant.

INTRODUCCION

Las plantas de Agave han sido consideradas parte importante del Continente Americano, debido a que han jugado un papel esencial en las civilizaciones indígenas de mesoamérica (Ammirato et. al., 1990).

Los usos del agave son tan diversos como la necesidad y capacidad artística del hombre lo han permitido. Calle en 1965, después de analizar cientos de coprolitos (heces humanas momificadas), publicó evidencias irrefutables de que el género Agave fue el principal elemento de la dieta de los primeros mexicanos desde el 7000 A.C. hasta 1500 D.C. (Claridades Agropecuarias, 2000).

En Sonora una de las especies de agave que en la actualidad esta siendo mayormente explotada es el *Agave angustifolia*, de donde se obtiene una bebida conocida como bacanora, la cual tiene un sabor característico y a la planta la han denominado maguey de bacanora.

Este Agave enfrenta hoy día una crisis productiva por la gran demanda que existe del bacanora, debido a que ya ha sido aprobada su industrialización según publicación en el Diario Oficial de la Federación para que sea comercializado, dándole al Estado de Sonora la patente registrada de este producto (Núñez, 2000).

Debido a lo anterior, urge buscar estrategias sustentables para crear investigación y transferencia de tecnología en el establecimiento de superficie bajo cultivo, que nos genere un mejor aprovechamiento de las áreas en las zonas nativas de esta planta y, que se empiece a generar vinculación entre posibles productores de Agave, para que se promuevan esquemas de organización adecuados que involucren a todos los agentes de

las cadenas productivas para que de esta manera se vayan generando perspectivas para el futuro.

En el presente trabajo se plantea a la técnica de cultivo de tejidos vegetales para dar inicio a la reproducción masiva de plántulas de *Agave angustifolia*, probando diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento.

OBJETIVO

General

Desarrollar una metodología para la propagación de plántula de *Agave angustifolia*, por medio de la técnica de cultivo de tejidos vegetales.

Particular

Evaluar el efecto de diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento (auxinas y citocininas) en el medio de cultivo de Murashige y Skoog.

REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

Generalidades del género Agave

Los agaves son miembros de la familia Agavaceae, hay cerca de 20 géneros y 600 especies dentro de esta familia. El número mas grande de especies se encuentra en las áreas semidesérticas de los trópicos y subtropicos en ambos hemisferios. El género Agave es miembro de la familia de las Agavaceae del orden Asparagales y se encuentra dentro de las 45-50 familias de plantas consideradas como “suculentas” que sobreviven bajo condiciones de clima semiárido y árido, suelos con problemas de salinidad y/o sódicos, erosionados, pedregosos, sin árboles y con poco agua (Gaspar, 2002). Los agaves son plantas perennes o multianuales con las siguientes características: usualmente poseen rosetas (Córdova, 2000).de hojas suculentas, márgenes gruesos y espina puntiaguda. Los tallos son gruesos y pueden ser cortos y bien desarrollados. Las raíces son duras y fibrosas y rodeadas por una capa superficial. Las inflorescencias son altas y bracteríferas, escafoides, espigadas, racimosas o paniculadas. Las flores nacen dispuestas en racimos umbelados, son grandes y generalmente de forma cambiante, los frutos son dehiscentes, encapsulados, las semillas son comprimidas con pequeños embriones (Gentry, 1982).

Historia del cultivo de agave

Los agaves son únicos entre las plantas del continente americano, porque han jugado un papel importante en las civilizaciones indígenas de mesoamérica. Los primeros reportes históricos de los agaves en mesoamérica son las pictografías mexicanas sobre ruinas y en los códigos. Los hombres han usado agaves en Mesoamérica como fuente de alimento en los últimos 9000 años. Los principales géneros en la dieta de 700 A.C. a 1500 D.C. fueron: *Setaria*, *Agave*, *Cucurbita*, *Phaseolus*, *Capsicum*, *Amaranthus*,

Diospyros, y cerca de 5000 A.C., . maíz. Desde 7000 A.C. el uso de los agaves está documentado por especímenes arqueológicos, fibra para masticar, artefactos hechos de agave y las herramientas usadas en la manufactura de los mismos (Kolendo, 1996).

Las numerosas variedades y formas de especies de agave fueron seleccionadas a través de cientos de años por gente mesoamericana. Los usos de agaves son tantos como las manos artesanales del hombre ha encontrado conveniente. La gran diversidad genética en el género *Agave*, rico en su potencial viene de las manos de muchas gentes (Claridades Agropecuarias, 2000).

Importancia económica

Los agaves son fuente de alimento, bebidas, licor, azúcares, dulces, fibra, celulosa, papel para envoltura, para usos culinarios, farmacéuticos, saponinas, forraje para ganado, abrigo o protección y otros productos especiales (Ammirato *et. al.*, 1990).

En agaves la principal fuente de alimento es la suave, blanca y almidonada parte meristemática del tallo y la base de las hojas, excluyendo la porción verde (Robert *et. al.* 1991). El contenido de almidón y azúcar de estos órganos y también la palatabilidad, incrementan con la madurez de la planta. La floración de la mayoría de las especies es comestible cuando es joven, turgente y tierna. Cocinado o hervido el meristemo floral convierte el almidón en azúcares (Santacruz *et. al.*, 1999). Los pedazos gruesos de agave son molidos, el contenido de jugo es exprimido, el jarabe ó almibar es consumible, y la fibra de los trozos gruesos es desechada. La cabeza de agave cocinada (cocida), el tallo conteniendo la base de las hojas y excluyendo la porción verde, es una fuente de un jarabe con un alto contenido de fructosa, el jarabe es también usado para preparar dulces y bebidas (Nobel, 1998).

Otra fuente de alimento son las flores de algunas especies de *Agave*, revuelto con huevo o hervidas. La cutícula desprendida de una hoja de *Agave atrovirens*, ó mixiote en nahuatl, es usada como papel de envoltura culinaria, esto forma una hoja resistente y

traslúcida que se mira como plástico de polietileno y es usado como una envoltura para el cocimiento de alimentos. Esta práctica es común en la región central de México (Nobel, 1998).

El aguamiel fuente de energía de varias especies de agave es usado para hacer vinagre, pulque, (bebida obtenida por fermentación de aguamiel), misma que es usada para hacer pan y como un condimento en la elaboración de salsas lo cual le dá un sabor distintivo. El pulque por destilación produce alcohol (Ammirato et.al., 1990).

El agave es una fuente de forraje para ganado. Las hojas verdes, frescas de *A. salmiana* y *A. atrovierens*, después de removerse la espina terminal y las marginales, son cortadas en pedazos gruesos y se dán como alimento al ganado. Estos agaves además son usados para la producción de pulque en la región central de México. Después de que se les ha sacado el líquido las hojas son cortadas y secadas para alimento del ganado (Das, 1992).

En Yucatán el bagaso y la pulpa del henequén de *A. fourcroydes* dejado por la molienda de la fibra, son usados también como forraje para ganado. El bagaso es deficiente en N, P, Co, Zn, Cu y Fe. La digestibilidad de ambos, bagaso y pulpa, es considerada alta, de un 50 a 60%. Sin embargo, el crecimiento del ganado basado en la dieta de productos del henequén suplementado con Urea es pobre. Suplemento de proteína, 40% de pulpa en la dieta, es necesario para obtener diariamente incrementos en pesos de hasta 1 kilogramo (Harrison, 1981, citado por Gaspar, 2002).

Agaves como fuente de bebida

Varias clases de Agave son cultivadas para la producción de bebidas tales como aguamiel, pulque, tequila, mezcal y bacanora. Las especies mas importantes son: *A. atrovirens* Karw, *A. tequilana* Weber, *A. potatorum* Zucc., *A. cochlearis* Jacobi y *Agave angustigolia*.

La principal y más importante característica de las especies de *Agave* usadas para la producción de bebidas es la composición de carbohidratos. Una notable alta producción de fructosa y polifruktócidos es común en estas especies. En el jarabe derivado de estos *Agaves*, la concentración de fructosa fluctúa en rangos de 70 a 92%. (Robert *et. al.*, 1991).

Bacanora

El bacanora es una bebida obtenida mediante la cocción, fermentación y destilación de las cabezas de *Agave angustifolia*, conocida comúnmente como maguey de bacanora, tomando este nombre de un pueblo situado en la sierra de Sonora (Nuñez, 2001).

El bacanora es de color transparente, de olor y sabor característicos. Actualmente en Sonora no se están llevando a cabo plantaciones de maguey a nivel comercial, por lo que, todo el maguey que es empleado en la elaboración de bacanora es necesariamente silvestre y no existe a la fecha ningún control para su industrialización (Canizalez, 1995).

Lo que se puede afirmar es que el bacanora se constituye como parte de la tradición sonorenses, en el sentido de que este mezcal, típico de un agave o maguey que se reproduce en el clima y topografía de Sonora, este licor es mencionado por los primeros colonizadores que llegaron a Sonora como una bebida que los indígenas consumían en sus celebraciones, por lo tanto esta bebida es rural, puesto que su materia prima se da en los cerros y arroyos.

Los habitantes conocedores de las áreas rurales, dicen que es de mejor calidad el mezcal que se obtiene de magueyes creciendo a pleno sol, que aquel que se desarrolla en lugares sombreados (Nuñez, 2001)

Dentro de las tradiciones de los vaqueros de la sierra, siempre hay un antecesor en la familia que les enseñó como producirlo. A los productores se les llama comúnmente

vinateros, mismos que prácticamente viven de esta actividad y en época de prohibición eran como personajes legendarios.

Hay vinateros que acostumbran agregarle otros ingredientes como uvalamas, orejones de frutas y cáscaras de naranja. A esta variedad o combinación se le llama curado, que para mucha gente no es el auténtico bacanora sonorense.

La infraestructura para procesar este mezcal sonorense es rudimentaria, pues consiste en primero hacer un hoyo en la tierra, donde se colocan los corazones de maguey para su cocción. Terminando este proceso, se trasladan a tambos de 200 litros. Allí deben de ser machacados, para que suelten su jugo, que después pasa a otro recipiente o tambo montado sobre una hornilla. De ahí sale una serpentina que va y se conecta a otro tambo lleno de agua fría. Pasando por el agua fría, del vapor que viene de donde se está cociendo el corazón de maguey sale el mezcal.

Así ésta bebida autóctona, a la que los ópatas llamaban serequi cuando era bueno y soyate al de mala calidad, tiene gran arraigo dentro de la población sonorense, sobre todo a partir de las reformas a la Ley de Alcoholes del Estado de Sonora, hace apenas unos años que establecieron la legalidad de su producción motivando que actualmente pueda adquirirse en el comercio el bacanora ya embotellado .(Canizalez, 1995).

Agave angustifolia

El *Agave angustifolia* se encuentra distribuido en el Estado de Sonora, creciendo en regiones donde la precipitación pluvial se encuentra alrededor de los 150 mm, la mayor población de esta especie se encuentra en las zonas serranas del estado, Nácori Chico, Bacadéhuachi, Huásabas, Sahuaripa, Arivechi, Tesopaco, Valle de Tacupeto, Bacanora y Alamos (Nuñez, 2001).

El *A. angustifolia* es una planta perenne, acaulescente, de dimensiones cercanas a 1.5 metros de alto, por 1.5 metros de diámetro. Sus pencas son de 50 a 120 cm de largo y de

4 a 8 cm de ancho, siendo sus espinas terminales muy filosas. Los bordes de las pencas están cubiertas por una serie de dientes pequeños y rígidos (Shreve, 1963; citado por Nuñez, 2001).

Reproducción de *Agave angustifolia*

La reproducción natural de *A. angustifolia*, al igual que todos los agave, puede llevarse a cabo de dos formas: sexual y asexual. La reproducción asexual puede efectuarse de 2 maneras: por medio de hijuelos, que nacen en la base y alrededor de las plantas mas grandes y, mediante bulbillos que se desarrollan a partir de los meristemos axilares en la inflorescencia, después de la floración (Eastmond et. al., 2000).

De cualquiera de las dos maneras, las plántulas son genéticamente igual a la planta madre, mismos que pueden ser trasplantadas y generar una nueva planta. La reproducción sexual es muy rara bajo condiciones naturales, debido a que los factores ambientales de las zonas desérticas son muy extremosos, sobre todo la temperatura de la superficie del suelo, la cual puede alcanzar los 65°C, esto limita la germinación de las semillas, aunque las condiciones de humedad en el ambiente sean las adecuadas (Nobel et. al., 1998).

La reproducción asexual como método de propagación es considerado como lento, debido a que la planta empieza a reproducir hijuelos a la edad de 3 años produciendo en promedio 6 plántulas por cada planta adulta y los bulbillos requieren aproximadamente de 7 años para su aparición. (Binh et. al., 1990).

Cultivo de tejidos vegetales

El cultivo de tejidos vegetales se refiere al cultivo *in vitro* de todas las partes de la planta bajo condiciones asépticas, ya sea una célula, un tejido o un órgano. Estas técnicas tienen gran potencial como una herramienta en estudios básicos y aplicados en la micropropagación de especies económicamente importantes y como un modelo, que

permite hacer estudios fisiológicos, bioquímicos, genéticos y morfológicos (Hurtado y Merino, 2000).

Los principios fundamentales implicados en el cultivo de tejidos vegetales son muy sencillos, es necesario aislar fragmentos de tejidos u órganos de una planta completa (Smith, 2000) y proporcionarles un medio ambiente apropiado, en el cual puedan expresar su capacidad intrínseca o inducida (López, 1985).

El éxito del cultivo de tejidos de plantas como un método de micropropagación para estudios morfológicos, mejoramiento genético y crecimiento de células para diversos tipos de estudios, está muy influenciado por la composición química de los medios de cultivo utilizados, y otros parámetros ambientales, (Miller y Murashige, 1976).

Para un crecimiento vigoroso y saludable, las plantas necesitan tomar del suelo relativamente grandes cantidades de iones inorgánicos (macro y micronutrientes). La composición del medio de cultivo es un factor de gran importancia en el éxito del establecimiento de un cultivo, (Murashige, 1974). Cada tipo de tejido requiere de una formulación nutritiva dependiendo del objetivo, ya sea un crecimiento óptimo, inducir el desarrollo de órganos como brotes o raíces (organogénesis), inducción de embriones (embriogénesis), etc. (Pierik, 1990).

Para un crecimiento vigoroso y saludable existen diversas formulaciones químicas desarrolladas por distintos autores para los requerimientos particulares de un tejido en cultivo.

Un medio basal consiste en una mezcla balanceada de macronutrientes (sales de nitrógeno, potasio, calcio, fósforo, magnesio y azufre), micronutrientes (sales de hierro, manganeso, zinc, boro, cobre, molibdeno y cobalto), una fuente de carbono (principalmente sacarosa) y vitaminas. Además se adicionan otros factores orgánicos del crecimiento (aminoácidos, ureas y peptonas) y reguladores del crecimiento (George, 1993).

Los medios de cultivo en general se encuentran constituidos por los siguientes componentes: Sales inorgánicas (macro y micronutrientes)

Macronutrientes

Nitrógeno

El nitrógeno se adiciona en grandes cantidades, se encuentra en forma de nitrato o iones de amonio o la combinación de ambos iones. Tanto para el crecimiento como para la morfogénesis, (Rodríguez, 1995) los cultivos vegetales están marcadamente influenciados por la disponibilidad del nitrógeno y la forma en que éste se presente en el medio. Comparando con el ión nitrato NO_3^- (es la forma altamente oxidada del nitrógeno), el ión amonio, NH_4^+ es la forma mas reducida. Las plantas utilizan nitrógeno reducido para su metabolismo, y dentro de la planta el nitrógeno existe casi en su mayor parte en la forma reducida (George, 1993).

Fósforo

El fósforo es un elemento vital en la bioquímica de la planta y se encuentra en compuestos que están presentes en la transferencia de energía, proteínas y síntesis de ácidos nucleicos y, también contribuyen en la estructura de estos últimos. El fósforo es absorbido por la planta en forma de iones de fosfato por un proceso activo que requiere gasto de energía. En los medios de cultivo actuales este elemento se utiliza como $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ó KH_2PO_4 (López, 1985).

Potasio

Los iones de potasio son rápidamente transportados a través de las membranas y dos de sus funciones mas importantes son regular el pH y el ambiente osmótico dentro de las células.

La mayoría de las proteínas muestran una alta especificidad por el potasio, el cuál actúa como cofactor que altera su configuración y de esta manera se convierten en enzimas activas. Los iones de potasio también neutralizan los aniones orgánicos

producidos en el citoplasma, estabilizando el pH y el potencial osmótico. La deficiencia de potasio en las plantas da como resultado pérdida de la turgencia celular, flacidez de tejidos y un incremento en la susceptibilidad a la sequía y la salinidad (George, 1993).

Magnesio

Es un componente esencial de la molécula de clorofila, también es requerido para la actividad de muchas enzimas, especialmente aquellas necesarias en la transferencia de fosfato; al igual que el potasio es un catión que contribuye en el balance y neutralización de ácidos orgánicos. Los medios de cultivo contienen relativamente baja concentración de magnesio. Con frecuencia, el $MgSO_4$ es usado como fuente única de iones de magnesio y sulfato (Santa Cruz, 2003).

Calcio

Como catión mayor, el calcio auxilia en el balance de aniones dentro de la planta, pero a diferencia del potasio y el magnesio, este no es muy transferible. Por su capacidad para unir moléculas biológicas, este elemento está relacionado con la estructura y propiedades fisiológicas de las membranas celulares y la lámina media de las paredes celulares. La enzima B-(1-3)-glucan sintetasa depende de los iones de calcio, y la síntesis de celulosa en cultivo de células no ocurre a menos que existan cantidades micromolares de Ca^{++} en el medio. Muchas otras enzimas son calciodependientes y el calcio es un cofactor de las enzimas responsables de la hidrólisis de ATP (Preciado, 2003)

El calcio es necesario en la morfogénesis *in vitro* y se requiere en muchas respuestas inducidas con reguladores del crecimiento (auxinas y citocininas). La deficiencia de calcio en las plantas se expresa con un pobre crecimiento de raíces, y obscurecimiento de los márgenes de las hojas apicales seguido de necrosis de brotes.

Cloro

El ión cloro (Cl) es esencial para el crecimiento de las plantas, pero parece ser necesario en pocas reacciones y solo en muy pequeñas cantidades. El ión cloro es

transportado libremente y muchas plantas pueden tolerar altas concentraciones sin mostrar toxicidad. El principal papel del cloro parece ser el de mantener la turgencia y equilibrar los cambios rápidos del nivel de cationes como K^+ , Mg^{++} y Na^+ . Las plantas privadas de Cl^- son susceptibles a marchitarse.

Micronutrientes

Los requerimientos de micronutrientes por los vegetales fueron establecidos hace algunos años, en el inicio de los primeros experimentos con cultivo de tejidos vegetales, muchos cultivos tuvieron éxito gracias a que los medios fueron preparados a partir de reactivos no muy puros, o solidificados con agar, el cual también proveía una fuente oculta de micronutrientes (Gaspar, 2002)

En primera instancia, la ventaja de añadir varios micronutrientes al medio de cultivo, fue en su mayor parte evaluada por la capacidad de los elementos individuales para mejorar el crecimiento del tejido indiferenciado (callo), o cultivo de raíces aisladas.

Los micronutrientes esenciales Fe, Mn, Cu, Co, y Mo son componentes de proteínas de células vegetales de importancia metabólica y fisiológica. Por lo menos estos cinco elementos son necesarios para la síntesis de clorofila y para la función de los cloroplastos; además tienen importancia en la función del aparato génico y varios están involucrados en la actividad de sustancias de crecimiento.

Manganeso

Es uno de los micronutrientes más importantes y ha sido incluido en la mayoría de los medios de cultivo; tiene propiedades químicas similares al Magnesio y aparentemente es capaz de sustituirlo en algunos sistemas enzimáticos.

Zinc

Las plantas deficientes en zinc sufren de actividad enzimática reducida y de una consecuente disminución de proteínas, ácidos nucleicos y síntesis de clorofila. Las

plantas deficientes en molibdeno y zinc tienen un bajo contenido de clorofila y un desarrollo pobre de cloroplastos (Preciado, 2003).

Boro

Es requerido en el metabolismo de ácidos fenólicos, biosíntesis de ligninas; también es necesario en el mantenimiento de la actividad meristemática, ya que forma parte de la síntesis de bases nitrogenadas (uracilo en particular), requeridas en la síntesis de ARN. También se piensa que tiene lugar en el mantenimiento de estructuras y función de membranas, posiblemente estabilizando quelatos metálicos naturales, que son importantes en la estructura y función de las membranas (George, 1993).

Cobre y Molibdeno

El cobre es un micronutriente esencial, aún cuando las plantas normalmente contienen solo unas pocas partes por millón de este elemento. El elemento se une a enzimas, muchas de las cuales reaccionan con oxígeno. Las altas concentraciones de cobre pueden ser tóxicas.

Las plantas utilizan molibdeno hexavalente y se absorbe como molibdato (MoO_4^-). Este se añade al medio en forma de molibdato de sodio en concentraciones de 1 micromolar.

Cobalto

La concentración más comúnmente usada es de 0.1 micromolar, aunque se ha llegado a usar una cantidad 10 veces mayor. El cobalto es el elemento componente de la vitamina B12, la cual se involucra en la síntesis de ácidos nucleicos, pero es difícil encontrar evidencia de que el elemento tenga alguna acción estimuladora marcada en el crecimiento o en la morfogénesis (Gaspar, 2002)

La ventaja de adicionar cobalto al medio de cultivo, puede radicar en el hecho de que este elemento tenga alguna acción protectora en contra de la toxicidad quelante del metal

y en que es capaz de inhibir reacciones oxidativas catalizadas por iones de cobre y fierro.

Agentes quelantes y fierro

Son compuestos orgánicos que son capaces de formar complejos con cationes metálicos, en los cuales el metal es sostenido por medio de enlaces. Los complejos pueden tomar forma lineal o de anillo y éste último caso recibe el nombre de quelato. Los metales pueden ser unidos (o secuestrados) por agentes quelantes y mantenerlos en solución en condiciones donde como iones libres reaccionarían con aniones a compuestos insolubles, y algunos complejos pueden ser mas químicamente reactivos que los metales por sí mismos (Santacruz, 2003).

El fierro es un micronutriente esencial que tiende a precipitarse en la presencia de otros iones. Particularmente con el Ca^{++} . Por esta razón el sulfato ferroso debe introducirse al medio en solución con un agente quelante (el cual es comunmente EDTA, ácido etilendiaminotetraacetico) (Jona y Menini, 1987; citados por George, 1993).

Vitaminas

Son necesarias para llevar a cabo una serie de reacciones catalíticas en el metabolismo y son requeridas en pequeñas cantidades (Pierik, 1990).

Las plantas normales sintetizan las vitaminas necesarias para su desarrollo. Cuando se cultivan células de plantas superiores algunas vitaminas pueden encontrarse limitadas, el crecimiento y la supervivencia pueden mejorarse por la adición de éstas al medio de cultivo.

Las vitaminas mas frecuentemente usadas en los medios de cultivo son la tiamina (B1), el ácido nicotínico (niacina) y la piridoxina (B6). Además de estos tres componentes y el myo-inositol, no existe acuerdo sobre cuales otras vitaminas son realmente esenciales (Gamborg, 1984).

La tiamina es un cofactor esencial en el metabolismo de los carbohidratos y está directamente involucrada en la biosíntesis de algunos aminoácidos.

El myo-inositol, también denominado meso-inositol e i-inositol, no es una vitamina propiamente, sino un azúcar alcohol. Tiene un efecto estimulante sobre la morfogénesis y ayuda a la formación de varios constituyentes celulares como el ácido ascórbico y la pectina, además de otros compuestos que intervienen en la división celular (López, 1985).

Reguladores de crecimiento

Las hormonas por definición son compuestos orgánicos naturalmente sintetizados por las plantas superiores, tienen influencia sobre el crecimiento y desarrollo; están presentes en relativamente pocas cantidades, además de estas, se han desarrollado otros compuestos sintéticos que corresponden con los naturales y se llaman colectivamente reguladores del crecimiento (Pierik, 1990).

Las concentraciones de reguladores del crecimiento en el medio de cultivo son críticas para controlar el crecimiento y morfogénesis. Generalmente, una concentración alta de auxinas y una concentración baja de citocininas en el medio promueven una proliferación celular abundante y desorganizada conocida como callo. Por otra parte, en la mayoría de los sistemas vegetales se tiene que una alta concentración de citocininas combinada con una baja concentración de auxinas da lugar a la inducción de brotes.

Las auxinas solas son útiles en la obtención de raíces; del mismo modo, es posible inducir embriogénesis somática con un balance apropiado de reguladores del crecimiento. (Pierik, 1990)

Existen cuatro grandes clases de reguladores del crecimiento de importancia en cultivo de tejidos vegetales: Auxinas, Citocininas, Giberelinas y Acido Absisico.

Efecto de las auxinas

El 2,4-D es una auxina de alta eficacia que ha mostrado estimular la proliferación de callos, tanto en ausencia de citocininas como en combinación de éstas. Se sugieren tres posibilidades para explicar su mecanismo de acción.

- a) Que el 2,4-D actúa primeramente como auxina y secundariamente estimula la síntesis de citocininas.
- b) Que las citocininas no necesariamente causan división celular, si no que incrementan la sensibilidad del tejido a reacciones estimuladas por el 2,4-D.
- c) Que el 2,4-D actúa como citocinina además de actuar como auxina. Sin embargo, se menciona también que la tercera posibilidad no explica que aplicando únicamente 2,4-D no se estimula la brotación, mientras que la segunda posibilidad sí merece ser considerada seriamente, puesto que existen citocininas débiles como la adenina, la metiladenina o la etiladenina que para expresar su actividad requieren de la presencia de una auxina de alta eficacia como ANA o el 2, 4-D.

Por sí solas, las auxinas controlan la elongación celular, tropismo, activación cambial y diferenciación vascular, dominancia apical, senescencia y abscisión (Gaspar, 2002).

Efecto de las citocininas

Por sí solas, las citocininas controlan la morfogénesis y la senescencia, además de promover la división celular. Juegan un papel en todas las fases del desarrollo, desde la división y alargamiento celular, hasta la formación de flores y frutos, afectan el metabolismo incluyendo la biosíntesis de factores del crecimiento, influyen en la aparición de organelos y el flujo de asimilados a través de la planta; aumentan la resistencia a factores ambientales; además influyen sobre la síntesis de enzimas y sobre la actividad de las mismas,

Las citocininas son derivados de adenina y juegan un papel importante en la inducción de brotes. Las citocininas mas usadas son la cinetina, benciladenina (BA),

zeatina, 6-(3 metil-2 butenil 1 aminopurina) (ZiP) y ácido paraminobenzoico (APB) (Gamborg, 1984).

Existe un gran número de respuestas de las plantas a las citocininas como el hecho de que determinan la orientación del crecimiento; promueven la actividad cambial y el desarrollo del xilema, probablemente inducen las primeras fases de la embriogénesis somática; promueven la formación y ubicación de raíces laterales; inducen el transporte, acumulación y reserva de metabolitos, incrementan la tasa transpiratoria promoviendo la apertura estomática, etc. (Gaspar, 2002)

Aminoácidos y suplementos orgánicos

El uso de aminoácidos como una fuente de nitrógeno orgánico no es requerida generalmente en los medios modernos que cuentan con un balance equilibrado de $\text{NO}_3/\text{NH}_4^+$, garantizando el abastecimiento de nitrógeno (Pierik, 1990). Sin embargo en algunos casos específicos sobre todo de morfogénesis son requeridos por ciertas especies.

Fuente de carbono

La sacarosa es la mejor fuente de carbono, seguida de la glucosa, maltosa y rafinosa; la fructosa es menos efectiva que las anteriores mientras que la manosa y la lactosa son las menos recomendadas.

Agua

Se debe de poner gran atención a la calidad de agua, ya que el 95% de la composición del medio es agua. La purificación del agua es llevada a cabo generalmente por destilación, por intercambio de iones y por ósmosis inversa; en ocasiones estos dos últimos procesos son combinados y otros usan doble destilación (Smith, 2000).

Agentes solidificantes

Aún cuando los cultivos vegetales pueden crecer en medio líquido, el mantener los explantes en la superficie de un medio sólido presenta ventajas. El agar para este propósito, fue el primero en usarse. Se ha empleado el agar como un ingrediente en la preparación de medios sólidos y semisólidos (Gaspar, 2002).

Las ventajas que presenta el agar son

- Con agua el agar forma geles que se derriten a 100°C y se solidifican a 45°C. Esto significa que este gel es estable a todas las temperaturas de incubación.
- El agar no es digerido por las enzimas de las plantas
- El agar no reacciona con los constituyentes del medio.

Las concentraciones de agar comúnmente utilizadas son de 6 a 8%. Existen en el mercado diversas marcas y grados de pureza de agar y otros agentes gelificantes que difieren tanto en sus cantidades de impurezas como en sus capacidades gelificantes; algunos ejemplos son; Agar lavado, Transgel (para adaptación de in vitro a suelo), GELAN GUM (Phytigel), Agargel (consiste en una mezcla de agar y phytigel), y Agarosa (mas cara y no muy frecuentemente usada). Algunos autores han usado gelatina y almidón (Vivas, 1995).

Otros materiales han sido utilizados como sostén, tales como plataformas de discos de papel filtro, discos de papel filtro impregnados de solución nutritiva, discos millipore han sido utilizados para absorber exudados de cultivo (López, 1985).

Técnicas de esterilización y desinfección

Las plantas invariablemente se encuentran infestadas de manera externa por un elevado número de microorganismos (hongos, bacterias, levaduras, plagas, etc). Estos organismos pueden estar presentes sobre toda la superficie externa y pueden también encontrarse en pequeñas grietas, entre yemas escamosas y bajo estípulas y lígulas.

Normalmente no son patógenos, sin embargo, cuando el tejido u órgano es cultivado *in vitro* en un medio enriquecido, el crecimiento de los microorganismos es acelerado a un grado tal que puede limitar el desarrollo de las células o brotes (Pérez *et. al.*, 1999).

Es siempre muy importante asegurarse que los explantes sólo sean tomados de plantas vigorosas y sin síntomas de enfermedades. Aún tomando estas precauciones, hay plagas o microorganismos sistémicos, los cuales sólo pueden ser detectados y eliminados más tarde en el cultivo por medio de elaborados procedimientos. Por estas razones, es necesario remover los microorganismos superficiales del material vegetativo con desinfectantes químicos antes de iniciar un cultivo *in vitro* y, manejar los tejidos en condiciones asépticas en una cámara de flujo laminar de aire y/o en áreas limpias específicas para este propósito (Loera, 1995).

Así todos los medios de cultivo, contenedores e instrumentos utilizados en el manejo de explantes deben esterilizarse para matar las células vegetativas, esporas y otras estructuras reproductivas de los microorganismos, que son los causantes de la contaminación de los cultivos *in vitro*. Asimismo, la limpieza y una organización eficiente del laboratorio contribuyen a reducir el riesgo de la diseminación de la contaminación.

Esterilización de los medios de cultivo

Autoclave

La mayor parte de los medios nutritivos se esterilizan en autoclave. Este aparato esteriliza por medio de vapor. Siempre que el tiempo de exposición sea suficiente, el vapor a presión puede destruir todos los microorganismos. El autoclave tiene un rango de temperaturas entre 115 y 135°C. La esterilización depende de: Tiempo, presión, temperatura y el volumen del objeto que se va a esterilizar. Las ventajas del autoclave son: velocidad, simplicidad, destrucción adicional de los virus y no adsorción (cosa que ocurre con la esterilización por filtrado). Las desventajas son: producen un cambio en el pH, algunos componentes se pueden separar, y producen reacciones químicas, que

pueden conducir a una pérdida de actividad de los componentes del medio (Pierik, 1990).

Esterilización por filtración

En la esterilización por filtración (las soluciones, medios líquidos, etc., pasan a través de un filtro de membrana); son retenidas todas las partículas, microorganismos y virus que son mayores que el correspondiente poro del filtro. La mayor ventaja de este método es que las sustancias termolábiles (que se descomponen durante el autoclaveado), pueden pasar a través del filtro sin sufrir ninguna modificación. Las desventajas pueden ser: Adsorción de sustancias en el filtro, algunos virus pueden atravesar el filtro y también que el procedimiento consume mas tiempo y no es tan sencillo con el autoclaveado. La esterilización por filtrado se utiliza generalmente cuando se quiere añadir a un medio nutritivo una sustancia termolábil (Gaspar, 2000)

Desinfección del material vegetativo

Para la gran mayoría de cultivos, la contaminación superficial debe ser eliminada antes de que el explante sea sembrado *in vitro*. La facilidad con la cual esto puede ser logrado depende de la especie y del ambiente en el cual la planta madre se ha desarrollado.

En climas templados, la contaminación varía de acuerdo a la estación, siendo mas intensa en primavera y verano; en los trópicos puede ser un problema en cualquier época del año.

Como regla general, los explantes duros tales como semillas, frutos o secciones de tallo, pueden ser desinfectados sin ser dañados por el procedimiento de desinfección, mientras que los tejidos suaves y delicados sí pueden ser dañados. Explantes delicados, tales como meristemos u óvulos inmaduros, los cuales están dentro de cubiertas protectoras, están con frecuencia libres de contaminantes. Una vez que las estructuras que los contienen han sido desinfectadas, pueden ser depositadas directamente en el medio de cultivo.

Partes de la planta que crecen en o cerca del suelo son difíciles de desinfectar. La estructura de otros explantes también puede ser problemática, por ejemplo, es difícil desinfectar yemas apicales de especies pubescentes y viscosas ya que estas características impiden la penetración del agente desinfectante.

Las semillas generalmente son fáciles de desinfectar y son además un punto de inicio conveniente para el trabajo experimental del cultivo *in vitro*. Después de la desinfección superficial, pueden crecer en medio con reguladores de crecimiento y dar origen a callo directamente, o pueden crecer en medio sin reguladores y originar plántulas libres de contaminantes, las que manejadas en condiciones de total asepsia pueden ser usadas como explantes (George, 1993).

Métodos y productos utilizados en la desinfección

Los métodos y productos necesarios para una desinfección efectiva del material vegetativo, así como las concentraciones y los tiempos de desinfección varían de acuerdo a: especie, condiciones en que se desarrolla la planta madre y al tipo de tejido o explante que será utilizado (Smith, 2000).

Estructuras subterráneas tales como raíces, tubérculos y bulbos deberán ser lavadas con agua corriente y jabón para remover partículas de tierra que pudieran tener, o sumergirlas por algunas horas en agua conteniendo un agente humectante (detergente líquido). Asimismo, es necesario remover el tejido muerto que pudieran presentar. Esto puede ayudar a reducir el nivel de contaminantes superficiales y permitir que los microorganismos queden en contacto directo con los agentes desinfectantes.

La desinfección superficial puede efectuarse con diversos agentes. Los mejores a elegir son aquellos que son mas baratos, no tóxicos y efectivos para un amplio rango de material vegetal. Los productos mas utilizados en la desinfección son:

Hipoclorito de Sodio: El ión hipoclorito se obtiene generalmente de hipoclorito de sodio, es el agente mas usado en la desinfección. La concentración requerida puede

variar de 0.25 a 2% peso volumen (p/v), dependiendo del material vegetal utilizado y del tiempo de exposición. Estas concentraciones equivalen de 5 a 29% volumen volumen (v/v) de blanqueador doméstico, dependiendo del producto comercial empleado (Smith, 2000).

Hipoclorito de calcio. Es menos utilizado que el de sodio, pero frecuentemente es mas barato. Las concentraciones requeridas son similares a las utilizadas con hipoclorito de sodio. Para ambos desinfectantes se utiliza generalmente un rango de exposición de 3 a 10 minutos (Powers y Backhaus, 1989).

Alcoholes. Entre los alcoholes, el etanol es el mas comúnmente usado para desinfección, pero muy raramente un explante puede desinfectarse solo con etanol. Generalmente, antes de poner el material vegetativo en contacto con el agente desinfectante, éste se sumerge en etanol por algunos segundos, con lo cual se eliminan las grasas y otros compuestos que pudieran impedir una adecuada penetración del desinfectante. La duración del tratamiento varía de acuerdo al tipo de explante y al tipo de microorganismo que se desea eliminar.

Fungicidas. Los fungicidas son utilizados como parte del método de desinfección, sumergiendo el material vegetal por ciertos períodos de tiempo, mismo que dependerá de las condiciones de cultivo del tejido vegetal que es la fuente de explante. Además que sustancias químicas fungicidas pueden ser adicionadas al medio de cultivo cuando es necesario el control de contaminantes sistémicos (Santa Cruz, 2003).

Antibióticos. Los antibióticos algunas veces son usados para remover o controlar microorganismos, los cuales se presentan en cultivos *in vitro* por establecer o ya establecidos. También se utilizan para remover contaminantes superficiales de explantes (Loera, 1995).

Micropropagación de Agaves

La micropropagación es una tecnología que se emplea en la obtención de plántulas para el establecimiento de cultivos. Varios estudios se han realizado para probar la eficacia de estas técnicas, particularmente con el género *Agave* y todos ellos con resultados exitosos (Armenta, 2002).

El primer dato de regeneración controlada *in vitro* fue reportado por White en 1939. El observó la formación de callos en plantas del híbrido *Nicotiana glauca* por *Nicotiana langsdorffii* cuando fueron cultivados en medio líquido. En el mismo año, Nobercourt reportó la formación de raíces en callos de zanahoria (Gaspar, 2002).

Las especies de *Agave* que más se han estudiado son aquellas que tienen valor comercial, por ejemplo las empleadas en la producción de fibra como *A. fourcroydes* Lem., *A. sisalana* y *A. cantala* Robx (Binh *et. al.*, 1990).

También se ha intentado propagar aquellas especies que ecológicamente son importantes y que además se encuentran bajo algún régimen de protección ambiental como *A. arizonica* en Estados Unidos (Gentry y Weber 1982, citados por Powers y Backhaus, 1989).

En algunos agaves como *Agave sp*, *Sansevieria trifasciata*, *A. sisalana* y *A. fourcroydes*, se ha logrado una multiplicación vegetativa por cultivo de meristemos; sin embargo, no existe aún ningún reporte sobre la obtención de plantas a partir del cultivo y rediferenciación de células aisladas, ya sea células en suspensión ó protoplastos (García y Robert, 1985, citados por Cruz *et. al.*, 1985).

En 1990, Binh y colaboradores desarrollaron un procedimiento de rápida propagación *in vitro* de Agavaceas, donde los explantes fueron cortados de estolones de plántulas y cultivados en medio de Murashige y Skoog con 2% sacarosa, 10% agua de coco, 8% agar y combinaciones de reguladores de crecimiento auxinas y citocininas.

En *Agave atrovierens* se han llevado a cabo estudios para implementar un sistema de micropropagación utilizando plantas de seis meses de edad y empleando el medio de Murashige y Skoog, suplementado con tiamina, inositol, cisteína, sacarosa, agar y diferentes concentraciones de auxinas y citocininas (Roca y Mroginski, 1991).

Das, 1992, realizó micropropagación a gran escala de *A. sisalana* a partir de rizomas y de hojas inmaduras, de material crecido bajo condiciones controladas de invernadero, utilizando el medio de cultivo de Murashige y Skoog y el de Schebk y Hildebrandt, con 3% sacarosa, 6% agar, vitaminas y distintas concentraciones de benciladenina, obteniendo exitosos resultados.

Santacruz – Ruvalcaba y colaboradores 1999 llevaron a cabo el desarrollo de un eficiente método de propagación *in vitro* de *Agave parrasana* Berger, importante planta ornamental nativa del Estado de Coahuila, utilizando el medio de cultivo de Murashige y Skoog con vitaminas y benciladenina, obteniendo exitosos resultados.

Se ha incrementado la velocidad de multiplicación *in vitro* de *Dracaena godseffiana* Hort, en 300,000 veces, *Cordylene terminales* Kunt, en 500,000 y de *Yuca spp*, a través de yemas adventicias y embriones (Pierik, 1990).

El cultivo *in vitro* en Agavaceae ha sido orientado casi exclusivamente a la micropropagación, y el primer reporte de esta familia aparece con el género *Cordyline*, aunque ya en 1974 se citan trabajos no publicados con *Dársena* y *Yuca*. En el género *Agave* el primer reporte es publicado en 1977 (Nava, 1988). En México, Madrigal *et. al.*, (1981), proponen una metodología para la propagación de *Agave fourcroydes* a partir de secciones de tejido de tallo, induciendo organogénesis vía callo, la cual ha sido utilizada como punto de partida para trabajos posteriores con el género *Agave*. Gracián- (1987), presenta el único reporte específico sobre cultivo *in vitro* de *Agave tequilana*, induciendo brotación múltiple sobre ápices de brotes cultivados inicialmente en medio líquido.

Nava (1988), cita una gran cantidad de trabajos de investigación relacionados al cultivo *in vitro* de Agavaceae, donde prueba diferentes fuentes de explantes y empleando como medio de cultivo el de Murashige y Skoog, modificando la fuente de nitrógeno y combinando diferentes concentraciones de auxinas y citocininas, donde los objetivos de las investigaciones fueron: cultivo de células en suspensión para la obtención de sapogeninas, estudio bioquímico, estudios encaminados al aprovechamiento integral de *Agave* spp y *Opuntia* spp, demostración de fotomorfogénesis, pero la mayoría de ellos encaminados a la micropropagación de agaves.

Rodríguez (1995), obtuvo los primeros agave *in vitro*, después de 7 años de investigación donde manejaron diferentes metodologías para la micropropagación masiva de agave y el mejoramiento genético para obtener plantas resistentes a la pudrición del cogollo producido por *Erwinia carotovora*.

Moreno (1995), probó diferentes fuentes de explantes para la multiplicación de *Agave pacífica* utilizando combinaciones de auxinas y citocininas en el medio de cultivo, obteniendo plántulas pasando por la etapa de callo de los explantes provenientes de semillas germinadas *in vitro*.

El Centro de Investigaciones Científicas de Yucatán, desde sus inicios ha desarrollado investigaciones dirigidas a la propagación y mejoramiento genético del henequén, lo cual los ha llevado al desarrollo exitoso de técnicas de cultivo *in vitro*, que les han permitido la rápida producción de decenas de miles de plantas en unos cuantos meses, empleando el medio de cultivo de Murashige y Skoog, modificado en la fuente de nitrógeno y con variantes en las concentraciones de hormonas; gelificantes y tipo de contenendor para cada fase (Eastmond *et. al.*, 2000).

MATERIALES Y METODOS

Localización

El presente trabajo se llevó a cabo en las instalaciones del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, de la carrera de Ingeniero en Horticultura del Centro de Estudios Superiores del Estado de Sonora (CESUES)

Material vegetativo utilizado

Las plantas utilizadas para este experimento fueron obtenidas en Moctezuma, Sonora, del vivero de INIFAP (bulbillos) (Figura 1) y del Rancho Nuevo, propiedad de la familia Barceló Vásquez, que se encuentra localizado a 18 km de la carretera Moctezuma-Huásabas. (Figura 2).



Figura 1.- Vivero de *Agave angustifolia*. INIFAP, Moctezuma, Sonora



Figura 2.- Rancho Nuevo, Moctezuma, Sonora

Del material colectado en campo, Rancho Nuevo en plantación comercial de *Agave angustifolia* se seleccionaron hijuelos de 2 a 3 años de edad, a los que se les dio una ligera limpieza, eliminando raíces y hojas, manipulando el conjunto formado por el tallo mas la base de las hojas.

El material obtenido del vivero de INIFAP, consistió en bulbillos de uno y medio a dos años, estos se trasladaron en sus respectivas bolsas negras.

Explante

Después de haberse realizado numerosos experimentos preliminares en diferentes épocas del año, se determinó que la mejor época para la selección del explante fue la época de primavera. A las plantas seleccionadas se les eliminaron las pencas, hasta dejar las piñas (Figura 3), las cuales tenían tamaño diferente de acuerdo a la edad de la planta, de donde se tomó el cilindro central (área meristemática), el cual se seccionó, siendo los explantes de la parte media e inferior los que mejores resultados preliminares arrojaron, por lo cual fueron los que se seleccionaron para el trabajo experimental. (Figura 4).



Figura 3.- Limpieza de material vegetativo para la extracción de piñas de agave.



Figura 4.- Cilindro central de las cabezas de agave.

Desinfección del material vegetativo

El material vegetativo obtenido (cilindro central), se sumergió en agua jabonosa para eliminar la tierra adherida al tejido. Inmediatamente después en una solución con benlate (2.4 g/l) y Ridomil Gold (6 g/l), con 5 ml /l de jabón líquido antibacterial, por un lapso de una hora, después de este tiempo se cambió a otra solución igual, pero por un tiempo de 5 horas aproximadamente.

Posteriormente se les dio un tratamiento químico con solución de alcohol etílico al 70% por 30 segundos, inmediatamente después se colocó el material vegetativo en una preparación de clorales (hipoclorito de sodio con 6% de cloro activo) al 40% por 15 minutos. Seguido de esto se le dio tres enjuagues con agua destilada esterilizada, para posteriormente dejar el material en agua destilada (Figura 5).



Figura 5.- Material vegetativo desinfectado.

Preparación de medio de cultivo

En la preparación de medio de cultivo se utilizaron las soluciones madre de Murashige y Skoog, previamente preparadas con nitratos reducidos a la mitad de lo que marca este medio (Cuadro 1, página del apéndice). Las concentraciones recomendadas se colocaron en un vaso de precipitado de dos litros y, se colocaron en una parrilla de agitación-calentamiento y se agregaron los demás constituyentes del medio que fueron comunes para todos los tratamientos a probar.

Los productos químicos que se adicionaron fueron: Tiamina, inositol, piridoxina, ácido nicotínico, cloranfenicol y/o cefotaxima (antibióticos), carbón activado, ácido cítrico, ácido ascórbico (antioxidantes), agar y sacarosa en concentraciones que se muestran en el Cuadro 2, página del apéndice

Una vez que todo lo anterior fue disuelto, se procedió a la separación del medio en vasos de precipitado, colocando 3 frascos con 500 ml de medio de cultivo, a los cuales

se le adicionaron 10, 15 y 20 mg/l de benciladenina (BA). Posteriormente de cada frasco conteniendo 500 ml de medio se sacaron tres vasos de precipitado conteniendo cada uno de ellos 166 ml y, a cada uno de ellos se les adicionó la auxina correspondiente a cada uno de los tratamientos los cuales se muestran en el Cuadro 3, página del apéndice.

Seguidamente a cada uno de los tratamientos se les tomó el pH, mismo que fue de 5.7, se procedió a adicionarle el agar, para su posterior disolución en el horno de microondas y su esterilización en autoclave a 121°C y 21 libras de presión, por un tiempo de 15 minutos.

Una vez que el medio de cultivo tomó una temperatura aproximada de 40 a 45°C se le adicionaron los antioxidantes (carbón activado, ácido cítrico y ácido ascórbico), el primero de ellos se adicionó la primer semana; los dos últimos se adicionaron en la campana de flujo laminar la segunda semana de cultivo en un medio nuevo, ya que son muy sensibles a las temperaturas del autoclave. Esto fue en cada uno de los tratamientos y una vez que estos se disolvieron, se procedió al llenado de los frascos de gerber, que fueron 7 por tratamiento y a los cuales se les adicionó de 20 a 25 ml del medio, todo esto se llevó a cabo bajo las mas estrictas condiciones de asepsia, los frascos una vez llenados quedaron listos para ser utilizados al realizar el explante con el material vegetativo de *Agave angustifolia*, previamente desinfectado.

Siembra e incubación

La siembra se realizó en condiciones asépticas dentro de la cámara de flujo laminar, (Figura 6) sembrando 7 frascos por tratamiento, con un explante por tratamiento. El tipo de explante utilizado fueron cilindros intermedios e inferiores del tallo en plano transversal.



Figura 6.- Siembra de material vegetativo

Los cultivos fueron mantenidos en el cuarto de incubación bajo luz fluorescente a temperatura de 27 °C. con una distribución completamente al azar de los tratamientos que se presenta en los cuadros de interacción, (Cuadros 7, 8 y 9).

RESULTADOS Y DISCUSION

Variables analizadas

Presencia de callo

La aparición de callo se presentó en la mayor parte de los tratamientos que se probaron, con Acido 2,4-Diclorofenoxiacético y Benciladenina, Acido Naftalenacético y Benciladenina y Acido Indolbutírico Benciladenina, su presencia empezó a ser visible a partir de los diez días de cultivo, (Cuadros 4, 5, y 6). Resultados similares fueron obtenidos por Madrigal, 1981, con diferentes concentraciones de auxinas de explantes obtenidos de tallo de *A. fourcroydes*. En general se sabe que la formación de los callos se ve influenciada por el tipo de explantes utilizados, como lo mencionan Robert y Colaboradores, 1987, la composición del medio de cultivo, las condiciones medio ambientales durante su incubación, y la época en la cual fue recolectada la fuente de explante (Moreno, 1995).

El cultivo in vitro requiere de la adición de auxinas para la inducción de callo, como lo cita Powers y Backhaus, 1989 al trabajar con *A. Arizonica* y el 2,4-D en diferentes concentraciones es utilizado para la iniciación de este tejido. (Hurtado y Merino, 2001), siendo esto constatado con los resultados obtenidos en la aparición de callo en los tratamientos que se utilizaron en el presente estudio y en donde el 2,4-D fue uno de los que mejores resultados arrojaron.

El análisis estadístico realizado utilizando el programa JMP, demuestra que en la aparición de callo en los explantes, el 2,4-D a bajas concentraciones (0.025 mg l^{-1} y 15 mg l^{-1} de BA), fue el mejor tratamiento, influyendo de manera directa en su formación, junto con los tratamientos 3 y 4 pero los tratamientos 7 y 9 (0.05 y 0.075) mostraron proporción similar, los demás tratamientos probados no mostraron diferencia significativa (Cuadro 10). Esto indica que los explantes de médula respondieron de

manera muy similar al variarse la aplicación de ésta auxinas. Las respuestas a la formación de callo, se ha podido observar en experimentos llevados a cabo con auxinas, como lo indican trabajos realizados por Nava, 1988, Moreno, 1995, Gaspar, 2002, Santacruz, 2003, Preciado, 2003.

En cuanto a la utilización de Benciladenina en cada uno de los tratamientos, podemos observar en estos resultados que tanto a bajas como altas concentraciones esta citocinina no ejerció influencia directa en la formación de callo, lo cual coincide con los resultados obtenidos por Moreno en 1995. Todos los callos formados en los tratamientos evaluados fueron de consistencia dura, aptos para la organogénesis.



Figura 7.- Presencia de callo.

Coloración verde claro

La aparición de coloración verde claro en los explantes de médula que inicialmente eran de color cremoso, se presentó de manera general en todos los tratamientos, a los 10 días después de la siembra en un 95% de los explantes establecidos. No se presentó un patrón de comportamiento en cuanto a la adquisición de esta coloración, ya que lo

mismo se presentó con el T10 (0.075 y 15 mg l⁻¹) como con el T4 (0.025 y 0 mg l⁻¹) en el caso de la aplicación al medio de cultivo de Acido 2,4-Diclorofenoxiacetico y Benciladenina como con T1 (0.025 y 10 mg l⁻¹) y T13 (0, y 10 mg l⁻¹) con Acido naftalenacetico y Benciladenina, asimismo de manera similar el T15 mg l⁻¹ (0 mg l⁻¹ y 20 mg l⁻¹) con Acido Indolbutírico y Benciladenina, respectivamente (Cuadros 11, 15 y 19), (Figura 8).

La presencia de color verde claro en los explantes que al inicio fueron de color cremoso, nos indica que el proceso de oxidación no se presentó en el tejido, ya que este aparece en los primeros días de la siembra en el medio de cultivo, y su presencia es irreversible, ocasionando muerte total del material vegetal.

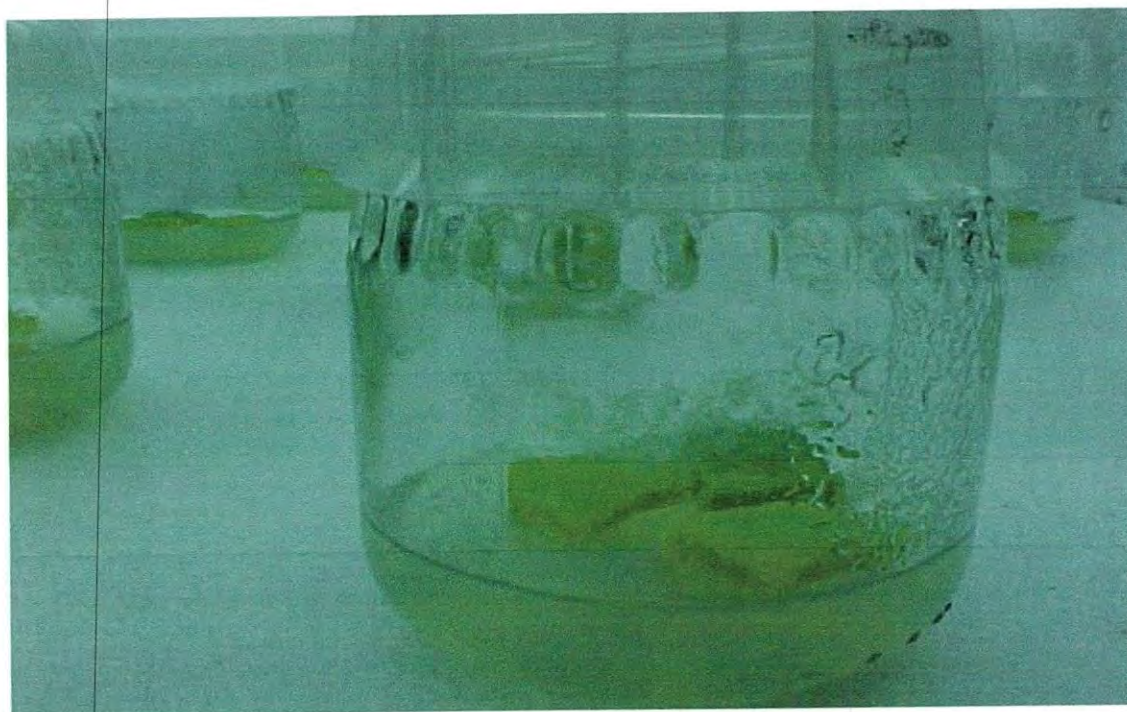


Figura 8.- Explantes con coloración verde claro.

Coloración verde intenso

Comportamiento muy similar se pudo observar con los tratamientos, para la aparición de la coloración verde intenso, indicando en ambos casos que las auxinas y citocininas

actúan ayudando a la aparición progresiva de estas coloraciones a las concentraciones manejadas en los 16 tratamientos (Cuadros 12, 16 y 20), (Figura 9), indicando con ello el buen desarrollo de los explantes.

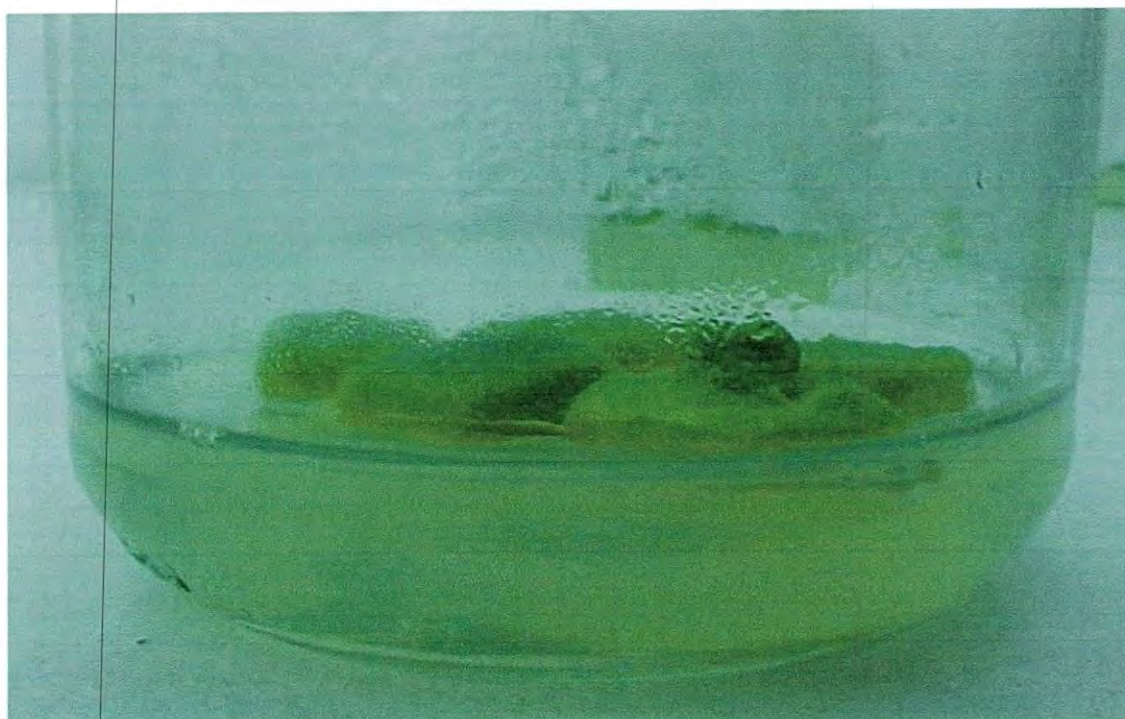


Figura 9.- Explantes color verde intenso.

Presencia de brotes

En el medio de cultivo donde se adicionó 2-4-Diclorofenoxiacético la respuesta a la formación de brotes fué inconsistente, ya que no presentó tendencia uniforme, con respecto a las dosis empleadas, encontrándose que el T13 (0 mg l⁻¹ de 2,4-Diclorofenoxiacético y 15 mg l⁻¹ de Benciladenina) fue el mejor, coincidiendo con los resultados obtenidos por Robert, 1987 seguido de T7, T2, T3, T9, T15, (Cuadro 13, Figuras 10 y 13). Además en los tratamientos T7 y T15 (0.05, 20; 0 y 20 mg l⁻¹ de 2,4-Diclorofenoxiacético y Benciladenina), respectivamente, se dio la presencia de brotes directamente de los explantes, sin pasar por la etapa de callo. Observándose que en la mayor parte de los tratamientos que contenían la concentración mayor de esta auxina (0.075 mg l⁻¹) empezó a disminuir el crecimiento, llegando a causar en algunos casos toxicidad, como lo reporta Gaspar 2002, al trabajar con *A. angustifolia*. Se pueden

observar los valores de medias para la variable presencia de brotes en el Cuadro 4, indicándonos que la aparición de los primeros brotes se inició a la cuarta semana de cultivo y estos se fueron incrementando conforme fueron pasando los días en el medio de cultivo. Resultados similares son reportados por varios investigadores, Madrigal, 1981, Robert, 1987, Gaspar, 2002, Powers y Backhaus, 1989.

En el caso en donde se aplicó Acido Naftalenacético y Benciladenina, se pudo observar como mejores tratamientos en la aparición de presencia de brotes a T5, T4, T8, T16 (Cuadro 17, Figuras 11 y 14), no mostrando diferencia significativa entre ellos y siendo a los 40 días donde se presentó la mayor cantidad de explantes con brotes, aunque se vio una disminución a los 60 días que duró el experimento, ya que estos empezaron a mostrar una pérdida de vigor. Los valores de medias para esta variable con estos tratamientos se pueden observar en el Cuadro 5. Powers y Backhaus 1989, regeneraron plantulas de *A. arizonica*, de callo derivados de segmentos basales de bulbillos, utilizando concentraciones similares de Acido naftalenacético y Benciladenina como las que muestran los tratamientos T5 y T9.

La mayor presencia de brotes en el explante, en los medios de cultivo que contenían Acido Indolbutírico y Benciladenina se presentó en los tratamientos T7, T3, T12, T1, T2, T9, T10 y T14 (Cuadro 21, Figuras 12 y 15), no mostrando diferencias significativas entre ellos, esto nos indica que la respuesta a la formación de brotes no se vio afectada por la dosis, respondiendo tanto a bajas como a altas concentraciones de Acido Indolbutírico y de Benciladenina sin presentar ningún efecto de toxicidad en el explante. Las medias cada 10 días después de la siembra se puede observar en el Cuadro 6.



Figura 10.- Influencia del 2,4-Diclorofenoxiacético y Benciladenina en la presencia de brotes.



Figura 11.- Influencia del Acido Naftalenacético y Benciladenina en la presencia de brotes.



Figura 12.- Influencia del Acido indolbutírico y Benciladenina en la presencia de brotes.

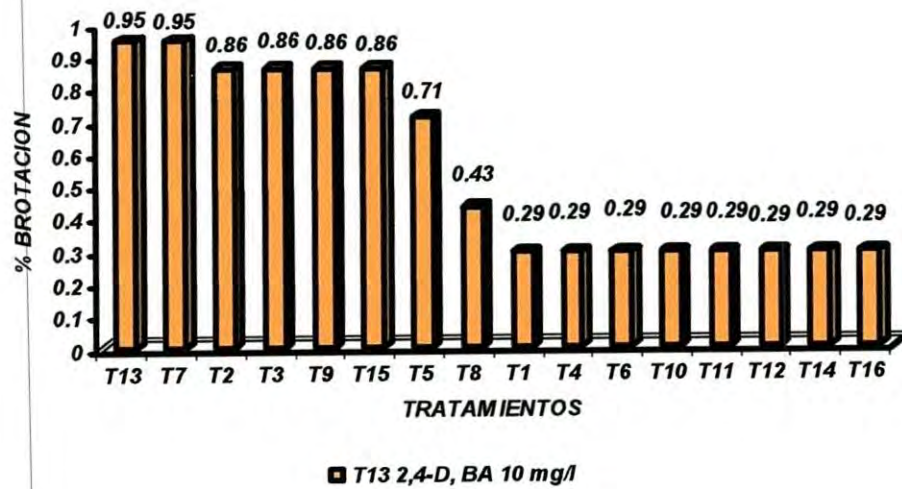


Figura 13 - Influencia del 2,4-Diclorofenoxiacético y Benciladenina en la Presencia de brotes

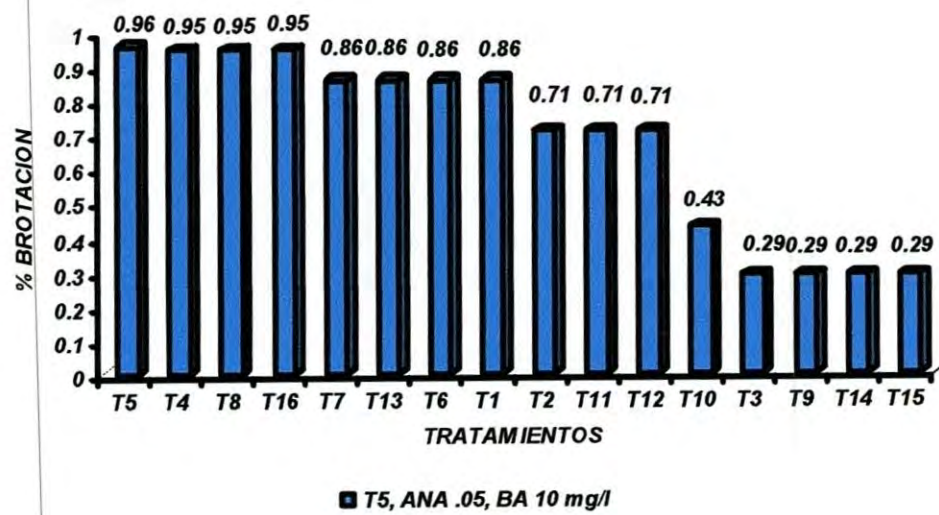


Figura 14. Influencia del Acido naftalenacético y Benciladenina en la presencia de Brotes.

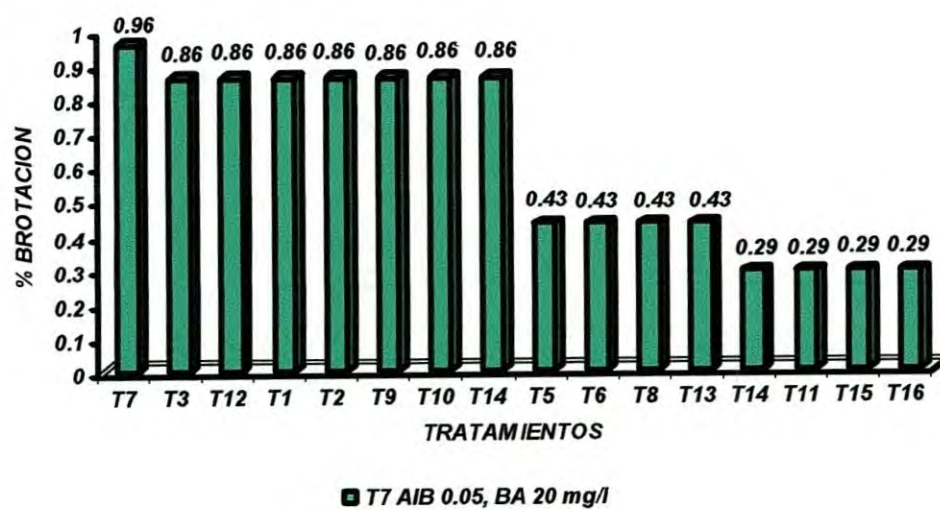


Figura 15.- Influencia del Acido Indolbutirico y Benciladenina en la presencia de brotes.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- 1.- La formación de callo se observó a diez días después de la siembra en la mayoría de los tratamientos evaluados.
- 2.- Los mejores resultados en formación de callo para 2,4-Diclorofenoxiacético y Benciladenina se presentaron en las concentraciones de 0.025 y 15 mg l⁻¹, respectivamente, (T2).
- 3.- En cuanto a Acido naftalenacético y Benciladenina las mejores concentraciones para formación de callo fueron 0.05 + 20; 0.05 + 0, mg l⁻¹ (T7 y T8).
- 4.- Con Acido indolbutirico y Benciladenina la mejor combinación para formación de callo fue con 0.075 y 0 mg l⁻¹, (T12).
- 5.- Todos los callos formados fueron de consistencia dura, aptos para la organogénesis.
- 6.- En el caso de la coloración verde claro en los explantes, las interacciones en todos los tratamientos no mostraron diferencias significativas, apareciendo en todas las combinaciones de reguladores de crecimiento utilizados.
- 7.- La aparición de la coloración verde intenso, las auxinas y citocininas actuaron ayudando en la aparición progresiva de esta coloración a las concentraciones manejadas en los 16 tratamientos de cada uno de los bloques experimentados.
- 8.- En el medio de cultivo donde se adicionó 2,4-Diclorofenoxiacético la respuesta a la formación de brotes fue uniforme, encontrándose que el T13 (0 mg l⁻¹ de 2,4-

Diclorofenoxiacético y 15 mg l^{-1} de Benciladenina) fue el mejor, seguido de T7, T2, T3, T9 y T15.

9.- En los tratamientos T7 y T15 ($0.05, 20; 0$ y 20 mg l^{-1}), respectivamente, se dio la presencia de brotes directamente de los explantes, sin pasar por la etapa de callo.

10.- A concentraciones mayores se empezó a disminuir el crecimiento, llegando a causar en algunos casos toxicidad.

11.- Para Acido naftalenacético y Benciladenina, los mejores tratamientos en la aparición de brotes fueron T5, T4, T8, T16, no mostrando diferencia significativa entre ellos. El análisis estadístico realizado por bloques a días después de la siembra arrojó que a los 40 días fue donde se presentó la mayor cantidad de explantes con brotes, aunque se vio una disminución a los 60 días, ya que estos empezaron a mostrar una pérdida de vigor.

12.- La mayor respuesta a la formación de brotes, en los medios de cultivo que contenían Acido Indolbutírico se presentó en la mayor parte de los tratamientos T7, T3, T12, T1, T2, T9, T10 y T14.

13.- El Acido indolbutírico respondió tanto a bajas como a altas concentraciones sin presentar ningún efecto tóxico.

14.- La región meristemática de la cabeza de *Agave angustifolia*, nos asegura la obtención de brotes, ya sea vía callo o directamente del explantente.

Por todos los resultados planteados, se recomienda lo siguiente:

- a).- Para la regeneración de plántula a partir callo, se recomienda utilizar el 2-4-Diclorofenoxiacético y Benciladenina en las concentraciones de 0.025 y 15 mg l⁻¹, respectivamente.
- b).- Para la regeneración de brotes directamente de los explantes, sin pasar por la etapa de callo, se recomienda el 2-4-Diclorofenoxiacético y Benciladenina en concentraciones de 0.05, y 20 o bien 0 y 20 mg l⁻¹, respectivamente.
- c).- Utilizar como fuente de explante la región meristemática de la cabeza de *Agave angustifolia*.

BIBLIOGRAFÍA

- Ammirato, P. V., D. A. Evans, W. R. Sharp, and Y. P. S. Bajaj. 1990. *Agave*. Handbook of Plant Cell Culture. Vol. 5. Ornamental Species. Ed. McGraw Hill. USA. p. 206-225.
- Armenta, C. A. D. 2002. Hongos Micorrizicos y Filamentosos Asociados con *Agave angustifolia* Haw. Tesis de Maestría. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. CIAD. Hermosillo, Son., p. 76.
- Binh, L. T., Muoi, H. T. K. Oanh, T. D. Thang and D. T. Phong. 1990. Rapid Propagation of *Agave* by *in vitro* Tissue Culture. Plant Cell Tissue and Organ Culture 23: 67-70.
- Canizalez, G., 1995. Estudio para la selección de la Tecnología de Producción de Bacanora Tesis de Licenciatura. Universidad de Sonora, Hermosillo, Son. México. p. 64.
- Claridades Agropecuarias. 2000. El *Agave tequilero*, Pencas que Abrazan al Mundo. SAGAR. p. 3-41.
- Córdova, N. M. 2000. Botánica Sistemática. Centro de Estudios Superiores del Estado de Sonora. CESUES. Hermosillo, Son. p. 50-57.
- Cruz, C., L. Del Castillo, M. Robert, L. 1985. Biología y Aprovechamiento Integral del Henequén y otros *Agaves*. Centro de Investigaciones Científicas de Yucatán. Yucatán, México. p 83-89.
- Das, T. 1992. Micropropagation of *Agave sisilana*. Plant Cell Tissue Organ Cultures. 31:253-255.
- Eastmond, A., J. L. Herrera y M. L. Robert. 2000. La Biotecnología Aplicada al Henequén. Alternativa para el Futuro. Centro de Investigación Científica de Yucatán. Yucatán, México. pp. 199.
- Gamborg, O. L. 1984. Plant Cell Culture: Nutrition and Media. Cell Culture and Somatic Cell Genetic. Ed. Academic Press, Inc. Orlando p. 148-151.

- Gaspar, A.A. 2002. Generación de la Metodología para la Micropropagación de *Agave mezcadero*. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Sinaloa. pp. 80.
- George, E. F. 1993. Plant Propagation by Tissue Culture. Part I. The Technology. Exegenetics limited. Ed. Edington. pp. 27.
- Gentry, H. S. 1982. *Agaves* of Continental North America. Ed. The University of Arizona Press. pp. 630.
- Gracián, S. S. 1987. Propagation *in vitro* del *Maguey pulquero* (*Agave salmiana* Otto Ex Salm). In. Anónimo (1987) III Reunión Nacional de Bioquímica y Cultivo de Tejidos Vegetales. Irapuato. Gto. p. 14.
- Hurtado, M. D. y M. M. Merino. 2000 Cultivo de Tejidos Vegetales. Quinta reimpresión, Ed Trillas. México. p. 44-73.
- Kolendo, J. R. 1996. The *Agave*: A Plant and its Story. Internet en la página www. Users. Globalnet.co.uk/-jankol/article/articles.html. p. 18.
- Loera, M. M., 1995. Técnicas de Esterilización. CIATEJ. Guadalajara, Jal. p. 16-29.
- López, P. C, 1985. Fundamentos Teórico-Prácticos de Cultivo de Tejidos Vegetales. "Manipulación en Condiciones Asépticas". Laboratorio de Biotecnología, Centro de Genética, Colegio de Postgraduados, Chapingo, México. p. 2-20.
- Madrigal, R., Dorantes, G.M.R.; y J. L. Rodríguez de la O. 1981. Propagación *in vitro* de henequén (*Agave fourcroydes* Lemaire). Primer Simposio del agave. Mérida, Yucatán. p. 12.
- Miller, L. R. and Y. T. Murashige. 1976. Tissue Culture Propagation of Tropical Foliage Plants. *in vitro*. Plant Physiology. 12: 797-813.
- Moreno, M. S. 1995. Propagación *in vitro* de *Agave pacífica* Trel. (*Maguey de Bacanora*) para su Conservación, Repoblación y Cultivo Comercial. Departamento de Agricultura y Ganadería. Universidad de Sonora. Tesis de Maestría. p. 106.
- Murashige, T. 1974. Plant Propagation Through Tissue Culture. Ann. Rev. Plant. Physiol. 25: 135-166.
- Nava, A. 1988. *Agave tequilana* Weber azul *in vitro*. Un Modelo para Estudios en Morfogénesis. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. Centro de Genética. Montecillos, México. pp. 233.
- Nobel, P. S. 1998. Los Incomparables *Agaves* y Cactus. Ed. Trillas. México, D.F. p. 37-58.

- Nobel, P. S., M. Castañeda, G. North, E. Pimienta, and A. Ruíz. 1998. Temperature Influences on Leaf CO₂ Exchange, Cell Viability and Cultivation Range for *Agave tequilana*. *J. Arid Environ.* 39: 1-9.
- Núñez, N. L. 2001. La Producción de Mezcal Bacanora: Una Oportunidad Económica para Sonora. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Sonora, México. p. 15, 71.
- Pérez, M.B., E.M., Ramírez, M.R., Núñez, y P.H.G., Ochoa, 1999. Introducción al Cultivo de Tejidos Vegetales. Universidad de Aguascalientes. México. p. 15-71.
- Pierik, R. L. M., 1990. Cultivo *in vitro* de las Plantas Superiores. 3ra. ed. Ed. Mundi Prensa. España. pp. 326.
- Powers, D. E., y R. A. Backhaus. 1989. *In vitro* Propagation of *Agave arizonica*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 15: 57-60.
- Preciado, G. L. 2003. Control de La Oxidación *In vitro* de *Agave angustifolia*. Tesis de Licenciatura. Centro de Estudios Superiores del Estado de Sonora. pp. 87.
- Robert, M. L., J. L. Chan and J. L. Herrera. 1991. Micropropagation of *Agave* spp. *Biotechnology in Agricultural and Forestry*. Ed. Springer-Verlag. pp. 308-329.
- Robert, M. L., J. L. Herrera, J. L. Chan, y F. Contreras. 1992. Micropropagation of *Agave* sp. In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol. 19. High Tech and Micropropagation III by Y. P. S. Bajaj. Ed. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg pp. 204-250.
- Robert, M. L., J. L. Herrera, J. L., F. Contreras. y K. N. Scorer. 1987. *In Vitro* Propagation of *Agave* (Henequen). *Plant Cell Tissue Organ Cult* 8: 37-48.
- Roca, W. M., y L. A., Mroginski. 1991. Cultivo de Tejidos en la Agricultura. *Fundamentos y Aplicaciones*. CIAT. Colombia. p. 643-650.
- Rodriguez, G. 1995. Organogénesis. Curso Taller. Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales. CIATEJ. Guadalajara, Jal. pp. 65.
- Santa Cruz, M. C. 2003. Efecto de Antibióticos para el Control de la Contaminación *in vitro* de *Agave angustifolia*. Tesis de Licenciatura. Centro de Estudios Superiores del Estado de Sonora. pp. 87.
- Santacruz, R. F., F. H. Gutierrez, y B. R. Garay. 1999. Efficient *in vitro* Propagation of *Agave parrapsana* Berger. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 56: 163-167.
- Smith, H. R. 2000 *Plant Tissue Culture, Techniques and Experiments*. Second Edition, Academic Press. p. 52-54.

RIS T3079⁵⁰

Vivas de la Torre, E. N. 1995. Medio de Cultivo. CIATEJ. p. 29-50.

A P E N D I C E

Cuadro 1.- Medio de cultivo de Murashige y Skoog utilizado como medio básico, con nitratos reducidos a la mitad.

CONSTITUYENTES	g l ⁻¹
NH ₄ NO ₃	825
KNO ₃	950
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440
KH ₂ PO ₄	170
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370
MnSO ₄ ·4H ₂ O	16.8
H ₃ BO ₃	6.2
ZnSO ₄ ·4H ₂ O	8.2
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25
KI	0.83
CoCl ₂ ·2H ₂ O	0.025
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025
Na ₂ EDTA	37.3
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.8

Cuadro 2.- Productos adicionados al medio de cultivo básico de Murashige y Skoog.

PRODUCTO	mg l⁻¹
Tiamina	0.4
Inositol	100
Piridoxina	0.5
Acido nicotínico	1
Cloranfenicol	500
Carbón activado	1000
Acido cítrico	100
Acido ascórbico	75
Agar	8000
Sacarosa	30000

Cuadro 3.- Reguladores de crecimiento utilizados en el medio de cultivo de Murashige y Skoog.

Citocininas	mg l⁻¹	Auxinas	mg l⁻¹
Benciladenina	10	Ac. Naftalenacético	0.025
		Ac. Indolbutírico	0.025
		Ac. 2,4-D	0.025
Benciladenina	15	Ac. Naftalenacético	0.05
		Ac. Indolbutírico	0.05
		Ac. 2,4-D	0.05
Benciladenina	20	Ac. Naftalenacético	0.075
		Ac. Indolbutírico	0.075
		Ac. 2,4-D	0.075

Cuadro 4.-Proporciones de medias de las variables cada 10 días después de la siembra en los tratamientos 2,4-D/BA.

Variables	Días					
	10	20	30	40	50	60
Presencia de callo	.69	.38	.38	.24	.15	.06
Presencia de Brotes	.018	.33	.33	.46	.55	.60
Color verde claro	.95	.60	.50	.50	.29	.24
Color verde intenso	.06	.42	.50	.46	.51	.42

Cuadro 5.- Proporciones de medias de las variables cada 10 días después de la siembra en los tratamientos ANA/BA.

Variables	Días					
	10	20	30	40	50	60
Presencia de callo	.78	.29	.29	.20	.11	.11
Presencia de Brotes	.89	.42	.42	.51	.51	.51
Color verde claro	.78	.60	.42	.38	.33	.20
Color verde intenso	.11	.24	.60	.60	.46	.46

Cuadro 6.- Proporciones de medias de las variables cada 10 días después de la siembra en los tratamientos AIB/BA

Variables	Días					
	10	20	30	40	50	60
Presencia de callo	.73	.64	.60	.60	.38	.38
Presencia de Brotes	.0	.38	.46	.50	.51	.55
Color verde claro	.69	.64	.46	.33	.33	.51
Color verde intenso	.06	.20	.33	.38	.29	.20

Cuadro 7.- Niveles de reguladores de crecimiento 2,4-D/BA.

2-4-D/BA				
2-4-D \ BA	10 b₁	15 b₂	20 b₃	0 b₄
0.025 a₁	T1 a₁ b₁	T2 a₁ b₂	T3 a₁ b₃	T4 a₁ b₄
0.05 a₂	T5 a₂ b₁	T6 a₂ b₂	T7 a₂ b₃	T8 a₂ b₄
0.075 a₃	T9 a₃ b₁	T10 a₃ b₂	T11 a₃ b₃	T12 a₃ b₄
0 a₄	T13 a₄ b₁	T14 a₄ b₂	T15 a₄ b₃	T16 a₄ b₄

Cuadro 8.- Niveles de reguladores de crecimiento ANA/BA.

ANA/BA				
ANA \ BA	10 b₁	15 b₂	20 b₃	0 b₄
0.025 B₁	T1 B₁ b₁	T2 B₁ b₂	T3 B₁ b₃	T4 B₁ b₄
0.05 B₂	T5 B₂ b₁	T6 B₂ b₂	T7 B₂ b₃	T8 B₂ b₄
0.075 B₃	T9 B₃ b₁	T10 B₃ b₂	T11 B₃ b₃	T12 B₃ b₄
0 B₄	T13 B₄ b₁	T14 B₄ b₂	T15 B₄ b₃	T16 B₄ b₄

Cuadro 9.- Niveles de reguladores de crecimiento AIB/BA.

AIB/BA					
AIB	BA	10 b₁	15 b₂	20 b₃	0 b₄
0.025 A₁		T1 A₁ b₁	T2 A₁ b₂	T3 A₁ b₃	T4 A₁ b₄
0.05 A₂		T5 A₂ b₁	T6 A₂ b₂	T7 A₂ b₃	T8 A₂ b₄
0.075 A₃		T9 A₃ b₁	T10 A₃ b₂	T11 A₃ b₃	T12 A₃ b₄
0 A₄		T13 A₄ b₁	T14 A₄ b₂	T15 A₄ b₃	T16 A₄ b₄

Cuadro 10.- Prueba de Tukey con un nivel de significancia de 5% para medir la influencia del 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) y Benciladenina (BA) en la presencia de callo.

TRATAMIENTO	PROPORCION MEDIA	GRUPOS HOMOGENEOS
T2	.86	a
T3	.71	ab
T4	.71	ab
T7	.71	ab
T9	.71	ab
T15	.71	ab
T1	.29	b
T5	.29	b
T6	.29	b
T8	.29	b
T10	.29	b
T11	.29	b
T12	.29	b
T13	.29	b
T14	.29	b
T16	.29	b

Cuadro 11.- Prueba de Tukey con un nivel de significancia de 5% para medir la influencia del 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) y Benciladenina (BA) en la presencia de explantes verde claro.

TRATAMIENTO	PROPORCION MEDIA	GRUPOS HOMOGENEOS
T10	.96	a
T16	.95	ab
T13	.95	ab
T3	.95	ab
T8	.95	ab
T11	.86	ab
T12	.86	ab
T14	.86	ab
T7	.86	ab
T15	.86	ab
T2	.86	ab
T5	.71	ab
T9	.71	ab
T1	.43	b
T6	.43	b
T4	.43	b

Cuadro 12.- Prueba de Tukey con un nivel de significancia de 5% para medir la influencia del 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) y Benciladenina (BA) en la presencia de explantes verde intenso.

TRATAMIENTO	PROPORCION MEDIA	GRUPOS HOMOGENEOS
T11	.95	a
T13	.95	ab
T16	.86	ab
T5	.86	ab
T7	.86	ab
T10	.71	ab
T12	.71	ab
T15	.71	ab
T3	.43	b
T6	.43	b
T8	.43	b
T9	.43	b
T1	.29	b
T2	.29	b
T4	.29	b
T14	.29	b

Cuadro 13.- Prueba de Tukey con un nivel de significancia de 5% para medir la influencia del 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) y Benciladenina (BA) en la presencia de brotes.

TRATAMIENTO	PROPORCION MEDIA	GRUPOS HOMOGENEOS
T13	.95	a
T7	.95	ab
T2	.86	abc
T3	.86	abc
T9	.86	abc
T15	.86	abc
T5	.71	bc
T8	.43	bc
T1	.29	c
T4	.29	c
T6	.29	c
T10	.29	c
T11	.29	c
T12	.29	c
T14	.29	c
T16	.29	c

Cuadro 14.- Prueba de Tukey con un nivel de significancia de 5% para medir la influencia del Acido Naftalenacético (ANA) y Benciladenina (BA) en la presencia de callo.

TRATAMIENTO	PROPORCION MEDIA	GRUPOS HOMOGENEOS
T7	.71	a
T8	.71	a
T16	.71	a
T5	.43	a
T6	.43	a
T13	.43	a
T14	.43	a
T1	.29	a
T2	.29	a
T3	.29	a
T4	.29	a
T9	.29	a
T10	.29	a
T11	.29	a
T12	.29	a
T15	.29	a

Cuadro 15.- Prueba de Tukey con un nivel de significancia de 5% para medir la influencia del Acido Naftalenacético (ANA) y Benciladenina (BA) en la presencia de explantes verde claro.

TRATAMIENTO	PROPORCION MEDIA	GRUPOS HOMOGENEOS
T1	.98	a
T15	.96	ab
T9	.95	bc
T10	.95	bc
T6	.86	bc
T2	.86	bc
T12	.86	bc
T3	.86	c
T4	.71	c
T7	.71	c
T8	.71	c
T11	.71	c
T14	.71	c
T16	.71	c
T5	.43	c
T13	.43	c

Cuadro 16.- Prueba de Tukey con un nivel de significancia de 5% para medir la influencia del Acido Naftalenacético (ANA) y Benciladenina (BA) en la presencia de explantes verde intenso.

TRATAMIENTO	PROPORCION MEDIA	GRUPOS HOMOGENEOS
T4	.96	a
T1	.95	ab
T2	.95	ab
T8	.86	ab
T13	.86	ab
T7	.86	ab
T11	.86	ab
T12	.86	ab
T15	.86	ab
T6	.71	b
T9	.71	b
T10	.71	b
T3	.29	b
T5	.29	b
T14	.29	b
T16	.29	b

Cuadro 17.- Prueba de Tukey con un nivel de significancia de 5% para medir la influencia del Acido Naftalenacético (ANA) y Benciladenina (BA) en la presencia de brotes.

TRATAMIENTO	PROPORCION MEDIA	GRUPOS HOMOGENEOS
T5	.96	a
T4	.95	ab
T8	.95	ab
T16	.95	ab
T7	.86	bc
T13	.86	bc
T6	.86	bc
T1	.86	bc
T2	.71	bc
T11	.71	bc
T12	.71	bc
T10	.43	c
T3	.43	c
T9	.43	c
T14	.43	c
T15	.43	c

Cuadro 18.- Prueba de Tukey con un nivel de significancia de 5% para medir la influencia del Acido Indolbutírico (AIB) y Benciladenina (BA) en la presencia de callo.

TRATAMIENTOS	PROPORCION MEDIA	GRUPOS HOMOGENEOS
T12	.86	a
T6	.71	ab
T9	.71	ab
T10	.71	ab
T3	.43	ab
T7	.43	ab
T11	.43	ab
T13	.43	ab
T14	.43	ab
T1	.29	b
T2	.29	b
T4	.29	b
T5	.29	b
T8	.29	b
T15	.29	b
T16	.29	b

Cuadro 19.- Prueba de Tukey con un nivel de significancia de 5% para medir la influencia del Acido Indolbutírico (AIB) y Benciladenina (BA) en la presencia de explantes verde claro.

TRATAMIENTOS	PROPORCION MEDIA	GRUPOS HOMOGENEOS
T8	.96	a
T15	.95	ab
T9	.95	ab
T11	.95	ab
T5	.86	ab
T13	.86	ab
T14	.86	ab
T2	.86	ab
T6	.86	ab
T1	.86	ab
T7	.86	ab
T3	.71	ab
T4	.43	b
T10	.29	b
T12	.29	b
T16	.29	b

Cuadro 20.- Prueba de Tukey con un nivel de significancia de 5% para medir la influencia del Acido Indolbutírico (AIB) y Benciladenina (BA) en la presencia de explantes verde intenso.

TRATAMIENTOS	PROPORCION MEDIA	GRUPOS HOMOGENEOS
T2	.96	a
T5	.95	ab
T1	.86	ab
T13	.86	ab
T8	.86	ab
T14	.86	ab
T7	.86	ab
T9	.86	ab
T11	.86	ab
T15	.43	b
T3	.29	b
T4	.29	b
T6	.29	b
T10	.29	b
T12	.29	b
T16	.29	b

Cuadro 21.- Prueba de Tukey con un nivel de significancia de 5% para medir la influencia del Acido Indolbutírico (AIB) y Benciladenina (BA) en la presencia de brotes.

TRATAMIENTOS	PROPORCION MEDIA	GRUPOS HOMOGENEOS
T7	.96	a
T3	.86	ab
T12	.86	ab
T1	.86	ab
T2	.86	ab
T9	.86	ab
T10	.86	ab
T14	.86	ab
T5	.43	b
T6	.43	b
T8	.43	b
T13	.43	b
T4	.29	b
T11	.29	b
T15	.29	b
T16	.29	b